



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**TRABALHO DE LICENCIATURA**

TEMA:

**SÍNTESE DE ANÁLOGOS DE FITOALEXINAS COM BASE DE  
BENZOXAZOL COMO POTENCIAIS AGENTES  
ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS.**

**AUTOR:** EVARISTO PEDRO LUIS JÚNIOR

Maputo, Outubro de 2011



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE



FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**TRABALHO DE LICENCIATURA**

TEMA:

**SÍNTESE DE ANÁLOGOS DE FITOALEXINAS COM BASE DE  
BENZOXAZOL COMO POTENCIAIS AGENTES  
ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS.**

**AUTOR:** EVARISTO PEDRO LUIS JÚNIOR

**SUPERVISOR:** PROF. DOUTOR VICTOR SEVASTYANOV

Maputo, Outubro de 2011

## DEDICATÓRIA

Primeiramente à Deus, pela vida e saúde que me tem proporcionado dia após dia;

À minha mãe Maria Ivone Pereira de Menezes, ao meu pai Joaquim Garibaldi Assunção da Conceição (em memória), a minha tia Maria Augusta Menezes da Conceição e a família Conceição pelo apoio e encorajamento nos meus primeiros anos de escolaridade, para que vejam os frutos da árvore que plantaram, regaram e de coração cuidaram, Eu dedico.

## AGRADECIMENTOS

São devidos os agradecimentos a todos aqueles que contribuíram directamente e indirectamente para a efectivação das experiências realizadas, bem como para a elaboração deste trabalho.

Um agradecimento especial ao meu supervisor, Prof. Doutor Victor Sevastyanov, pela facilidade de contacto, simplicidade e ainda pelos ensinamentos intermitentes nas realizações experimentais.

Ao corpo docente do Departamento de Química pelas teorias e modelos prestados que de certa forma facilitaram grandemente na investigação do presente trabalho.

A minha mãe Maria Ivone Pereira de Menezes, ao meu pai Joaquim Garibaldino Assunção da Conceição (em memória) pela educação que me proporcionaram tendo me tornado no Homem bom que hoje sou, a minha irmã Mildrad Helena Pedro Luís pela força e pelos conselhos que sempre deu me para continuar e dignificar a família Pedro Luís.

Ao Exmo. Senhor Director do Centro de análise Criminalística por ter aceitado a realização de análises de amostras em espectroscopia de Infra-Vermelho para a determinação da composição química dos meus produtos de síntese.

E por fim, o autor deseja agradecer aos colegas e amigos António Tchambule, Chim Júnior, funcionários e estudantes do Departamento de Química pela simpatia e momentos de lazer proporcionados durante a fase académica.

## DECLARAÇÃO SOB COMPROMISSO DE HONRA

**Evaristo Pedro Luís Júnior**, nascido em 07 de Junho de 1986, natural de Inhambane, filho de Evaristo Pedro Luís e de Auria Gabriel Manuel, residente em Maputo, portador do B.I. nº 110103996133B emitido aos 30 de Junho de 2010 pelo Arquivo de Identificação civil de Maputo, **declaro sob compromisso de honra que este trabalho foi por mim elaborado, que nunca foi apresentado como trabalho de culminação de estudos e que as referências fornecidas foram por mim consultadas.**

Maputo, Outubro de 2011

.....

(Evaristo Pedro Luís Júnior)

## RESUMO

Na procura de novos meios de defesa das plantas e métodos alternativos para o controle de patógenos foi preparado 2-Benzoxazolinona, 5-nitrobenzoxazolinona e Arilhidrazona de 2-benzoxazolinona que representam os análogos sintéticos de Fitoalexinas com possível actividade antibacteriana e antifúngica. O método escolhido consiste em reacção de orto-aminofenóis substituídos com ureia no meio de solventes orgânicos sob refluxo.

Inicialmente realizou-se a síntese de 2-benzoxazolinona que consistia na mistura de 50 mmol de ureia e 50 mmol de o-aminofenol com o uso de solvente tolueno, num frasco reaccional de 50 mL. Posteriormente realizou-se outra síntese, o 5-nitrobenzoxazolinona, que consistia na mistura de 10 mmol de ureia e 10 mmol de 2-amino-5-nitrofenol com o uso de solvente n-butanol num frasco reaccional de 50 mL. De seguida realizou-se a síntese da Arilhidrazona de 2-benzoxazolinona, que consistia na mistura de 10mmol de 2-benzoxazolinona sintetizada na primeira experiência, 10 mmol de fenilhidrazinahidrocloro e 12 mmol de hidrogenocarbonato de sódio usando-se solvente etanol num frasco reaccional de 50 mL. Foram desenvolvidas as reacções em mantas eléctricas com aquecimento dos reagentes na presença de cada solvente citado acima à 105°C, adicionando-se em cada frasco reaccional pedras de ebulição. O tempo reaccional foi de 62 horas para síntese de 2-benzoxazolinona, 78 horas para síntese de 5-nitrobenzoxazolinona e 28 horas para a síntese de Arilhidrazona de 2-benzoxazolinona, com rendimentos brutos da ordem de 79,59% à 91,3 % e purificados da ordem de 66,5% à 73,6%. O intervalo de variação de temperaturas de fusão dos compostos purificados por recristalização foi da ordem de 3-4°C. O decurso das primeiras duas reacções foi acompanhado pela libertação de amoníaco, detectado pelo papel indicador pH e a última usando-se a Cromatografia de Camada Delgada.

Finalmente realizou-se a análise do produto purificado sintetizado 2-Benzoxazolinona em espectroscopia de Infravermelho para a determinação da sua composição química. A confirmação da estrutura de 2-benzoxazolinona foi feita com o auxílio da espectroscopia de Infravermelho, medição do seu ponto de fusão e a posterior comparação com o espectro e ponto de fusão de 2-benzoxazolinona padrão.

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. METODOLOGIA APLICADA .....	2
3. OBJECTIVOS DO TRABALHO.....	3
Objectivo geral .....	3
Objectivos específicos .....	3
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
4.1. Factores de resistência bioquímicos.....	4
4.1.1. Factores de resistência bioquímicos pré-formados.....	4
4.1.2. Factores de resistência bioquímicos pós-formados .....	13
4.2. Fitoalexinas.....	14
4.2.1. Fitoalexinas e resistência de plantas às doenças.....	19
4.3. Benzoxazóis.....	23
4.3.1. Métodos de síntese de Benzoxazóis .....	24
4.3.2. Acção de reagentes nucleofílicos .....	25
4.3.3. Propriedades.....	26
4.3.3.1. Propriedades do grupo halogéneo na posição 2.....	26
4.3.3.2. Propriedades do grupo alquil na posição 2.....	28
4.3.3.3. Substituição nucleofílica do hidrogênio na posição 2.....	28
4.4. Aplicação dos Benzoxazóis no sector agrícola .....	29
4.5. Modo de acção dos compostos fenólicos .....	31
4.6. Determinação do ponto de fusão como critério de pureza .....	32
4.7. Purificação de amostras orgânicas sólidas. Recristalização .....	33
4.8. Controlo de pureza através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	34
4.8.1. Cromatografia em Camada Delgada.....	34

4.9.	Método para a confirmação da estrutura química .....	36
4.9.1.	Espectroscopia de Infravermelho .....	36
5.	PARTE EXPERIMENTAL.....	38
5.1.	Procedimento .....	39
5.1.1.	Síntese de 2- Benzoxazolinona. ....	39
5.1.3.	Síntese de Arilidrazona de 2- benzoxazolinona. ....	40
5.2.	Recristalização dos produtos sintetizados .....	41
5.3.	Medição dos pontos de fusão.....	42
5.4.	Análise cromatográfica.....	43
5.5.	Espectrofotometria no Infravermelho .....	43
5.5.1.	Substância tida como padrão para identificação de 2-BOA.....	43
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
6.1.	RESULTADOS .....	45
6.1.1.	Síntese de 2- Benzoxazolinona. ....	45
6.1.3.	Síntese de Arilidrazona de 2- benzoxazolinona. ....	46
6.1.4.	Síntese de 2- Benzoxazolinona. ....	46
6.1.6.	Síntese de Arilidrazona de 2- benzoxazolinona. ....	48
6.1.7.	Espectroscopia de Infravermelho .....	50
6.2.	DISCUSSÃO .....	53
6.2.1.	Análise Cromatográfica .....	55
6.2.2.	Espectroscopia de Infravermelho .....	56
7.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÃO .....	58
	2- Benzoxazolinona .....	58
	5-nitrobenzoxazolinona.....	58
	Arilidrazona de 2- benzoxazolinona.....	59
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60



## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estrutura do ácido Clorogênico.....	5
<b>Figura 2:</b> Oxidação do ácido clorogênico com a consequente produção de quinonas fungitóxicas.....	5
<b>Figura 3:</b> Estrutura da $\alpha$ -Tomatina.....	7
<b>Figura 4:</b> Estrutura da Avenacina.....	8
<b>Figura 5:</b> Estruturas de Tuliposídeos A e B.....	9
<b>Figura 6:</b> Estrutura de Floridizina e Floretina.....	10
<b>Figura 7:</b> (a) Hidrólise do glicosídeo cianogênico Linamarina com a consequente produção de glicose, acetona e cianeto de hidrogénio; (b) Mecanismo de desintoxicação do HCN, com a produção de formamida, através da acção da enzima formamida hidrolase, produzida por fungos que atacam as plantas cianogênicas.....	12
<b>Figura 8:</b> Mecanismo de geração de Fitoalexinas.....	16
<b>Figura 9:</b> Estrutura da Pisatina.....	16
<b>Figura 10:</b> Estrutura de algumas fitoalexinas.....	18
<b>Figura 11:</b> Estrutura de Éster do ácido Caféico com arabinosil 5-O-apigeninidina.....	20
<b>Figura 12:</b> Desintoxicação da fitoalexina Medicarpina por <i>Botrytis</i> sp. E <i>Collectrichum</i> sp....	22
<b>Figura 13:</b> Estrutura Química do Benzoxazol.....	23
<b>Figura 14:</b> Cromatografia de camada delgada de 2-BOA tida como padrão.....	44
<b>Figura 15:</b> Espectro Infravermelho de 2-BOA sintetizada com o uso de solvente tolueno.....	50

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Informação da cor dos produtos brutos sintetizados antes da recristalização.....	41
<b>Tabela 2:</b> Informação da cor dos produtos purificados sintetizados.....	42
<b>Tabela 3:</b> Valores das principais frequências de absorção no infravermelho de 2-BOA padrão.	44
<b>Tabela 4:</b> Informação dos reagentes e quantidades para a síntese de 2-BOA.....	46
<b>Tabela 5:</b> Informação do produto (2-BOA).....	47
<b>Tabela 6:</b> Informação dos reagentes e quantidades para a síntese de 5-nitrobenzoxazolinona...	47
<b>Tabela 7:</b> Informação do produto (5-nitrobenzoxazolinona.).....	48
<b>Tabela 8:</b> Informação dos reagentes e quantidades para a síntese da Arilhidrazona de 2-benzoxazolinona.....	48
<b>Tabela 9:</b> Informação do produto (Arlhidrazona de 2-benzoxazolinona).....	49
<b>Tabela 10:</b> Valores principais das frequências de absorção no Infravermelho do produto sintetizado (2-BOA).....	51
<b>Tabela 11:</b> Informação dos Análogos de fitoalexinas com base de benzoxazol sintetizadas.....	53
<b>Tabela 12:</b> Valores de índice de retenção (Rf) dos compostos sintetizados.....	55
<b>Tabela 13.</b> Valores principais das frequências de absorção no Infravermelho de 2-BOA padrão e do produto sintetizado (2-BOA).....	56

## Lista de Abreviaturas Usadas

**2-BOA:** 2-benzoxazolinona;

**DIBOA:** 2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona;

**DIMBOA:** 2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona;

**CCD:** Cromatografia em camada delgada;

**UV:** Ultravioleta;

**Rf:** Factor de retenção;

**P.f:** Ponto de fusão;

**h:** Hora;

**HCN:** Ácido cianídrico;

**°C:** Graus centígrados;

**PPA:** ácido polifosfórico.

## 1. INTRODUÇÃO

Hoje em dia a segurança alimentar para a população constitui uma das maiores preocupações do governo e da sociedade. Contudo, é um facto que, o crescente aumento populacional no país configura também um aumento cada vez maior da demanda por alimentos e conseqüentemente a necessidade premente de aumento da produção e produtividade agrícola de forma a garantir a segurança alimentar. A baixa produtividade das culturas constitui um dos principais constrangimentos para a agricultura em Moçambique. Esta baixa produtividade explica-se por vários factores dentro os quais pode-se destacar doenças causadas por fungos e bactérias.

Os microrganismos fitopatogênicos podem causar perdas de grande importância económica e até destruir completamente a produção de diversas culturas. Para mitigar os efeitos destes fungos e bactérias sobre a produção agrícola, tem-se recorrido à algumas medidas de controlo tal como o tratamento de sementes por aplicação de pesticidas ou por termo terapia através do uso de diferentes formas de calor (Stangarlin, **1999**).

A demanda mundial por alimentos isentos de agrotóxicos tem impulsionado a pesquisa para a busca de métodos alternativos ao controle de patógenos em plantas. A activação dos mecanismos de defesa com o uso de indutores vem demonstrando ser uma alternativa viável e promissora.

O problema do controlo destes microrganismos pode ser resolvido por elaboração e uso de novos meios da defesa das plantas que sejam economicamente e ambientalmente sustentáveis (Schwan-Estrada, **2000**).

As plantas possuem uma característica geral e sedentária que é o desenvolvimento no mesmo lugar onde ocorre a germinação. Esta característica faz com que a planta se limite do escape, o principal mecanismo de defesa na natureza, estando exposta a microrganismos ambos em baixo ou acima do solo uma vez que estão sujeitos à agentes bióticos (vírus, bactérias, fungos, insectos e outros), estão susceptíveis a acção de agentes abióticos (radiação ultravioleta, temperatura e humidade) e agentes antropogênicos (chuva ácida, efeito estufa e agressão pelo mau uso de agro-tóxicos). No entanto esta limitação tem sido compensada com outros mecanismos de defesa, como a comunicação com o seu redor, o qual permite detectar agentes que lhe podem ser prejudiciais ou limitando o crescimento e desenvolvimento de patógenos através de enzimas e estrutura reforçada ou ainda sintetizando fitoalexinas (Felipe Anton, **2009**).

## 2. METODOLOGIA APLICADA

### a) Revisão bibliográfica

A pesquisa bibliográfica consistiu basicamente na busca de informações sobre os factores de resistência bioquímicos pré e pós formados das plantas, métodos de síntese de benzoxazóis e seus derivados e sua aplicação no sector agrícola.

### b) Parte experimental

Para a realização do trabalho laboratorial, foi adoptada a seguinte metodologia:

- Síntese de 2-benzoxazolinona e 5-nitrobenzoxazolinona à partir de o-aminofenóis e ureia;
- Conversão de 2-benzoxazolinona em hidrazona de 2-benzoxazolinona;
- Purificação dos compostos sintetizados por recristalização;
- Determinação da pureza dos compostos sintetizados através da medição dos respectivos pontos de fusão e da cromatografia de camada fina;
- Confirmação da estrutura de 2-benzoxazolinona através de espectrofotometria no infravermelho;
- Elaboração do relatório final.

### 3. OBJECTIVOS DO TRABALHO

#### Objectivo geral

O objectivo deste trabalho de Licenciatura é de elaborar uma técnica de síntese de benzoxazóis e preparar 3 (três) análogos de 6-Metoxibenzoxazolinona como novos potenciais meios de protecção de plantas contra pragas.

#### Objectivos específicos

- Realizar o estudo sobre os factores de resistência bioquímicos pré e pós formados das plantas;
- Realizar um estudo sobre os métodos de síntese de benzoxazóis e seus derivados;
- Escolher e adoptar um método de síntese de fitoalexinas com base em benzoxazol.
- Sintetizar 2-benzoxazolinona, 5-nitrobenzoxazolinona usando solventes adequados, tolueno e n-butanol respectivamente;
- Sintetizar Arilhidrazona de 2-benzoxazolinona à partir de 2-benzoxazolinona, em solvente etanol.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Factores de resistência bioquímicos

Resistência é a capacidade da planta em impedir ou retardar a entrada e/ou subsequentes actividades do patógeno em seus tecidos (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

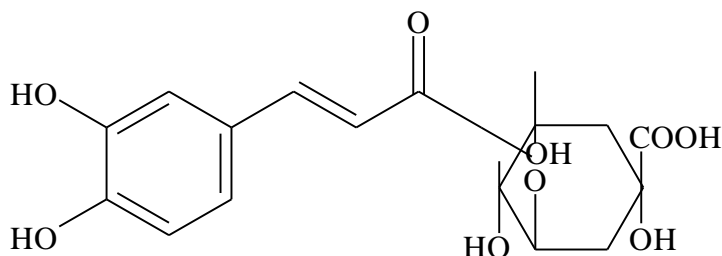
As reacções bioquímicas que ocorrem nas células do hospedeiro produzem substâncias que mostram-se tóxicas aos patógenos ou criam condições adversas para o crescimento do mesmo no interior da planta. Embora os mecanismos estruturais possam actuar, em diferentes níveis, na defesa das plantas contra alguns patógenos, pesquisas mostram que, na maior parte das interacções, são as substâncias produzidas nas células do hospedeiro, antes ou após a infecção, que contribuem significativamente para a resistência. Os factores bioquímicos de resistência podem ser subdivididos em **pré-formados** ou **pós-formados**, em função da chegada do patógeno nos tecidos da planta. De maneira geral, as substâncias pré ou pós-formadas, para contribuírem na resistência, devem estar presentes e/ou ser acumuladas em concentrações adequadas nas partes invadidas e em formas acessíveis ao patógeno. Além disso, alterações na concentração dessas substâncias devem ser correlacionadas com mudanças na expressão da doença (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

#### 4.1.1. Factores de resistência bioquímicos pré-formados

Inúmeras substâncias pré-formadas que exibem actividade antimicrobiana estão envolvidas na resistência das plantas contra fitopatógenos. Geralmente, essas substâncias estão presentes em altas concentrações nos tecidos sadios da planta e, em alguns casos, como resultado da infecção, podem ser convertidas em substâncias altamente tóxicas. Dentre as substâncias pré-formadas, cuja natureza química pode envolver, por exemplo, fenóis, alcalóides, lactonas, terpenóides e até mesmo, proteínas; pode-se citar ácido Clorogénico, ácido Protocatecólico e Catecol,  $\alpha$ -Tomatina, Avenacinas, Tuliposídeos, Glicosídeos Fenólicos, Glicosídeos Cianogénicos,  $\beta$ -1,3-Glucanases e Quitinases (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

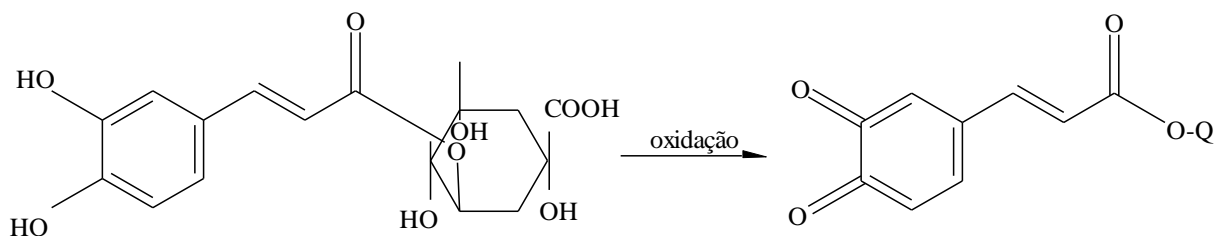
## Ácido clorogênico

O ácido Clorogênico (**figura 1**) é um composto fenólico caracterizado como um éster de ácido caféico e ácido quínico. É amplamente distribuído em diferentes partes de muitas plantas e, geralmente, ocorre nos tecidos em quantidades facilmente detectáveis (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).



**Figura 1:** Estrutura do ácido Clorogênico

Pode ser oxidado por enzimas do tipo polifenoloxidasas, usando  $O_2$  como receptor de electroes, dando origem a quinonas altamente tóxicas aos microrganismos (**figura 2**).



**Figura 2:** Oxidação do ácido clorogênico com a consequente produção de quinonas fungitóxicas.

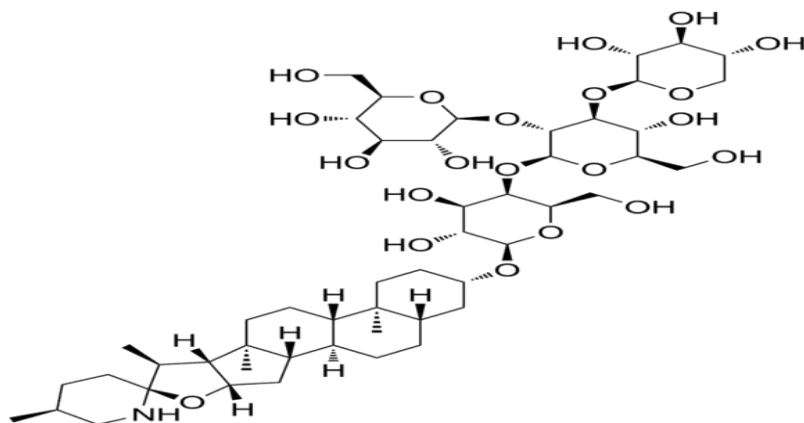
As quinonas actuam em processos enzimáticos vitais de fungos e bactérias, inibindo, por exemplo, a acção de fosforilases, desidrogenases, carboxilases e coenzimas. O ácido clorogênico pode também funcionar nas plantas como um intermediário metabólico na formação de compostos fenólicos insolúveis (lignina e polímeros semelhantes a lignina) associados com a resistência. Em função dessas características, o ácido clorogênico tem sido apontado como um composto importante na resistência das plantas contra fitopatógenos. Como exemplo clássico,



pode-se citar a resistência da batata contra *Verticillium albo-atrum*. O conteúdo de ácido clorogênico nas raízes de plantas de batata está directamente relacionado com a resistência a murcha de *Verticillium*. Os cultivares resistentes exibem maior concentração do ácido que os cultivares inicialmente resistentes, a medida que o conteúdo de ácido clorogênico diminuía nas raízes, em função da idade, o tecido começava a exibir um aumento na susceptibilidade (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

### **$\alpha$ -Tomatina**

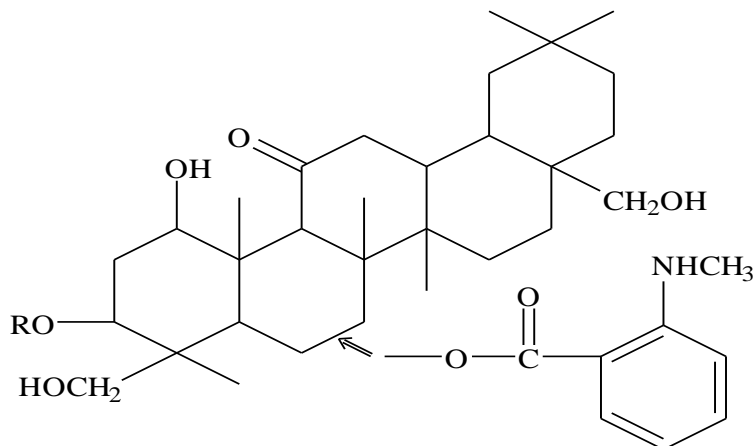
É um alcalóide glicosídico encontrado em plantas de tomate. Alcalóides são compostos aromáticos nitrogenados encontrados em muitas plantas, sendo que normalmente o átomo de nitrogénio localiza-se em um anel heterocíclico. A tomatina (**figura 3**) pode ser incluída no grupo das saponinas (glicosídeos contendo, por exemplo, agliconas do tipo alcalóide ou triterpenóide; provavelmente o maior grupo de compostos antifúngicos pré-formados), tem sido envolvida na resistência de tomates à *Corticium rolfsii*. O sítio de acção desse alcalóide envolve a membrana plasmática fúngica. Como as saponinas em geral, a tomatina reage com os esteróis da membrana, formando complexos insolúveis, facto que leva a alteração dos poros existentes na mesma. Em função dessa mudança irreversível na permeabilidade selectiva da membrana, o conteúdo celular extravasa para o meio externo, ocasionando a morte da célula fúngica. Alguns patógenos mostram-se pouco sensíveis ou mesmo insensíveis à tomatina, o que explica o sucesso dos mesmos como patógenos do tomateiro. A tomatina não exibe acção fungicida em pH menor ou igual a 4,5. Para ser efectiva o pH necessita ser maior ou igual a 6,0. Alguns dos patógenos causadores de podridão do fruto como, por exemplo, *Botrytis cinerea*, *C. Rolfsii* e *Monilinia fructigena*, podem diminuir o pH do meio, inibindo a acção desse alcalóide. Por outro lado, patógenos sensíveis a tomatina podem ser capazes de inactivar esse alcalóide. O fungo possui uma enzima extra-celular, constitutiva, que promove a hidrólise de glicose da molécula de tomatina, dando origem à tomatidina. Este último mostra-se inactivo e tem baixa solubilidade (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).



**Figura 3:** Estrutura da  $\alpha$ -Tomatina

### Avenacinas

A avenacina (**figura 4**) é uma saponina encontrada em plantas de Aveia. As plantas de aveia contêm dois tipos de saponinas. Nas raízes são encontradas as avenacinas (triterpenóides glicosídeos), enquanto que na parte aérea ocorrem os avenacosídeos (derivativos do furostanol). As avenacinas começaram a ser estudadas 40 anos atrás, em função do possível envolvimento na resistência de plantas de aveia a *Gaeumannomyces graminis*. Esse patógeno causa o mal-do-pé do trigo. Isolados os patógenos ao trigo (*G. Graminis* var. *Tritici*) não se mostram aptos a colonizar os tecidos de plantas de aveia. Entretanto, as raízes de plantas de aveia mostram-se susceptíveis ao *G. Graminis* var. *Avenae*. Estudos envolvendo o uso de extractos de raízes de aveia sobre o crescimento de vários fungos *in vitro* demonstraram que *G. Graminis* var. *tritici* era inibido enquanto que *G. Graminis* var. *avenae* crescia normalmente no meio. O extrato obtido a partir de um ápice de raiz, colocado em 2 mL de água, mostrava-se capaz de causar uma redução de 50% no crescimento de *G. Graminis* isolado do trigo. Esse princípio tóxico foi isolado e caracterizado quimicamente, sendo denominado de avenacinas, visto possuir quatro componentes (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).



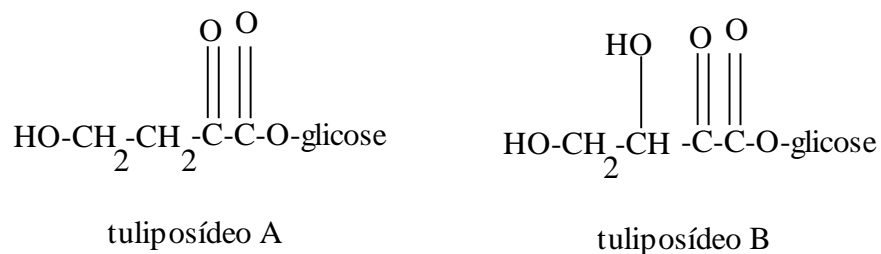
R= β-D-glicose.

**Figura 4:** Estrutura da Avenacina

A capacidade de *G. Graminis* var. *Avenae* mostrar-se insensível às avenacinas e colonizar os tecidos de aveia deve-se a produção, pelo fungo, de uma glicosidase extra celular, denominada de avenacinase, que efectua a remoção do açúcar terminal da cadeia de carboidrato dessas moléculas, dando origem às avenaminas, as quais não exibem actividade biológica inibitória. Assim a patogenicidade de *G. Graminis* var. *Avenae* em plantas de aveia é dependente da sua habilidade específica em hidrolisar os compostos tóxicos, através da acção da avenacinase, dando origem às agliconas inactivas (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

### Tuliposídeos

Tuliposídeos (**figura 5**) são ceto-hidroxi-ácidos ocorrendo como glicosídeos em tecidos de plantas de tulipa. Aparentemente, os tuliposídeos são armazenados nos vacúolos das células. Estes compostos mostram-se instáveis em pH maior que 5,0 e são fácil e rapidamente convertidos em lactonas insaturadas, em função de aumentos no pH (7,5) ou pela acção de β-glicosidases.

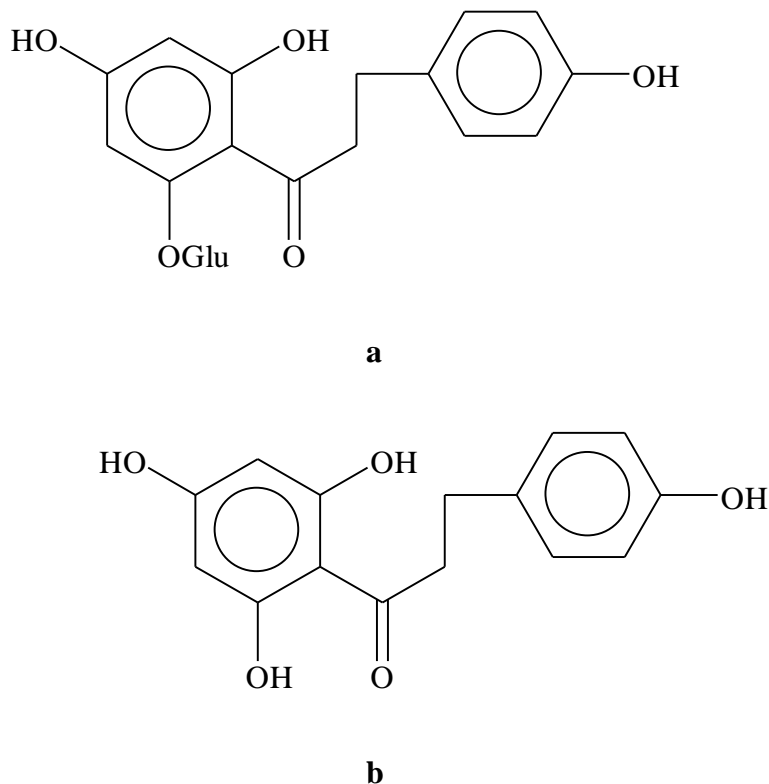


**Figura 5:** Estrutura dos Tuliposídeos A e B.

Os tuliposídeos mostram-se envolvidos na resistência de bulbos de tulipa a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Tulipae* e de pistilos a *Botrytis cinerea*. No caso de bulbos em desenvolvimento, estes são atacados por *Fusarium oxysporum* somente algumas semanas antes da colheita, mesmo que o bulbo-mãe plantado esteja infectado ou contaminado com conídeos. Durante esse curto período de susceptibilidade, a escama branca externa, que normalmente possui uma alta concentração de tuliposídeos e mostra-se resistente ao fungo, muda sua coloração para marrom palha e fica praticamente desprovida de substâncias antimicrobianas. Coincidentemente, as escamas brancas internas que mostram-se temporariamente susceptíveis à colonização pelo fungo, exibem um baixo conteúdo de tuliposídeos. Entretanto, alguns dias após colheita, a concentração de tuliposídeos aumenta rapidamente nas escamas brancas, que se tornam novamente resistentes à infecção (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

### Floridizina.

É um glicosídeo fenólico (**figura 6a**). A floridizina contribui na resistência de macieiras contra *Venturia inaequalis*, agente causal da sarna. Sob acção de  $\beta$ -glicosídeos, a floridizina origina a aglicona floretina. O glicosídeo fenólico bem como a sua aglicona (Floretina), através da acção de polifenoloxidasas, são oxidados e convertidos, via o-difenóis, em o-quinonasaltamente instáveis e fungitóxicas, a qual passam a exibir actividade antibacteriana (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).



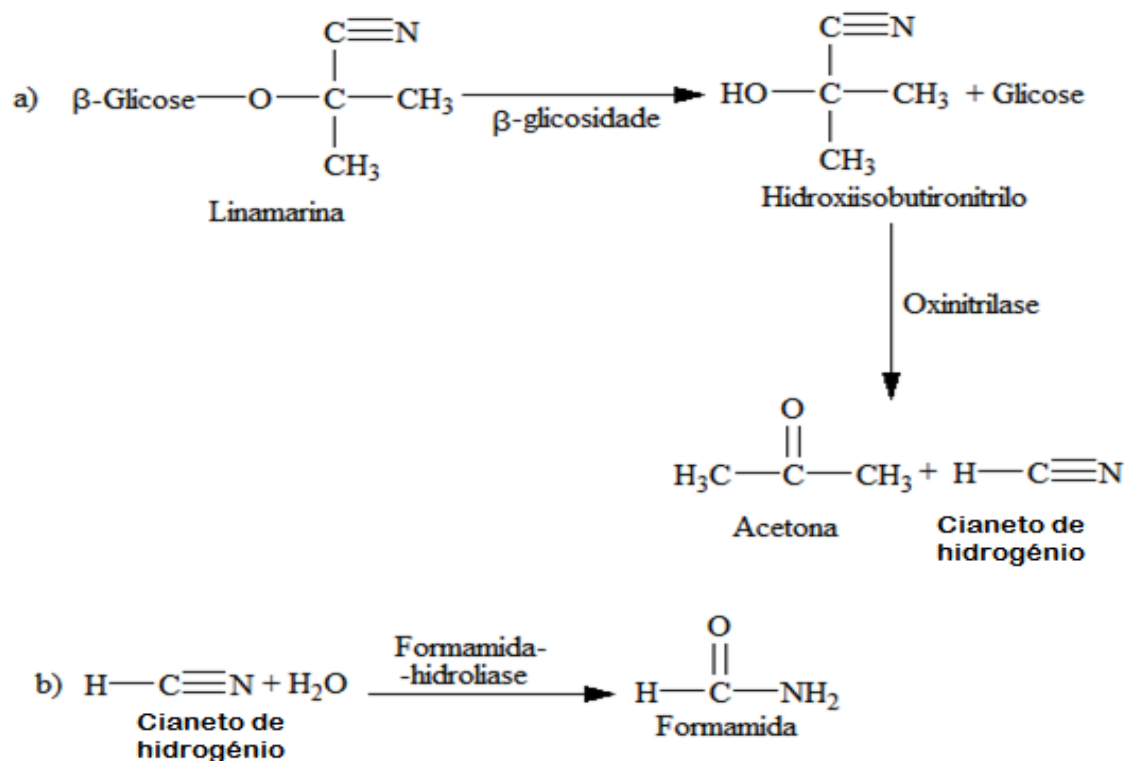
**Figura 6:** Estrutura de Floridizina (a) e Floretina (b)

## Glicosídeos cianogênicos

### Linamarina e Durina

Estes compostos são classificados como glicosídeos cianogênicos (*figura 7*). Os glicosídeos cianogênicos, de maneira geral, ocorrem em muitas espécies de plantas, sendo encontrados nas raízes, ramos, folhas, flores e frutos. São, aparentemente, armazenados no vacúolo das células. Em decorrência, os glicosídeos entram em contacto com as enzimas hidrolíticas como, por exemplo,  $\beta$ -glicosidase e oxinitrilase em plantas de trevo (*Lotus corniculatos*) contendo linamarina (*figura 7a*). O HCN libertado mostra-se altamente tóxico à maioria dos organismos e microrganismos devido a acção inibitória sobre enzimas contendo metal como co-factor, interferindo principalmente na cadeia respiratória. Vários estudos têm demonstrado liberação de HCN em plantas cianogênicas em resposta a infecção por fungos necrotróficos. Porém, com

relação ao papel dos glicosídeos cianogênicos, na resistência dessas plantas, não se observa uma correlação consistente entre o nível dos mesmos e a resistência a patógenos específicos. Suporte para a posterior contribuição dos glicosídeos na resistência é fornecido pela descoberta de patógenos fúngicos de plantas cianogênicas que são tolerantes ao HCN. Os patógenos produzem a enzima *formamida hidrolase*, que converte o HCN para a formamida não tóxica (**figura 7b**). No caso de plantas de sorgo, quando as folhas dessa gramínea são inoculadas com *Gloeosporium sorghi*, observa-se um aumento de aproximadamente 20 vezes de actividade de  $\beta$ -glicosidase durante as primeiras 24 horas, actividade esta permanece elevada e constante por 72 horas. Esse aumento na actividade enzimática é correlacionado com a elevação do conteúdo de HCN no tecido foliar da planta. Por sua vez, nas primeiras 18 horas após a inoculação, a actividade da formamida hidrolase produzida pelo patógeno começa a se elevar nos tecidos atingindo, 36 horas mais tarde, um valor 200 vezes maior do que o valor inicial. Em função desse aumento na actividade da formamida hidrolase, pode-se observar o acúmulo de formamida nos tecidos da planta, o que evidencia a capacidade do fungo em inactivar o HCN e colonizar o hospedeiro (Nicholson & Hammerschmidt, **1992**).



**Figura 7:** (a) Hidrólise do glicosídeo cianogénico linamarina com a consequente produção de glicose, acetona e cianeto de hidrogénio; (b) Mecanismo de desintoxicação do HCN, com a produção de formamida, através da acção da enzima formamida hidrolase, produzida por fungos que atacam as plantas cianogénicas.

## Inibidores proteicos

### Quitinases e $\beta$ -1,3-glucanases

São enzimas líticas que hidrolisam a quitina (a um polímero acetilglucosamina) e as  $\beta$ -1,3-glucanas, respectivamente. Essas hidrolases ocorrem normalmente nas plantas (flores, folhas, raízes) e podem estar envolvidas na defesa da mesma contra fungos, uma vez que os polímeros acima mostram-se como os principais constituintes da parede celular fúngica. Além disso, a actividade dessas enzimas também pode ser elevada nos tecidos vegetais em resposta a infecção

e tratamentos hormonais (etileno) e químicos (metais pesados). As quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases são agrupadas dentre as “proteínas relacionadas a patogénese” (proteínas-RP) e exibem formas ácidas e básicas. As formas básicas ocorrem, de modo geral, intra celularmente (nos vacuólos) e as ácidas, extra celularmente (nos espaços intercelulares). Vários trabalhos indicam que as formas extra celulares possuem uma função imediata na defesa das plantas, com acção directa sobre as hifas invasoras (acção fúngica). Esta acção provoca a liberação de elicitores oligossacarídicos a partir de paredes fúngicas, os quais podem levar a activação de outros mecanismos locais sistémicos de resistência nas plantas. As formas intracelulares parecem actuar tardiamente nas reacções de defesa das plantas. As quitinases mostram-se importantes na resistência de *Stylosanthes guianensis* a *Colletotrichum gloeosporio* enquanto que o aumento na actividade total da  $\beta$ -1,3-glucanase em milho correlacionado com a expressão da resistência dos tecidos a *Exserohilum turci*. Essas hidrolases parecem, também, actuar em tecidos de ervas contra fungos invasores (Linthorst, 1991).

#### 4.1.2. Factores de resistência bioquímicos pós-formados

Os factores bioquímicos pós-formados mostram-se ausentes ou estão presentes em baixos níveis nas plantas antes da infecção. São produzidos ou activados em resposta a presença de patógenos. Por uma questão didáctica, são incluídas nesta categoria apenas substâncias sintetizadas à partir de precursores remotos após infecção, como as fitoalexinas. Substâncias do tipo glicosídeos fenólicos, cianogénicos e enzimas hidrolíticas (põe exemplo, quitinases e 1,3-glucanases), que são simplesmente activadas ou exibem aumento na actividade após a infecção, são colocadas na categoria de factores de resistência bioquímica pré-formados (Paxton, 1981).



## 4.2.Fitoalexinas

- **O mecanismo de defesa das plantas**

São definidas como compostos antimicrobianos de baixo peso molecular que são sintetizados pelas plantas e que se acumulam nas células vegetais em resposta a infecção microbiana. Estes compostos são produzidos em função de estímulos (Paxton, **1981**).

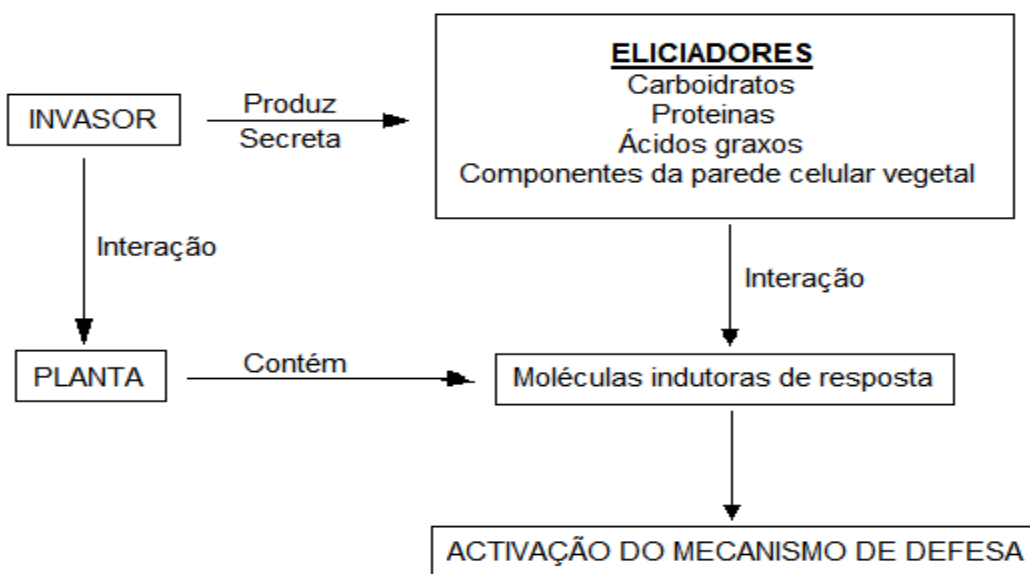
Por serem organismos sedentários representam um substrato extremamente atractivo para o desenvolvimento de patógenos, que pode comprometer seu desenvolvimento normal causando inclusive a sua morte. A ideia de que as plantas possuem um sistema de defesa semelhante ao sistema imunológico dos animais bastante antiga, tendo surgido no final do século IX. Entretanto, evidências de que elas respondem ao ataque de microrganismos, alterando seu metabolismo e sintetizando substâncias capazes de protegê-las de doenças, só foram obtidas por volta de 1940. Estas substâncias foram denominadas de fitoalexinas (do grego *phyton* = planta e *alexin* = composto que repele) e sua descoberta causou profundas mudanças no conceito de resistência de plantas à patógenos.<sup>1</sup>

As estratégias de defesa também podem ser físicas. Os tipos de barreiras físicas podem ser: Espinhos e pêlos, ceras nas superfícies dos órgãos, espessura e dureza da cutícula e da parede externa das células epidérmicas, etc.<sup>1</sup>

Acredita-se que a maioria das plantas sejam capazes de sintetizar fitoalexinas, mas algumas a fazem de maneira muito lenta, permitindo que o microorganismo complete a infecção antes que haja acúmulo dessas substâncias em quantidades suficientes para inibi-lo. Isso significa que a velocidade de acúmulo das fitoalexinas é um dos factores decisivos para o estabelecimento ou não da infecção na planta. Por outro lado, algumas espécies conhecidas não produzem fitoalexinas, como é o caso do café, já possuem naturalmente outras substâncias de defesa e que são suficientes para impedir o ataque de patógenos. Isto indica que a produção de fitoalexinas parece ter sido seleccionada como principal estratégia de defesa apenas de algumas plantas, sendo outros mecanismos de resistência encontrados em plantas que não acumulam fitoalexinas (Harborne, **1999**).

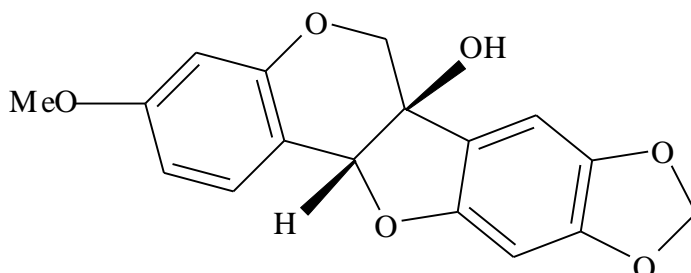
Durante a tentativa de infecção da planta por um patógeno, o estímulo para a síntese de fitoalexinas provém do microrganismo invasor e normalmente é representado por moléculas, sinais liberadas ou secretadas por ele. Essas moléculas usualmente fazem parte da estrutura do próprio microrganismo e são conhecidas como *elicitores* os quais podem ser de origem microbiana (elicitor exógeno) ou da própria planta (elicitor endógeno). Quimicamente, os elicitores bióticos são formados, de modo geral, por moléculas complexas, englobando carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, enzimas ou lípidos. Os elicitores de origem microbiana podem ser compostos estruturais intáctas ou partes de fungos, células bacterianas, partículas virais, homogenatos livres de células, etc. No caso dos elicitores endógenos, os mesmos são formados por fragmentos de material constituinte da parede celular da planta, os quais são liberados pela acção de enzimas degradadoras da parede. As fitoalexinas podem também acumular-se nos tecidos em resposta a elicitores abióticos, como luz ultravioleta ou metal pesado ( $\text{HgCl}_2$ ), os quais normalmente causam alguma forma de stress nas plantas.

Apesar de cerca de 300 fitoalexinas já terem sido isoladas, menos de 1% das plantas foram estudadas quanto à capacidade de produção de fitoalexinas, sendo em sua maioria espécies cultivadas pelo homem. Assim, o estudo da síntese de fitoalexinas, especialmente em espécies nativas de ambientes tropicais, abre enormes possibilidades para a descoberta de substâncias naturais com actividade antimicrobiana, que possam ser utilizadas como fungicidas naturais ou ainda cuja estrutura possa servir como modelo para a síntese química de novos defensivos agrícolas. A análise da produção dessas substâncias de defesa representa uma oportunidade única de estudar eventos metabólicos e novas rotas de biossíntese e de compreender como os vegetais, que são organismos sedentários, sobrevivem em um ambiente altamente competitivo e resistem ao ataque de microrganismos causadores de doenças (Hahn, 1996).



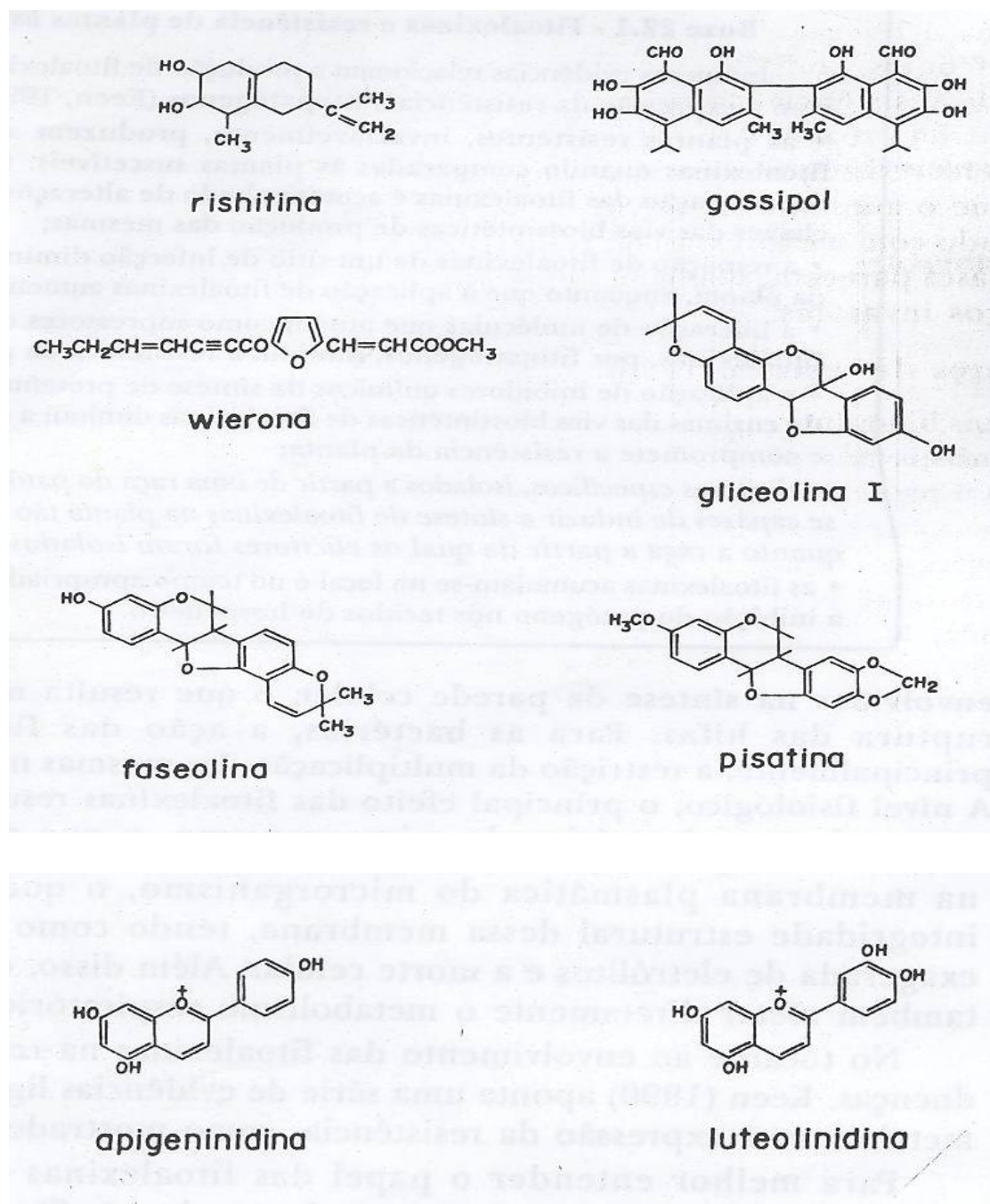
**Figura 8:** Mecanismo de geração de Fitoalexinas<sup>1</sup>.

A acção desses compostos de resistência de plantas à fitopatógenos tem sido estudada através de experimentos envolvendo tubérculos de batata e raças de *Phytophthora*. A primeira fitoalexina caracterizada quimicamente foi a pisatina, isolada de plantas de ervilha (*Pisum sativum*) (**figura 9**), permanecendo até hoje como uma das fitoalexinas mais estudadas. Desde a sua descoberta, diversas outras fitoalexinas têm sido obtidas de plantas cultivadas como feijão, soja, ervilha, batata, tomate, alface, algodão, arroz, cevada e banana (Cruichshank & Perrin, 1960).



**Figura 9:** Estrutura da Pisatina

Hoje, um grande número de fitoalexinas já foi caracterizado e muitas estruturas químicas diferentes determinadas, à partir de plantas de mais de 20 famílias (por exemplo, Leguminosae, Solanaceae, Orchidaceae) envolvendo desde árvores até arbustos. Esses compostos foram isolados principalmente, de dicotiledóneas (50% deles à partir de leguminosas). Das monocotiledóneas até o presente, foram identificadas fitoalexinas somente de plantas de aveia, arroz, cana-de-açúcar e sorgo. Quimicamente, a fitoalexina mais simples è o ácido benzóico, formado em macieira, em resposta a infecção por *Nectria galligena*. As fitoalexinas pertencem a diferentes classes químicas que incluem fenóis do tipo flavonoide (pisatina, faseolina, gliceolina, luteolodina e apigeninidina), poliacetilenos (wierona) e isoprenos, incluindo terpenóides (rishitina e gossipol) e esteróides (*figura 10*).



**Figura 10:** Estrutura de algumas fitoalexinas.

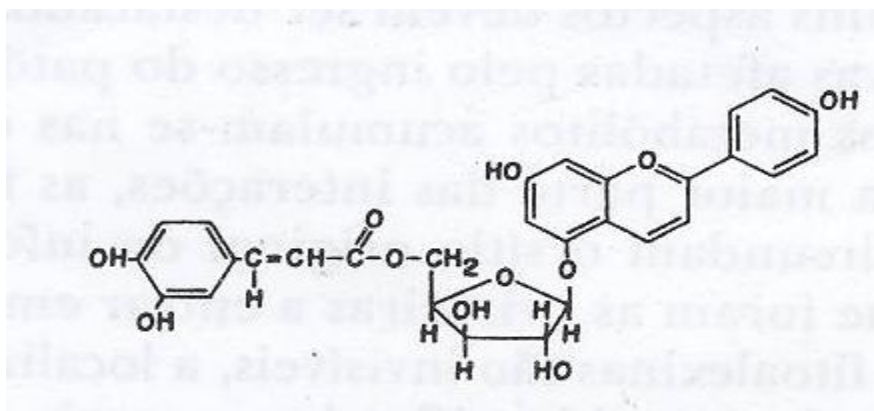
#### 4.2.1. Fitoalexinas e resistência de plantas às doenças

Inúmeras evidências relacionam a produção de fitoalexinas em plantas com expressão da resistência à fitopatógenos (Keen, 1990):

- As plantas resistentes, invariavelmente, produzem altos níveis de fitoalexinas quando comparadas à plantas susceptíveis. O aumento na concentração das fitoalexinas é acompanhado de alterações nas enzimas-chaves das vias biossintéticas da produção das mesmas;
- A remoção de fitoalexinas de um sítio de infecção diminui a resistência da planta, enquanto que a aplicação de fitoalexina aumenta a resistência;
- A liberação de moléculas que actuam como supressores da produção de fitoalexinas, por fitopatógenos, diminui a resistência da planta;
- A aplicação de inibidores químicos da síntese de proteínas ou inibidores de enzimas das vias biossintéticas de fitoalexinas diminui a produção destas e compromete a resistência da planta;
- Elicitores específicos, isolados a partir de uma raça do patógeno, mostram-se capazes de induzir a síntese de fitoalexinas na planta de uma forma eficiente;
- As fitoalexinas acumulam-se no local e no tempo apropriados para causar inibição do patógeno nos tecidos do hospedeiro.

#### 4.2.2. Papel das Fitoalexinas na interacção Planta-Patógeno

Para melhor entender o papel das fitoalexinas nas interacções planta-patógeno, alguns aspectos devem ser destacados. As fitoalexinas são sintetizadas nas células vivas afectadas pelo ingresso do patógeno, e a medida que a doença progride, esses metabolitos acumulam-se nas células mortas ou nas que estão morrendo. Na maior parte das interacções, as fitoalexinas são encontradas nos tecidos que circundam o sítio original de infecção, mas não necessariamente nas células que foram as primeiras a entrar em contacto com o patógeno. Como a maioria das fitoalexinas são invisíveis, a localização celular das mesmas mostra-se difícil. Fitoalexinas identificadas à partir de tecidos de plantas de sorgo, são flavónoides da classe da deoxiantocianidinas e incluem luteolinidina, apigeninidina e um éster do ácido caféico com arabinosil 5-o-apigeninidina (**figura 11**) (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).



**Figura 11:** Estrutura de Éster do ácido caféico com arabinosil 5-O-apigeninidina

Através de bioensaios *in vitro*, esses metabolitos mostraram-se altamente inibitório à *Colletotonia graminicola*, agente causal da antracnose do sorgo, em concentrações menores que 9  $\mu\text{M}$ . Como essas fitoalexinas são coloridas, o acúmulo das mesmas pode ser visualizado no interior de uma das três células em folhas vivas de sorgo, o que corresponde a uma área de aproximadamente 2300  $\mu\text{m}^2$ . Essas fitoalexinas seguem um padrão específico de acúmulo no interior das células individuais, associadas ao sítio de infecção. Por exemplo, quando *C. Graminicola* era colocado nos tecidos, a formação dos opressores estava completa 20 horas após inoculação. Logo após formação de opressório, vesículas (inclusões) incolores (inicialmente menores que 1  $\mu\text{m}$  em diâmetro) apareciam no citoplasma da célula sob ataque e começavam a

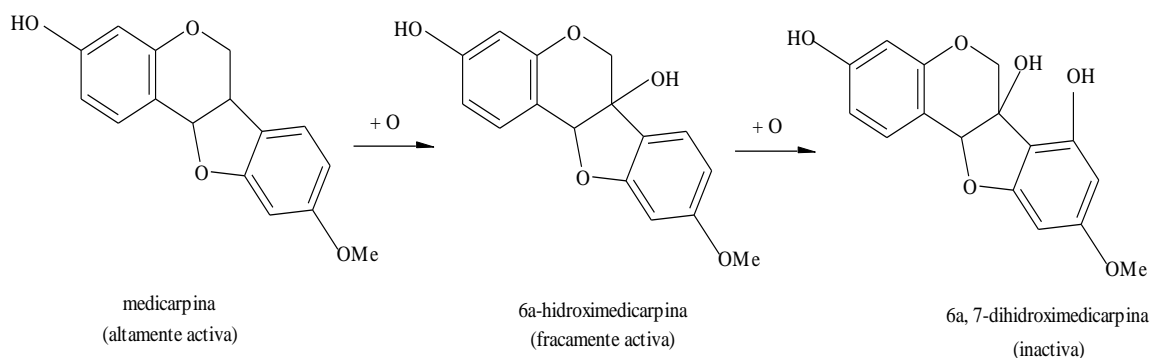
coalescer (chegando a atingir diâmetros em torno de 15-20  $\mu\text{m}$ ) e a locomover-se em direcção ao ponto de adesão do opressório. Durante esse processo, as vesículas passavam a exibir uma coloração vermelha intensa, que corresponde a pigmentação de uma mistura dessas fitoalexinas. A seguir, essas inclusões estouravam, liberando o conteúdo no interior do citoplasma da célula da planta, o que resultava na morte da célula. Além disso, as fitoalexinas também extravasavam para o exterior da célula, entrando em contacto com o opressório e matando o fungo. Esses eventos ocorriam de maneira sincronizada e requeriam apenas 5 a 8 horas após a formação de um opressório maduro no tecido do hospedeiro. Análises microespectrofotométricas indicaram que a concentração das fitoalexinas no interior das vesículas mostrava-se ao redor de 150 mM, e que o acúmulo tem uma única célula individual que podia chegar ao nível de ng. Essas concentrações dentro de uma única célula sob ataque do patógeno excedem aquelas necessárias para a inibição do crescimento do fungo *in vitro* (Nicholson & Hammerschmidt, **1992**).

As observações acima demonstraram que a síntese de fitoalexinas em sorgo ocorre antes da morte celular, que a mesma ocorre primeiramente no sítio de penetração e que as concentrações dos metabólitos excedem aquelas necessárias a inibição do fungo. Finalmente, com base no aparecimento das vesículas nos tecidos de sorgo e na mudança de coloração das mesmas, pode-se concluir que a síntese das fitoalexinas ocorre no interior das vesículas, a medida que as mesmas se movem em direcção ao sítio de adesão do opressório. Dessa maneira, as enzimas e os substratos necessários a síntese das fitoalexinas estarão empacotados no interior das inclusões, o que pode sugerir uma maneira a qual a célula do hospedeiro evitaria o contacto com as fitoalexinas tóxicas que ela mesma produz (Nicholson & Hammerschmidt, **1992**).

A importância das fitoalexinas na resistência de plantas à patógenos pode também ser evidenciada pela habilidade do parasita em inactivar esses compostos a medida que o mesmo coloniza o hospedeiro. Inúmeras evidências apontam para a capacidade dos patógenos, principalmente fungos necrotóficos em transformar as fitoalexinas em substâncias com menor ou nenhuma acção tóxica. Vários mecanismos podem estar envolvidos no processo. No caso de fitoalexinas do tipo isoflavonóides, por exemplo, hidroxilação e a dimetilação simultânea aumentam a solubilidade desses compostos em água e tornam os anéis aromáticos mais susceptíveis à quebra oxidativa, com a eventual produção de fitoalexina medicarpina, produzida em trevo (“sweet-clover”), e um metabolizado pelo fungo *Botrytis cinerea* como mostrado na



**figura 12.** Essa fitoalexina exibe elevada actividade antifúngica. O produto de metilação fúngica 6a-hidroxicarpina, porém, exibe baixa actividade antifúngica. Uma segunda oxidação, a qual é efectuada por *Colletotrichum coffea* mas não por *Botrytis*, produz o metabólito 6a,7-dihidroxicarpina, desprovida de propriedades fungitóxicas (Nicholson & Hammerschmidt, 1992).

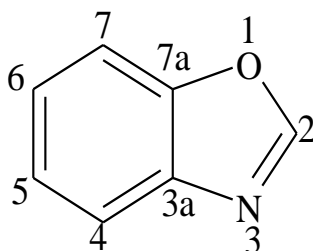


**Figura 12:** Desintoxicação da fitoalexina Medicarpina por *Botrytis* sp. E *Collectrichum* sp. (adaptado de Harborne, 1988).

### 4.3.BENZOXAZÓIS

**Benzoxazol** é um composto orgânico aromático com a fórmula molecular  $C_7H_5NO$ .

Sendo um composto heterocíclico, encontra o uso na pesquisa como uma matéria-prima para a síntese de estruturas bioactivas. Ele é encontrado dentro da estrutura química de fármacos (René Milcent, 2003).



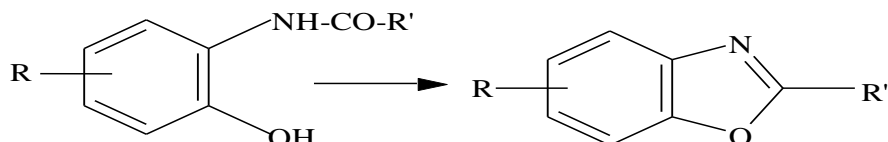
**Figura 13:** Estrutura Química do Benzoxazol.

Propriedades do benzoxazol	
Fórmula molecular	$C_7H_5NO$
Massa molar	$119,12 \text{ g mol}^{-1}$
Aparência	Branco à luz contínua amarela
Ponto de fusão	$27-30 \text{ }^\circ\text{C}$

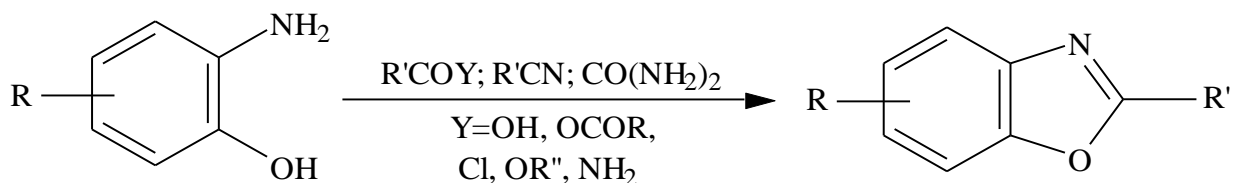
### 4.3.1. Métodos de síntese de Benzoxazóis

- *À partir de o-aminofenol ou o-, m-cloroanilina.*

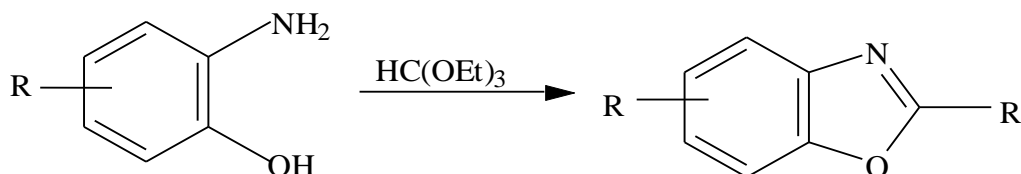
O método mais comum para a síntese de Benzoxazóis é a desidratação ciclizante de o-acilaminofenóis (René Milcent, 2003).



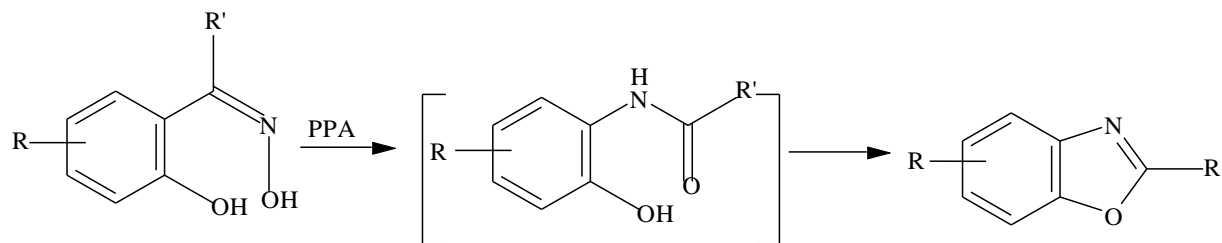
Em muitos casos, simplesmente o o-aminofenol é aquecido com o anidrido de ácido, ureia, cloreto de ácido, com um éster, um nitrilo ou uma amida (René Milcent, 2003).



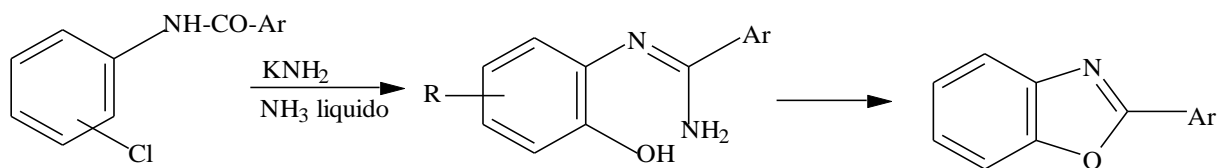
O o-aminofenol também reage com ortoformiato etílico quente, na presença de resinas de troca iônica na formação da benzoxazóis (René Milcent, 2003).



Duas reações podem estar relacionadas a esta síntese. O primeiro é fazer um rearranjo de Beckmann de oximas de o-hidroxibenzofenonas, que fornece um primeiro o-fenol (N-aroilamino), que é então seco (René Milcent, 2003).

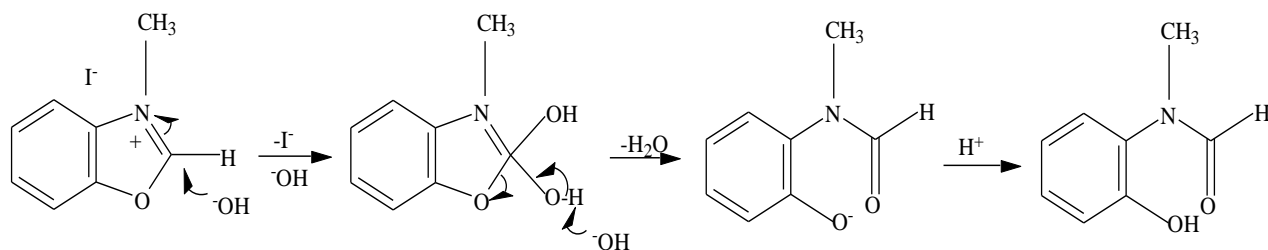


Em segundo lugar, consiste em tratar uma N-benzoil o- (ou m-) cloroanilina com uma amida de potássio em amoníaco líquido. Foi demonstrado o produto intermediário, é uma amidina, e o produto foi isolado (René Milcent, **2003**).



#### 4.3.2. Acção de reagentes nucleofílicos

A acção de bases e iões alcóxidos no benzoxazol à frio não levam a abertura do anel. Os sais quaternários resultantes da acção de halogenetos de alquil são facilmente abertos, na presença de sódio ou de potássio. Quanto ao 1,3-azóis correspondentes, o hidrogênio localizado nesta posição é ácido e facilmente atacado nessas reacções. Uma adição destes resulta na abertura do eterociclo e na produção de N-alkilformamidafenól. A hidrólise requer duas mole de hidróxido alcalino (René Milcent, **2003**).

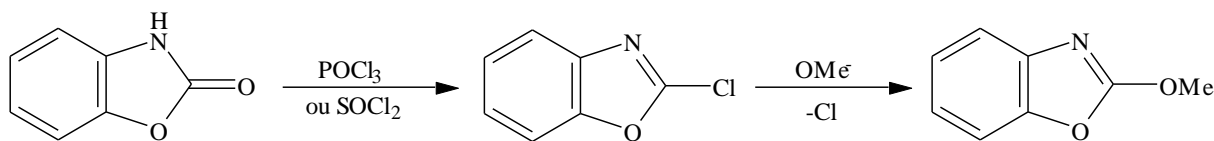


### 4.3.3. Propriedades

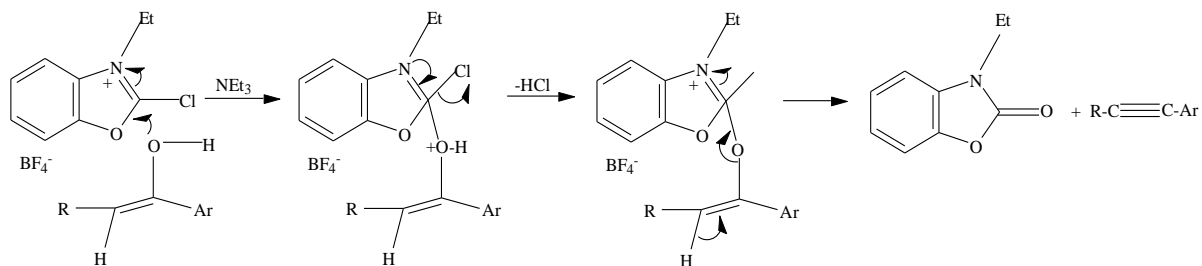
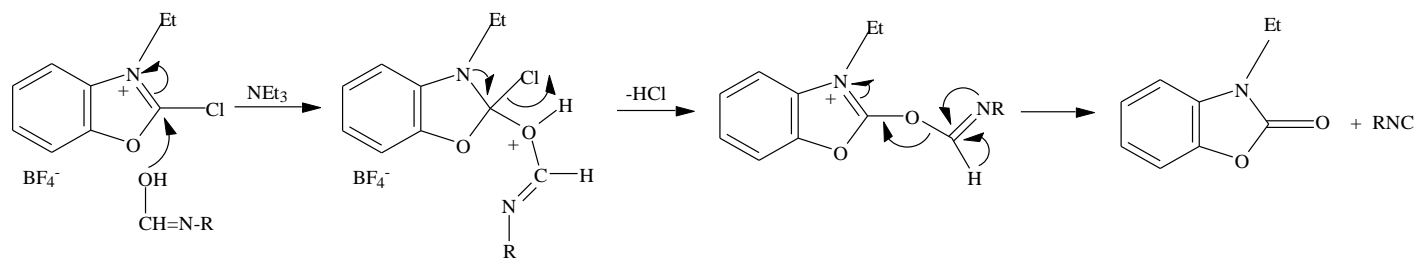
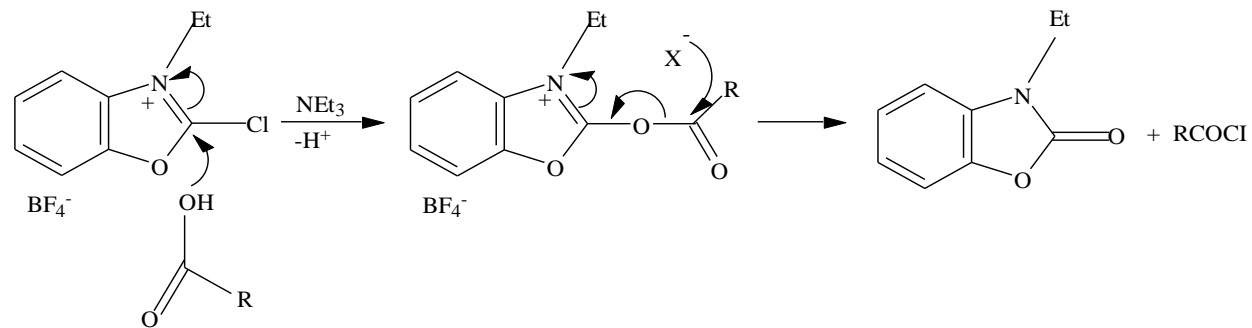
#### 4.3.3.1. Propriedades do grupo halogéneo na posição 2.

Os halogéneos no C-2, favorecem o ataque de reacções nucleofílicas sobre este carbono.

Os derivados clorados na posição 2 dos benzoxazóis são obtidos à partir benzoxazolinonas ou por ação do oxiclureto de fósforo ou ainda clureto de tionilo. O 2-clorobenzoxazol origina 2-metoxi-benzoxazol na presença de metóxido de sódio (René Milcent, **2003**).

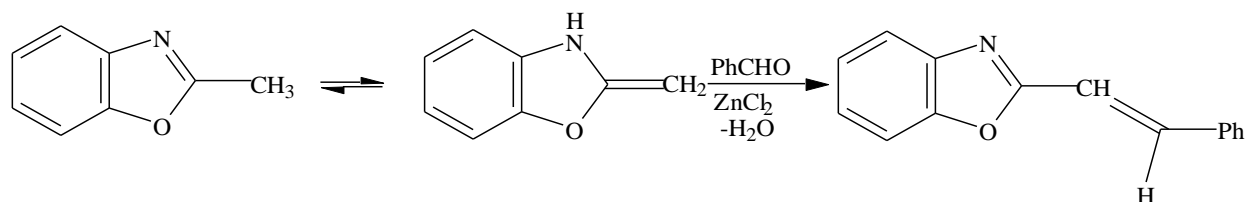


No caso do tetrafluoroborato de N-alkil-2 clorobenzoxazol, a reatividade do cloro é particularmente elevada. Esta propriedade permite a desidratação de arilalkilcetonas, levando à alcinos (A) e um 3-alkilbenzoxazolona (B), ou amidas com a formação de isonitrilo (C). Esta reacção também pode activar os ácidos, transformando-os em cluretos de ácido (E) (René Milcent, **2003**).

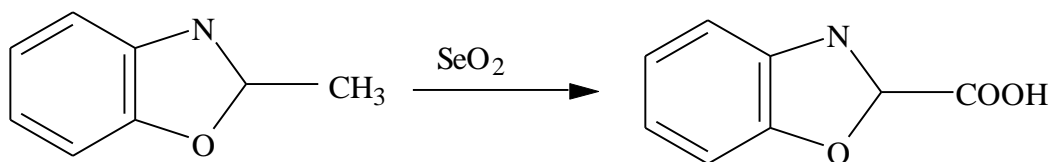
**A****B e C****E**

#### 4.3.3.2. Propriedades do grupo alquil na posição 2

O 2-metilbenzoxazol se condensa com o benzaldeído na presença de cloreto de zinco, na produção de 2-stirilbenzoxazol, via forma tautomérica (René Milcent, 2003).

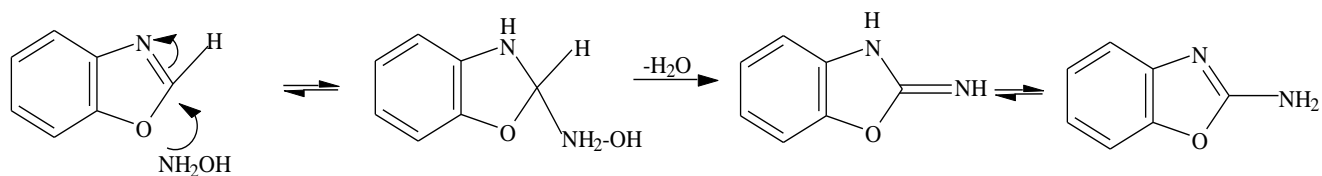


Os 2-metilbenzoxazóis são oxidados por óxido de selênio em ácido benzoxazol-2-carboxílico (René Milcent, 2003).



#### 4.3.3.3. Substituição nucleofílica do hidrogênio na posição 2

A substituição nucleofílica no ciclo oxazólico é muitas vezes desenvolvida. No entanto, o 2-aminobenzoxazol pode ser preparado à partir de benzoxazolinona por acção de hidroxilamina (René Milcent, 2003).



As primeiras moléculas de benzoxazóis foram descobertas em plantas de centeio, verificando-se a relação de resistência das plantas à infecção por fungos, são encontrados, geralmente, nas gramíneas (milho, centeio, trigo, *Triticum secale* e cevada) e praticamente em todas as partes da planta, menos nos exsudados do xilema, no líquido de gutação e nas sementes (Niemeyer, **1988**). Em geral, estes compostos são ausentes nos grãos, surgindo, na forma glicosídica, na germinação das plântulas (milho, trigo e centeio) e aumentando a sua concentração até nível máximo em poucos dias após sua germinação, diminuindo com o passar do tempo (Niemeyer, **1988**).

Os compostos do grupo dos benzoxazóis, normalmente, não causam prejuízos às plantas que os sintetizam, pois estes compostos se encontram na forma de glicosídeos e, assim, não são fitotóxicos. A toxicidade, principalmente para os organismos externos, se inicia quando ocorre dano nas células da planta e a enzima (benzoxazone glicosidase) que promove a hidrólise do glicosídeo é liberada de sua compartimentalização. Ocorre, então, a separação da glicose e benzoxazinona, esta última por possuir grande toxicidade, exerce a função de protecção à planta (Nair et al., **1990**).

#### **4.4. Aplicação dos Benzoxazóis no sector agrícola**

- A sua principal utilização é na defesa das plantas contra fungos, tais como, *Fusarium nivale*, contra bactérias, como *Ostrinia nubilalis*, *Staphylococcus aureatus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* e pulgão do trigo (*Metopolophim dirhodum*) (Nair et al., **1990**). Exercem um efeito tóxico para numerosas larvas nos cereais. Por exemplo, as larvas de *Ostrinia nubilalis*, género asiático Lepidoptera, demoram muito mais tempo para atingir o núcleo da planta quando seus tecidos segregam DIMBOA. Além disso, a presença de DIMBOA parece diminuir seu apetite (Grombacher & al., **1989**).
- Os benzoxazóis se apresentam como excelentes candidatos para sua utilização como herbicidas. Além disso, algumas dessas moléculas mostram uma relativa selectividade. Assim, DIBOA é uma molécula particularmente activa para as monocotiledôneas, enquanto que BOA é para as dicotiledôneas (Barnes & Putnam, **1987**).



Estudos realizados concluíram que BOA e DIBOA inibem a germinação das espécies de sementes pequenas como *Amaranthus palmeri*, *Digitaria sanguinalis*, *Equinochloe indica*, *Lactuca sativa* e *Lycopersicum esculentum* (Burgos et al. **1999**).

Contudo estudos mostram que nem todo o tipo de herbicidas é favorável a produção de fitoalexinas, nestes casos levam à inibição na geração destas. Como exemplo temos a aplicação de um herbicida (glifosato) em cultivares de soja. Neste caso este herbicida torna-se sensível ao fungo *Phytophthora megasperma* que por sua vez origina doença à planta em 48 horas (Alves, **2001**).

Quanto à sua acção fitotóxica contra algumas culturas e plantas daninhas, se requerem alguns pré-requisitos para manifestação destes efeitos. Para além de certos parâmetros do solo, abióticos e clima também é necessária uma predisposição genética da espécie, uma vez que estes compostos devem estar presentes em quantidade suficiente. Em pequenas quantidades não têm nenhum efeito inibitório, pois à baixas concentrações são rapidamente degradadas por microrganismos à 2-aminofenol e outros derivados, ou são absorvidos pelas partículas do solo. O controlo de plantas daninhas por benzoxazolinonas é unicamente possível quando as plantas respondem a compostos com a viabilidade reduzida, que finalmente resultará em ferimentos graves e morte da planta (Gierle & Frey, **2001**).

#### 4.5. Modo de acção dos compostos fenólicos

O modo de acção dos compostos fenólicos na resistência de plantas contra agressões de múltiplos microrganismos, podem ser antimicrobianos directos ou indirectos.

Nos efeitos directos, os fenóis manifestam uma acção inibidora sobre a actividade das enzimas hidrológicas dos microrganismos, como as pectinases, celulasas e proteases; podem também inibir a produção de enzimas hidrolíticas e a biossíntese de toxinas parasitárias; causam inibições a nível da cadeia de transporte de electrões na biossíntese de ARN e ADN (Scalbert, **1992**); afectam a síntese de proteínas e ácidos nucleicos diminuindo a incorporação de aminoácidos (Baziramakenga et al., **1997**).

Nos efeitos indirectos os fenóis por oxidação se transformam em produtos muito tóxicos. A oxidação de compostos fenólicos, particularmente dos orto-difenóis, por acção de polifenoloxidasas e peroxidases produz orto-quinonas muito tóxicas para inúmeros organismos. Estas orto-quinonas podem polimerizar-se originando produtos ainda mais tóxicos que são as melaninas que aparecem como forma de pigmentos escuros no interior das células.

Entre os efeitos secundários se encontram a redução da fotossíntese e metabolismo do carbono; aumento de níveis de ácido abscísico; redução da transpiração etc. (Blum & Rebbeck, **1989**).

#### 4.6. Determinação do ponto de fusão como critério de pureza <sup>[2]</sup>

No processo de identificação sistemática de compostos orgânicos a determinação das constantes físicas, tais como, ponto de fusão e ponto de ebulição constitui um passo primordial, pois não só fornece informações úteis na caracterização de um composto bem como pode ser fundamental na avaliação do grau de pureza do mesmo. Um ponto de fusão nítido é uma evidência de pureza da amostra.

Embora sejam envidados todos os esforços para que as amostras dos compostos fornecidos tenham elevado grau de pureza, deve-se ter em consciência de que muitas substâncias orgânicas decompõem-se ou reagem com o oxigênio, com a humidade ou com o dióxido de carbono quando estocadas durante muito tempo. Estas substâncias terão um amplo intervalo de fusão ou ebulição, frequentemente mais baixo que os valores tabelados. Por isso, no trabalho de identificação de uma *amostra desconhecida*, deve-se fazer uma determinação preliminar do seu ponto de fusão ou de ebulição.

A propriedade de uma substância orgânica sólida que é mais frequentemente usada como critério de pureza é o ponto de fusão. O ponto de fusão de uma substância corresponde ao intervalo de temperatura em que a fase sólida se transforma na líquida. Posto que frequentemente acompanhado por decomposição, o ponto de fusão pode não corresponder a uma temperatura de equilíbrio, mas a uma temperatura de transição de sólido para líquido. A maioria dos compostos orgânicos funde abaixo de

350°C. Quando o ensaio de pirólise (teste de ignição) indica que o sólido funde com facilidade (entre 25 à 300°C), o ponto de fusão pode ser determinado pelo método do tubo capilar. No caso de intervalos mais elevados (de 300 à 500°C), usa-se equipamento especial. Os compostos que fundem entre 0 e 25°C podem ser analisados pelo método do ponto de cristalização.

Na teoria, o ponto de fusão de um sólido puro deve ocorrer sempre à mesma temperatura. Na prática, entretanto, equilíbrio entre sólido e líquido quase nunca é atingido, devido a factores como quantidade da amostra, tamanho do cristal, razão de aquecimento, tipo de equipamento usado, etc. Em geral, podemos dizer que um composto puro tem um ponto de fusão bem definido (a substância funde-se inteiramente dentro da faixa de 1 a 2°C), enquanto uma substância impura tem o ponto de fusão indefinido e, portanto, funde-se lenta e gradualmente numa faixa de vários

graus. Por isso, o procedimento de determinação do ponto de fusão de um composto impuro deverá ser repetido após purificação, normalmente, à recristalização.

Um ponto de fusão suficientemente preciso para a determinação da identidade e pureza de um composto pode ser obtido com facilidade utilizando-se instrumentos simples e pequenas quantidades de amostra. O **ponto de fusão pelo método capilar** é realizado em tubos de vidro com  $\pm 1$  mm de diâmetro, fechado em uma das extremidades.

#### 4.7. Purificação de amostras orgânicas sólidas. Recristalização<sup>(2)</sup>

A recristalização é um dos processos mais utilizados para purificação de substâncias sólidas e se baseia na diferença de sua solubilidade em um dado solvente ou mistura de solventes.

Os procedimentos reais de recristalização podem ser bastante complexos. A primeira consideração, ao se planejar uma recristalização, é a escolha do solvente. Além do requisito óbvio de que não deve reagir com a amostra outros factores, como a facilidade de manipulação, a volatilidade, a inflamabilidade e o custo devem ser também considerados. Um bom solvente para recristalização deve dissolver grande quantidade da substância em temperatura elevada e pequena quantidade em temperaturas baixas. Uma regra prática sugere que a amostra sólida seja pelo menos cinco vezes mais solúvel no solvente quente do que frio. O solvente deve, também, dissolver as impurezas mesmo a frio, ou então não dissolve-las mesmo a quente.

Uma técnica usual para a recristalização à partir de um par de solventes envolve a dissolução inicial da amostra no solvente em que ela é mais solúvel, com aquecimento, seguida pela adição lenta do segundo solvente até o ponto em que se espera que no resfriamento a solução provoque a cristalização da amostra. Quando a adição do segundo solvente provoca a turvação da solução, que só desaparece lentamente com agitação, é possível que se tenha em mãos a combinação apropriada de solventes. Em qualquer situação, normalmente, fazem-se necessárias diversas tentativas experimentais.

Por vezes as tentativas de recristalização levam à formação de um óleo em lugar do produto cristalino. A formação de óleo se deve, com frequência à presença de impurezas muito polares e/ou humidade. Quando existem motivos para acreditar nesta eventualidade, a amostra é

dissolvida num solvente volátil no qual a solubilidade é fácil (éter, por exemplo) e a solução tratada com carvão absorvente seguida de um agente dessecante (por exemplo, sulfato de magnésio ou de sódio anidros). O solvente é então removido (evaporador rotatório) e a tentativa de recristalização repetida. Os óleos podem persistir mesmo depois de purificações repetidas. O fato pode ser proveniente da dificuldade intrínseca da amostra cristalizar-se ou da presença dos últimos traços de impureza.

Amostras mais recalcitrantes podem ser induzidas à cristalização por atrito das paredes do recipiente de cristalização (Erlenmayer) com bastão de vidro.

#### **4.8. Controlo de pureza através de Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

##### **4.8.1. Cromatografia em Camada Delgada**

Cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica muito simples e conveniente para a separação, identificação de substâncias químicas, para averiguar a pureza de produtos de reacção e para seguimento qualitativo do andamento de reacções. É igualmente aplicável para substâncias químicas na forma pura, extractos de formulações farmacêuticas, materiais ilicitamente manufacturados, amostras biológicas e produtos naturais. Esta técnica tem sido usada como método analítico primário por ser de fácil execução, baixo custo e boa selectividade (Browning, 1971).

Na CCD a amostra é aplicada como um ponto (mancha) na base da placa. Como a fase móvel se ascende pela placa, a amostra é com ela arrastada. Cada componente move-se reactivamente a fase móvel, dependendo da sua afinidade com a fase estacionária e a fase móvel. Os componentes que têm grande afinidade com a fase móvel mover-se-ão rapidamente, enquanto que os com elevada afinidade com a fase estacionária não irão longe da origem. Isto permite que a amostra seja separada em manchas individuais. Os coeficientes de distribuição são difíceis de calcular, contudo, a distância percorrida pelas manchas e pela fase móvel pode ser medida e dada pela relação:

*R<sub>f</sub> = Distância percorrida pela mancha/ Distância percorrida pela frente de solvente.*

A reprodutibilidade de R<sub>f</sub> para um determinado solvente depende de alguns factores como da constância de actividade do adsorvente, a saturação da câmara de cromatografia, da espessura da camada e a temperatura (Becker et al., 1965).

### **Adsorventes**

Os materiais adsorventes usados na CCD incluem sílica-gel, alumina, celulose em pó e outros. A sílica-sel é o adsorvente mais comum usado na CCD. A escolha do adsorvente deve ter em conta o tipo de composto a analisar, a técnica de visualização, a espessura do suporte e as características da fase móvel (Browning, 1971).

### **Aplicação das amostras**

Os produtos a examinar devem ser dissolvidos num solvente, o menos polar possível e são colocados na placa sob forma de solução a 1%. É aconselhável determinar, numa experiência prévia, a qualidade de substancia a sujeitar a separação. Concentrações demasiadamente elevadas conduzem a menos eficiência de separação, o que se traduz pela formação de << caudas >>. As soluções das substâncias são colocadas, com ajuda de um capilar fino em pontos que distem 1,5 à 2 cm do bordo inferior ou lateral da placa e distando entre si 1 à 2 cm (Becker et al., 1965).

### **Desenvolvimento das placas**

Faz-se normalmente pelo método ascendente, numa câmara que se possa fechar perfeitamente, cuja atmosfera está saturada com vapores do solvente. Para saturá-la, reveste-se a câmara inteiramente com tiras de papel de filtro e deixa-se repousar com solvente durante 30 minutos: a placa deve mergulhar 5 à 7 mm no liquido (Becker et al., 1965).

## **Estudo do cromatograma**

A placa com o cromatograma desenvolvido é seca ao ar. As substâncias incolores podem tornar-se visíveis, observando-se a luz ultravioleta, por tratamento com vapor de iodo ou bromo. Por pulverização com reagentes adequados (ácido sulfúrico concentrado, ácido crómico, permanganato de potássio, etc), ou por carbonização da substância (aquecimento da placa ate 300-400 °C) (Becker et al., **1965**).

## **Vantagens da CCD**

Esta técnica leva algumas vantagens em comparação com os outros métodos cromatográficos:

- Rapidez;
- Superior eficiência de separação com trajectos de migração mais curtos;
- Possibilidade de identificação de substâncias, por intermédio de reagentes agressivos ou por carbonização sobre a placa;
- Menor consumo de substancias, visto ainda ser possível identificar quantidades de substancias cerca de 10 vezes menor que na cromatografia de papel (Becker et al., **1965**).

## **4.9.Método para a confirmação da estrutura química**

### **4.9.1. Espectroscopia de Infravermelho**

De todas as propriedades de um composto orgânico, é o respectivo espectro de infravermelho que, em si, fornece mais informações acerca da estrutura do composto. Uma molécula está em constante vibração: as suas ligações contraem-se e distendem-se relativamente umas às outras. Modificações nas vibrações numa molécula resultam de absorção de luz infravermelha: luz para além da radiação vermelha do espectro visível, possui menor frequência, maior comprimento de onda e menor energia.

Analogamente ao espectro de massas, o espectro de infravermelho é uma propriedade altamente individualizada dos compostos orgânicos que se pode utilizar tanto para estabelecer a identidade de dois compostos, como para ajudar a revelar a estrutura de um novo composto, já que indica os grupos que estão presentes ou ausentes na molécula. Os diversos grupos atômicos dão origem a bandas de absorção características, quer dizer, cada um destes grupos absorve luz à certas frequências, que pouco variam de composto para composto.

A interpretação de um espectro de infravermelho não tem sido fácil, existem bandas que podem ser eliminadas devido à sobreposição de outras bandas. A banda de absorção de certo grupo pode ser devido a várias características estruturais (conjugação, atracção de electrões por um grupo substituinte vizinho, tensão angular, tensão de Van der Waals e ligações por pontes de hidrogénio) e tomada por uma banda de um grupo inteiramente diferente (Solomons, **1983**).



## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### Considerações Gerais

Neste trabalho foram utilizados solventes e reagentes obtidos de fontes comerciais. As sínteses de 2-benzoxazolinona, 5-nitrobenzoxazolinona e Arilhidrazona de 2-benzoxazolinona em tolueno, n-butanol e etanol respectivamente foram realizadas no nicho, sob refluxo e aquecimento à 105°C em manta eléctrica (**electromantle, 300W, 230V, 50Hz**).

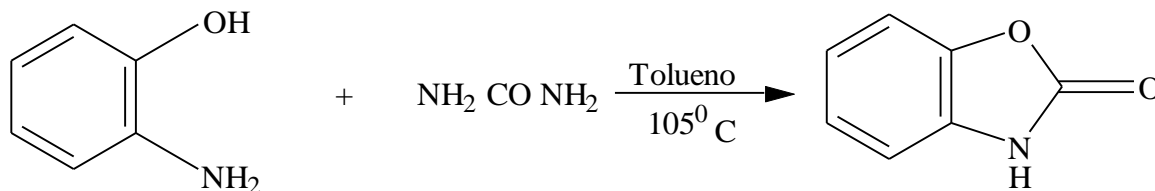
As reacções foram acompanhadas por CCD com mistura eluente composta por clorofórmio e acetato de etilo (1:1) respectivamente e reveladas nos vapores de iodo e no ultravioleta à 366nm.

Procedeu-se a medição dos respectivos pontos de fusão dos produtos brutos e purificados no medidor de ponto de fusão (**Gallenkamp 200/240V, 0.3A, 50Hz**), sendo feita a purificação de cada um por recristalização.

O espectro de infravermelho de 2-BOA purificado foi obtido através de um aparelho **Shimadzu FTIR-8400s**. As frequências de absorção apresentadas neste trabalho foram expressas em  $\text{cm}^{-1}$ . Não foi possível obter os espectros de 5-nitrobenzoxazolinona e Arilhidrazona de 2-benzoxazolinona devido a falta de aparelho em funcionamento.

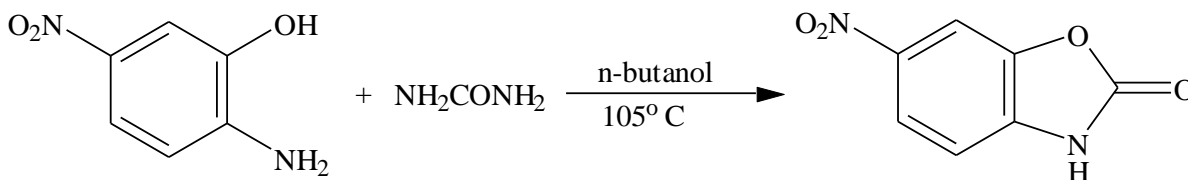
## 5.1.Procedimento

### 5.1.1. Síntese de 2- Benzoxazolinona.



Num balão de fundo redondo de 50mL coloca-se 0,05 moles (5,45g) de o-aminofenol, 0,05 moles (3,03g) de ureia e adiciona-se 25 mL de tolueno. De seguida adiciona-se pedras de ebulição e submete-se a reacção sob refluxo. Observa-se que a solução passa de incolor para castanho-avermelhada e ocorre deposição de cristais nas paredes do balão. Esta reacção desenvolveu-se sob refluxo até o fim da libertação de  $\text{NH}_3$ , detectado por papel indicador de pH. A reacção foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando-se como fase estacionária Sílica Gel 60 GF 254 (Merck). Utilizou-se como eluente a mistura binária de clorofórmio e acetato de etilo, na proporção de (1:1). A cromatoplaça foi observada sob luz UV, em comprimento de onda de 366 nm, e paralelamente a mesma foi revelada em vapores de iodo.

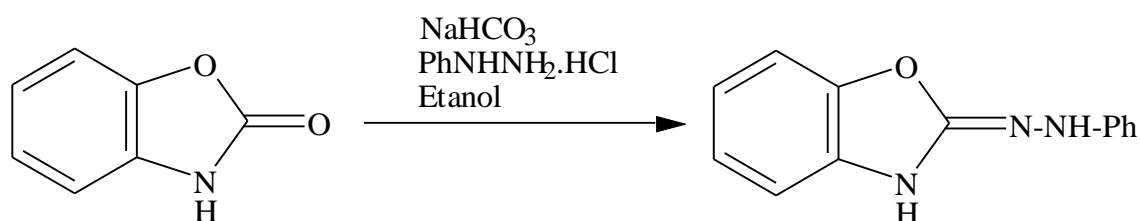
### 5.1.2. Síntese de 5-nitrobenzoxazolinona.



Num balão de fundo redondo de 50mL coloca-se 0,01 moles (1,541g) de 2-amino-5-nitrofenol, 0,01 moles (0,6g) de ureia e adiciona-se 25 mL de n-butanol. De seguida adiciona-se pedras de ebulição e submete-se a reacção sob refluxo. Observa-se que a solução passa de incolor para laranja e ocorre deposição de cristais nas paredes do balão. Esta reacção desenvolveu-se sob refluxo até o fim da libertação de  $\text{NH}_3$ , detectado por papel indicador de pH.

A reacção foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando-se como fase estacionária Sílica Gel 60 GF 254 (Merck). Utilizou-se como eluente a mistura binária de clorofórmio e acetato de etilo, na proporção de (1:1). A cromatoplaça foi observada sob luz UV, em comprimento de onda de 366 nm, e paralelamente a mesma foi revelada em vapores de iodo.

### 5.1.3. Síntese de Arilidrazona de 2- benzoxazolinona.



Num copo de 25 mL de capacidade coloca-se 0.01 moles (1,44g) de fenilhidrazinohidrocloreto e adiciona-se 5 mL de água. A dissolução é incompleta. Adiciona-se a esta solução 0,012 moles (1,008g) de hidrogenocarbonato de sódio, e a dissolução de fenilhidrazinohidrocloreto completa-se acompanhada pela libertação da base fenilhidrazina. De seguida adiciona-se 0,01 moles (1,35g) de 2-BOA e 25 mL de etanol, transfere-se para um balão de fundo redondo de 50mL, adiciona-se pedras de ebulição e submete-se a reacção sob refluxo. Observa-se que a solução passa de incolor para castanho-alaranjada e ocorre deposição de cristais nas paredes do balão. A reacção foi acompanhada por cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando-se como fase estacionária Sílica Gel 60 GF 254 (Merck). Utilizou-se como eluente a mistura binária de clorofórmio e acetato de etilo, na proporção de (1:1). A cromatoplaça foi observada sob luz UV, em comprimento de onda de 366 nm, e paralelamente a mesma foi revelada em vapores de iodo.

#### *Observações:*

**Tabela 1:** Informação da cor dos produtos brutos sintetizados antes da recristalização.

<b>Produto</b>	<b>Solvente</b>	<b>Cor</b>
2-BOA	Tolueno	Castanho-escuro
5-nitro-BOA	n-butanol	Amarelo-escuro
Arilhidrazona de 2-BOA	Etanol	Laranja-escuro

## 5.2.Recrystalização dos produtos sintetizados

### Procedimento:

- Transferiram-se pequenas quantidades de produtos impuros para tubos de ensaios e adicionaram-se solventes em cada tubo com vista a dissolver os produtos à uma temperatura próxima a temperatura de ebulição dos solventes seleccionados. Para 2-BOA usou-se tolueno (10 mL), para 5-nitro-BOA usou-se mistura binária de água e clorofórmio (6 mL: 4 mL) e para Arilhidrazona de 2-benzoxazolinona usou-se mistura binária de água: clorofórmio (1:1);
- Filtraram-se as soluções ainda quentes de modo a eliminar qualquer impureza insolúvel;
- Resfriamento das soluções à temperatura ambiente;
- Resfriamento das soluções na geleira;
- Filtração à vácuo no funil de Buchner;
- Finalmente secagem na estufa por 20 minutos.

**Observações.****Tabela 2:** Informação da cor dos produtos sintetizados já purificados.

<b>Produto</b>	<b>Solvente</b>	<b>Cor</b>
2-BOA	Tolueno	Castanho-pálido
5-nitro-BOA	n-butanol	Amarelo-pálido
Arilhidrazona de 2-BOA	Etanol	Laranja-pálido

**5.3.Medição dos pontos de fusão****Procedimento:**

- Colocou-se o produto pulverizado e seco em um vidro de relógio, e recolheu-se uma pequena quantidade na extremidade aberta do tubo capilar. De seguida golpeou-se o fundo do capilar numa superfície dura, deixando-o cair por uma vara de vidro;
- O produto foi compactado no fundo do capilar, ocupando cerca de 2 à 3 mm da altura do tubo;
- Finalmente o capilar contendo o produto foi levado ao aparelho e leu-se o seu ponto de fusão. Este procedimento foi seguido para a medição dos pontos de fusão de todos os produtos, tanto brutos como purificados.

#### **5.4. Análise cromatográfica**

Foram solubilizadas pequeníssimas quantidades dos 3 (três) produtos já purificados em 3 vidros de relógio com a adição de certa quantidade de tolueno. Cada cromatoplaça apresentou 1 (uma) única mancha. De seguida os cristais foram submetidos à análises de espectrofotometria no Infravermelho.

Para a identificação dos produtos obtidos, a metodologia utilizada foi a de cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando-se como fase estacionária a Sílica Gel 60 GF 254 (Merck). Utilizou-se como eluente a mistura binária de clorofórmio e acetato de etilo, na proporção de (1:1). A cromatoplaça foi observada sob luz UV, em comprimento de onda de 366 nm, e paralelamente a mesma foi revelada em vapores de iodo.

Os produtos foram recristalizados e calcularam-se os valores de Rf's destes. O passo seguinte seria a análise de espectrofotometria no infravermelho.

#### **5.5. Espectrofotometria no Infravermelho**

No procedimento de análise para a caracterização química dos produtos em espectrofotometria no infravermelho utilizou-se como suporte pastilhas de KBr (brometo de potássio). Procedeu-se a calibração do equipamento, com KBr puro visando equilibrar a leitura de absorção.

##### **5.5.1. Substância tida como padrão para identificação de 2-BOA**

O produto 2-benzoxazolinona (2-BOA) foi adquirido de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin – USA pelo laboratório de Química Orgânica do departamento de Agricultura na Universidade Federal de Lavras no Brasil, (Alves, **2003**) e utilizado como padrão na comparação com 2-BOA sintetizado no laboratório.

Em seguida, a substância 2-BOA (padrão comercial) foi submetida à análise para caracterização de suas bandas de absorvância, sendo o espectro utilizado como padrão na

comparação com o espectro de 2-BOA sintetizado e também à cálculos de valor de Rf usando-se mistura binária de clorofórmio e acetato de etilo na proporção de (1:1) e fase estacionária a Sílica Gel 60 GF 254 (Merck). O Rf de 2-BOA encontrado foi de 0,470. A cromatoplaça foi observada sob luz UV, em comprimento de onda de 366 nm, e paralelamente a mesma foi revelada em vapores de iodo.



**Figura 14:** Cromatografia de camada delgada de 2-BOA tida como padrão (Alves, 2003).

Na *tabela 3* estão dispostos as frequências de absorção pelo autor encontradas.

**Tabela 3.** Valores das principais frequências de absorção no infravermelho de 2-BOA padrão.

BOA	v N-H s e as ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )	v C-H s e as ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )	v C=O s e as ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )	$\delta$ C-H ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )	$\delta$ N-H-R ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )	Aromático ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )
2-BOA padrão	3502-3440	3250– 3200	1735	1479	800 – 700	741

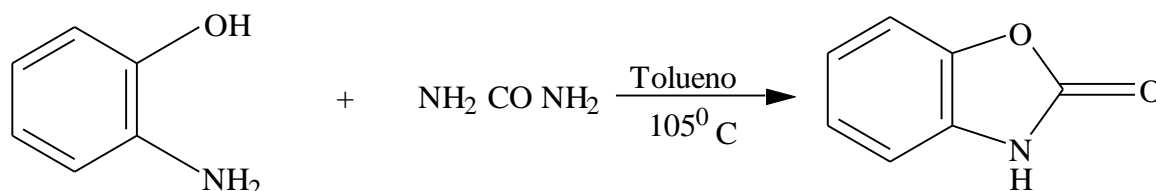
## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. RESULTADOS

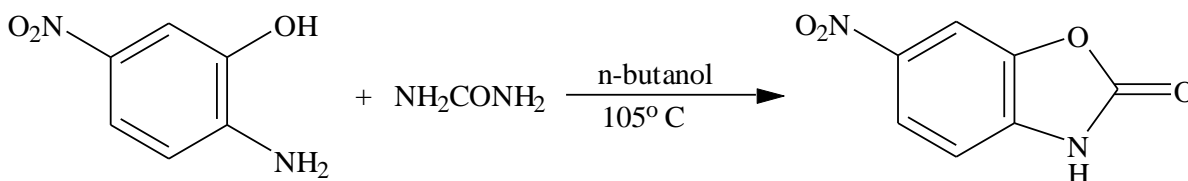
No âmbito deste trabalho foram analisados os dados bibliográficos relacionados aos meios de auto defesa das plantas, nomeadamente Fitoalexinas, biossintetizados pelas plantas como resposta contra a invasão de bactérias e outros microrganismos. Como resultado da análise foi proposta a ideia de sintetizar os análogos de 6-Metoxibenoxazolinona. Esse fitoalexina foi encontrado no milho e no trigo e caracteriza-se por forte acção microbiana, antifúngica e mesmo insecticida (Virtanen, **1958**).

A técnica elaborada é baseada na interacção de o-Aminofenol e 5-Nitro-o-aminofenol com ureia nas condições de refluxo.

#### 6.1.1. Síntese de 2- Benzoxazolinona.



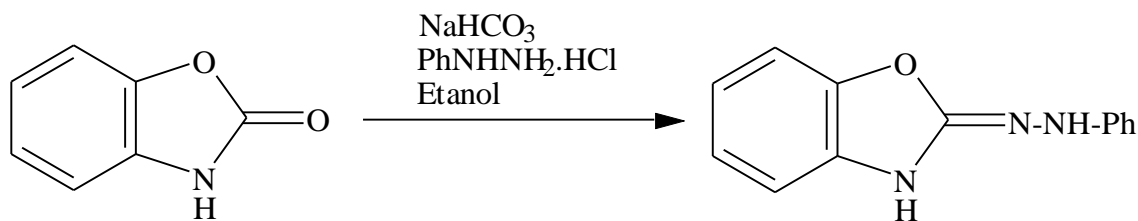
#### 6.1.2. Síntese de 5-nitrobenzoxazolinona.



Foi também sintetizada a Arilhidrazona de 2-Benzoxazolinonas nas condições de refluxo.



### 6.1.3. Síntese de Arilidrazona de 2- benzoxazolinona.



E com base no procedimento de síntese apresentado no presente trabalho, com a purificação por recristalização e determinados os pontos de fusão, temos os dados à seguir:

### 6.1.4. Síntese de 2- Benzoxazolinona.

Terminada a reacção deixa-se a solução numa placa de Petri até o dia seguinte, para assegurar a precipitação completa. No dia seguinte, filtra-se a solução e lava-se 2 vezes com porções de tolueno e 1 vez com éter de petróleo, seca-se na estufa e obteve-se 6,75g (79,59%) com P.f. 137-145°C. O método de purificação do produto foi a recristalização, usando-se 10 mL de tolueno e obteve-se 6,069g (71,59%) e P.f. 138-141°C.

**Tabela 4.** Informação dos reagentes e quantidades para a síntese de 2-BOA.

Reagentes	Mr. (g/mol)	Nºmmol(mmol)	Massa (g)	Volume (mL)	Ponto de fusão (°C)
o-aminofenol	109,13	50	5,45	-	[181-184]
Ureia	60,6	50	3,03	-	[134-138]
Tolueno	-	-	-	80	-

**Tabela 5.** Informação do produto (2-BOA).

Produto	Mr. (g/mol)	Massa Bruta (g)	Ponto de fusão (°C) Bruto	Massa Purificada (°C)	Ponto de fusão (°C) Purificado	Rf	Rendimento Bruto (%)	Rendimento Purificado (%)	Tempo (h)
2-BOA	135,12	6,75	[137-145]	6,069	[138-141]	0,47	79,59	71,56	62

### 6.1.5. Síntese de 5-nitrobenzoxazolinona.

Terminada a reacção deixa-se a solução numa placa de Petri até o dia seguinte, para assegurar a precipitação completa. No dia seguinte, filtra-se a solução e lava-se 2 vezes com porções de n-butanol e 1 vez com éter de petróleo, seca-se na estufa e obteve-se 1,954g (91,3%) com P.f. 163-170°C. O método de purificação do produto foi a recristalização, usando-se mistura binária água-clorofórmio (6 mL: 4 mL) e obteve-se 1,298g (66,5%) e P.f. 163-167°C.

**Tabela 6.** Informação dos reagentes e quantidades para a síntese de 5-nitrobenzoxazolinona.

Reagentes	Mr. (g/mol)	Nºmmol(mmol)	Massa (g)	Volume (mL)	Ponto de fusão (°C)
Ureia	60,09	10	0,69	-	[134-138]
2-amino-5-nitrofenol	154,13	10	1,54	-	[198-202]
n-butanol	-	-	-	25	-

**Tabela 7.** Informação do produto (5-nitrobenzoxazolinona.).

Produto	Mr. (g/mol)	Massa Bruta (g)	Ponto de fusão (°C) Bruto	Massa Purificada (°C)	Ponto de fusão (°C) Purificado	Rf	Rendimento Bruto (%)	Rendimento Purificado (%)	Tempo (h)
5-NO2-BOA	180,12	1,954	[163-170]	1,298	[163-167]	0,42	91,3	66,5	78

#### 6.1.6. Síntese de Arilidrazona de 2- benzoxazolinona.

Terminada a reacção deixa-se a solução numa placa de Petri até o dia seguinte, para assegurar a precipitação completa. No dia seguinte, filtra-se a solução e lava-se 2 vezes com porções de etanol e 1 vez com éter de petróleo, seca-se na estufa e obteve-se 3,094g (81,45%) e P.f. 172-177°C. O método de purificação do produto foi a recristalização, usando-se mistura binária água-clorofórmio (1:1) e obteve-se 2,798g (73,6%) e P.f. 175-178°C.

**Tabela 8.** Informação dos reagentes e quantidades para a síntese de Arilidrazona de benzoxazolinona.

Reagentes	Mr. (g/mol)	Nºmmol(mmol)	Massa (g)	Volume (mL)	Ponto de fusão (°C)
2-BOA	135,12	10	1,35	-	[138-141]
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	12	1,008	-	[57-60]
PhNHNH <sub>2</sub> .HCl	144,60	10	1,44	-	[254-258]
H <sub>2</sub> O	-	-	-	5	-
Etanol	-	-	-	25	-

**Tabela 9.** Informação do produto sintetizado (Arlhidrazona de 2-benzoxazolinona).

<b>Produto</b>	<b>Mr. (g/mol)</b>	<b>Massa Bruta (g)</b>	<b>Ponto de fusão (°C) Bruto</b>	<b>Massa Purificada (°C)</b>	<b>Ponto de fusão (°C) Purificado</b>	<b>Rf</b>	<b>Rendimento Bruto (%)</b>	<b>Rendimento Purificado (%)</b>	<b>Tempo (h)</b>
Arlhidrazona de 2-BOA	225,10	3,094	[172-177]	2,798	[175-178]	0,52	81,45	73,6	28

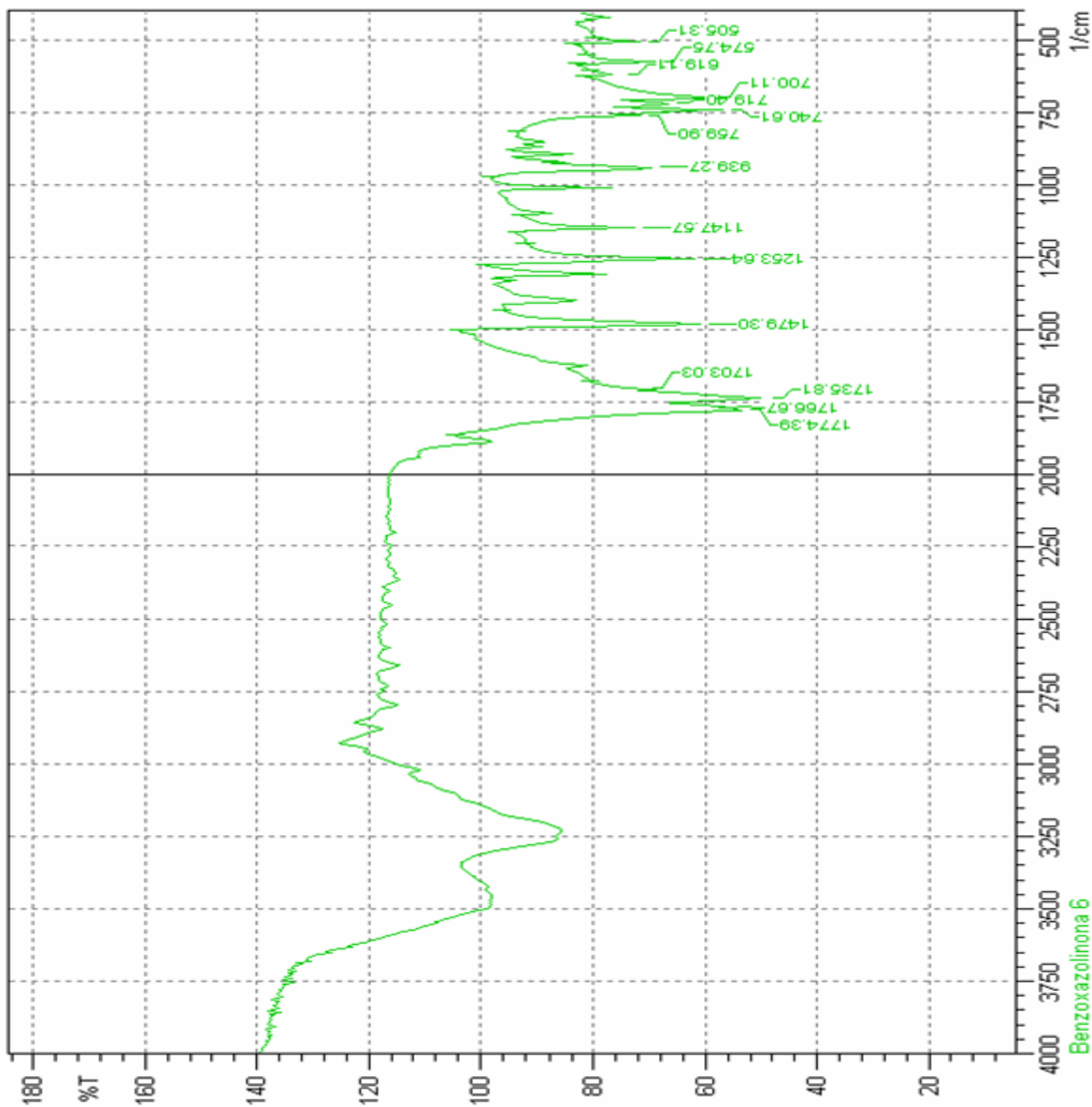
**Observações:**

Foram testados outros solventes tais como: Isopropanol e Dimetilformamida durante a realização das experiências. Contudo estes não mostraram-se eficientes para a síntese dos benzoxazóis, o que não aconteceu com Tolueno, n-Butanol e Etanol.

### 6.1.7. Espectroscopia de Infravermelho

#### Espectro de 2-BOA

O espectro de Infravermelho de 2-BOA sintetizado foi tirado no estado sólido em forma de comprimidos de KBr com um aparelho da marca **Shimadzu FTIR-8400s**.



**Figura 15:** Espectro Infravermelho de 2-BOA sintetizada com o uso de solvente tolueno.

**Tabela 10.** Valores principais das frequências de absorção no Infravermelho do produto sintetizado (2-BOA).

<b>Produto</b>	<b>v N-H</b> <b>s e as</b> <b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>	<b>v C-H</b> <b>s e as</b> <b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>	<b>v C=O</b> <b>s e as</b> <b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>	<b>δ C-H</b> <b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>	<b>δ N-H-R</b> <b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>	<b>Aromático</b> <b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>
2-BOA	3502-3440	3250– 3200	1735,81	1479,30	800-700	740,61

v – Estiramento; δ – Deformação angular; s – Simétrico; as – Assimétrico;

\* Frequências de absorção obtidas por Alves *et al.*, (2003) com o 2-BOA padrão.

Nesta tabela faz-se uma análise comparativa das bandas características correspondentes à valores das principais frequências de absorção no Infravermelho de 2-BOA sintetizado e 2-BOA padrão. São apresentados os valores das frequências absorção de 2-BOA sintetizado que mostram-se ser muito próximas aos de 2-BOA padrão.

- A 740,61 cm<sup>-1</sup> ocorre uma banda de intensidade forte que pode ser atribuída à vibração do grupo Aromático.
- No intervalo de 800-700 cm<sup>-1</sup> ocorre uma banda de intensidade forte que pode ser atribuída à vibração de deformação angular do grupo N-H-R.
- A 1479,30cm<sup>-1</sup> ocorre uma banda de intensidade forte que pode ser atribuída a vibração de deformação angular do grupo C-H.
- A 1735,81cm<sup>-1</sup> ocorre uma banda de intensidade forte que pode ser atribuída a vibração de estiramento simétrico e assimétrico do grupo C=O.
- No intervalo de 3250 – 3200cm-1 ocorre uma banda de intensidade forte que pode ser atribuída à vibração de estiramento simétrico e assimétrico do grupo C-H.

- No intervalo de  $3502\text{-}3440\text{cm}^{-1}$  ocorre uma banda de intensidade forte que pode ser atribuída à vibração de estiramento simétrico e assimétrico do grupo N-H.

Não foi possível obter e interpretar os espectros infravermelhos de 5-nitrobenzoxazolinona e Arilhidrazona de 2-benzoxazolinona devido a falta de aparelho em funcionamento.

## 6.2.DISCUSSÃO

Ao contrário de anticorpos sintetizados pelos animais, as fitoalexinas não são proteínas, não apresentam especificidade e não imunizam a planta. São produtos naturais, ausentes na planta sadia, acumulados temporariamente no local e nos arredores da infecção. Possuem actividade inibitória sobre bactérias, fungos, nematóides e efeito tóxico para animais e para as próprias plantas. Podem ser acumulados em resposta a vários microrganismos, mas também como consequência de factores que causam stress na planta, como ferimentos e exposição a várias substâncias tóxicas.

Foi elaborado um método simples de síntese de análogos sintéticos de fitoalexinas com base de benzoxazol com rendimento bruto da ordem de 79,59% à 91,3 % e purificado da ordem de 66,5% à 73,6%. Os compostos sintetizados foram sintetizados à partir de o-aminofenóis e ureia, desenvolvendo-se estas reacções através da técnica de refluxo. Todavia, o amplo intervalo de rendimento reflecte, em parte, o estado obsoleto dos reagentes assim como o facto de as reacções terem levado muitas semanas devido à falta de água favorecendo, deste modo, a possibilidade de ocorrências de reacções secundárias.

**Tabela 11.** Informação dos Análogos de fitoalexinas com base de benzoxazol sintetizadas.

Nome	Fórmula Molecular	Rend. Bruto (%)	Pf. Bruto (°C)	Rend. Recrist. (%)	Pf. Recrist. (°C)
2-BOA	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> N	79,59	[137-145]	71,56	[138-141]
5-nitro-BOA	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> N	91,3	[163-170]	66,5	[163-167]
Hidrazona de BOA	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> ON <sub>3</sub>	81,45	[172-177]	73,6	[175-178]



Os valores de pontos de fusão dos produtos obtidos apresentaram intervalos de variação de ponto de fusão elevado. A purificação destes através da recristalização, fez baixar o intervalo de variação dos pontos de fusão.

O decurso das reacções e a pureza dos compostos sintetizados foi monitorado pela cromatografia de camada delgada usando placas de sílica gel como material adsorvente assim como pela libertação de amoníaco detectado por papel indicador de pH e devido ao seu cheiro característico.

Foi verificado uma aproximação entre os valores de pontos de fusão dos compostos sintetizados brutos com os valores de pontos de fusão dos compostos sintetizados purificados pela técnica de recristalização. Todavia, o intervalo de variação de temperaturas de fusão dos compostos purificados por recristalização da ordem de 3-4°C, deveu-se às particularidades e falhas do aparelho assim como do utilizador (método visual de controlo).

O abaixamento dos intervalos de temperaturas de fusão da mistura de porções iguais de cada um dos 3 (três) produtos de síntese é devido à diferença dos níveis de pureza dos mesmos. O intervalo de temperatura de fusão dos produtos brutos é maior (da ordem 5-8°C) que o dos produtos já purificados, isto é devido à impurezas contidas nos produtos brutos.

Não houve formação instantânea de cristais em formato de agulha nem dissolução dos reagentes mesmo depois de 3 (três) dias de aquecimento com o uso de Isopropanol e Dimetilformamida durante a realização das experiências, facto que se verificou com o uso de Tolueno, n-Butanol e Etanol. Devido a esse facto, as experiências desenvolvidas com o uso de Isopropanol e Dimetilformamida foram anuladas uma vez que a reacção de formação do ciclo benzoxazólico ocorre no meio de solventes orgânicos e os rendimentos dependem fundamentalmente destes.

### 6.2.1. Análise Cromatográfica

A separação cromatográfica das manchas dos 3 (três) produtos de síntese utilizando-se a mistura binária clorofórmio e acetato de etilo na proporção de (1:1) e fase estacionária a Sílica Gel 60 GF 254 e reveladas sob luz UV, em comprimento de onda de 366 nm apresentaram valores de factores de retenção de 0,47 para 2-BOA, 0,42 para 5-nitrobenzoxazolinona e 0,52 para Arilhidrazona de 2-benzoxazolinona.

O cromatograma de 2-BOA tida como padrão eluída em mesma mistura binária clorofórmio/acetato de etil (1:1) e mesmo tipo de fase estacionária sílica gel 60 GF 254 (Merck) teve um Rf de 0,470 observada sob luz ultravioleta, em comprimento de onda de 366 nm e paralelamente revelada em vapores de iodo de acordo com *Alves et al (2003)*.

O valor de Rf de 2-BOA sintetizado é semelhante o valor de Rf tida como padrão (*Alves, 2003*), eluída em mesma fase estacionária e mesma fase eluente.

**Tabela 12.** Valores de índice de retenção (Rf) dos compostos sintetizados.

Nome	Fórmula Molecular	Valor de Rf	Fase móvel
2-BOA	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub> N	0,47	CH <sub>3</sub> Cl – AcOet (1:1)
5-nitro-BOA	C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> N	0,42	CH <sub>3</sub> Cl – AcOet (1:1)
Arilhidrazona de 2-BOA	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> ON <sub>3</sub>	0,52	CH <sub>3</sub> Cl – AcOet (1:1)

### 6.2.2. Espectroscopia de Infravermelho

Observou-se uma grande aproximação entre os valores de frequências de absorção de 2-BOA padrão e 2-BOA sintetizado, o que permite a comprovação estrutural do composto sintetizado. Todavia, é de salientar que houve pequenos desvios em algumas bandas, daí em jeito de resumo, dá-se a saber dimensão destes desvios com a ajuda da (tabela 13) dada à seguir:

**Tabela 13.** Valores principais das frequências de absorção no Infravermelho de 2-BOA padrão e do produto sintetizado (2-BOA).

<b>Produto</b>	<b>v N-H</b> s e as ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )	<b>v C-H</b> s e as ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )	<b>v C=O</b> s e as ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )	<b><math>\delta</math> C-H</b> ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )	<b><math>\delta</math> N-H-R</b> ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )	<b>Aromático</b> ( $\text{cm}^{-1} \pm 5$ )
2-BOA padrão	3502- 3440*	3250– 3200*	1735*	1479*	800 – 700*	741*
2-BOA	3502-3440	3250– 3200	1735,81	1479,30	800-700	740,61

- A  $740,61 \text{ cm}^{-1}$  ocorre uma banda de intensidade forte para 2-BOA sintetizado e a  $741 \text{ cm}^{-1}$  para 2-BOA padrão que pode ser atribuída à vibração do grupo Aromático.
- No intervalo de  $800-700 \text{ cm}^{-1}$  ocorre uma banda de intensidade forte para 2-BOA sintetizado e 2-BOA padrão que pode ser atribuída à vibração de deformação angular do grupo N-H-R.
- A  $1479,30 \text{ cm}^{-1}$  ocorre uma banda de intensidade forte para 2-BOA sintetizado e a  $1479 \text{ cm}^{-1}$  para 2-BOA padrão que pode ser atribuída a vibração de deformação angular do grupo C-H.

- A  $1735,81\text{cm}^{-1}$  ocorre uma banda de intensidade forte para 2-BOA sintetizado e a  $1735\text{cm}^{-1}$  para 2-BOA padrão que pode ser atribuída a vibração de estiramento simétrico e assimétrico do grupo C=O.
- No intervalo de  $3250 - 3200\text{cm}^{-1}$  ocorre uma banda de intensidade forte para 2-BOA sintetizado e 2-BOA padrão que pode ser atribuída à vibração de estiramento simétrico e assimétrico do grupo C-H.
- No intervalo de  $3502-3440\text{cm}^{-1}$  ocorre uma banda de intensidade forte para 2-BOA sintetizado e 2-BOA padrão que pode ser atribuída à vibração de estiramento simétrico e assimétrico do grupo N-H.

## 7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÃO

### 7.1. CONCLUSÕES

As fitoalexinas são somente um dos componentes dos vários mecanismos de defesa para a resistência de plantas às doenças. A tentativa de infecção dos tecidos de uma planta por um patógeno inicia uma progressão complexa de interações biológicas que culmina nos sintomas visuais associados com resistência ou susceptibilidade. A natureza, tempo e coordenação espacial das ações de qualquer um dos organismos envolvidos mostram-se cruciais na definição do resultado final de qualquer interação.

#### 2- Benzoxazolinona

Obteve-se 6,75g (79,59%) com P.f. 137-145°C. O método de purificação do produto foi a recristalização, usando-se 10 mL tolueno e obteve-se 6,069g (71,59%) e P.f. 138-141°C. O valor de R<sub>f</sub> de 2-BOA sintetizado foi de 0,47. Os dados espectroscópicos de 2-BOA sintetizado se encontram à seguir:

<b>BOA</b>	<b>v N-H</b>	<b>v C-H</b>	<b>v C=O</b>	<b>δ C-H</b>	<b>δ N-H-R</b>	<b>Aromático</b>
	<b>s e as</b>	<b>s e as</b>	<b>s e as</b>			
	<b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>	<b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>	<b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>	<b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>	<b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>	<b>(cm<sup>-1</sup> ±5)</b>
2-BOA padrão	3502-3440	3250– 3200	1735	1479	800 – 700	741

#### 5-nitrobenzoxazolinona.

Obteve-se 1,954g (91,3%) com P.f. 163-170°C. O método de purificação do produto foi a recristalização, usando-se mistura binária água-clorofórmio (6 mL: 4 mL) e obteve-se 1,298g (66,5%) e P.f. 163-167°C. O valor de R<sub>f</sub> de 5-nitrobenzoxazolinona sintetizado foi de 0,42.

### **Arilidrazona de 2- benzoxazolinona.**

Obteve-se 3,094g (81,45%) e P.f. 172-177°C. O método de purificação do produto foi a recristalização, usando-se mistura binária água-clorofórmio (1:1) e obteve-se 2,798g (73,6%) e P.f. 175-178°C. O valor de Rf de Arilhidrazona de benzoxazolinona sintetizado foi de 0,52.

- Com base no método de síntese proposto no presente trabalho foi possível sintetizar análogos de fitoalexinas com base de benzoxazol com bons rendimentos. A pureza dos compostos sintetizados foi desenvolvida pelas técnicas de determinação de ponto de fusão e pela técnica de cromatografia de camada delgada (CCD).
- A confirmação da estrutura de 2-benzoxazolinona foi feita com auxílio da espectroscopia de infravermelho, medição do seu ponto de fusão e a posterior comparação com a 2-benzoxazolinona padrão.
- A semelhança dos espectros de 2-benzoxazolinona tida como padrão com o sintetizado pelo método proposto no presente trabalho e conseqüentemente, os valores aproximáveis das suas principais bandas de absorção (vide tabela 13) serviu de comprovativo da estrutura química do composto.

Contudo espera-se que estes novos pesticidas com base de benzoxazol venham a ser aplicados contra bactérias e outros microrganismos em cooperação com a Faculdade de Agronomia e Departamento de Protecção vegetal.

### **7.2.RECOMENDAÇÃO**

Os compostos sintetizados apresentam interesse científico e prático devido a sua actividade potencial antimicrobiana, daí: Recomenda-se investigar as propriedades antibacterianas e antifúngicas das fitoalexinas com base de benzoxazol sintetizadas em parceria com o Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Eduardo Mondlane.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L.W.R., (2003). *Interferência alelopática da cultura do milho (Zea mays L.) sobre a cultura do cafeeiro (Coffea arabica L.) plantada em sucessão*, Tese (Doutorado em Fitotecnia), Universidade Federal de Lavras, Lavras;
- Argandona, V. H., Corcuera, L. (1985). *Distribution of hydroxamic acids in Zea mays tissues*. **Phytochem.**, (24): 177-178p;
- Argandona, V.H., Corcuera, L., (1985). *Distribution of hydroxamic acids in Zea mays tissues*. **Phytochem.**, (24): 177-178p;
- Barnes, J. P. y Putnam, A. R. (1987). *Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (Secale cereale L.)*. **J. Chem. Ecol.**, (13): 889-906p;
- Baziramakenga, R., Leroux, G. D., Simard, R. R., Nadean, P., (1997). *Allelopathic effects of phenolic acids on nucleic acid and protein levels in soybean seedings*, **Can. J. Bot.**, (75): 445-450p;
- Becker, et al., (1965). *Organikum Química-Orgânica Experimental*, **Fundação Calouste Gulbenkian**, 5ª edição, Lisboa, 104-107p;
- Blum, U., C., Rebbeck, J., (1989). *Inhibition and recovery of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture*, **J. Chem. Ecol.**, (15): 917-920p;
- Browning, D. R., (1971). *Cromatografia*, **Toray Masson**, S. A., Barcelona, 51-52p;
- Burgos, N.R., Talbert, R.E. y Mattice, J.D. (1999). *Cultivar and age differences in the production of allelochemicals by Secale cereale*. **Weed Sci.**, (47): 481-485p.
- Cruichshank, I. A. M. & Perrin, D. R., (1960). *Isolation of a phytoalexin from Pisum sativum*, **L. Nature** **187**, 387-412p;
- Felipe Anton, M. R., (2009). *Interacciones Alelopáticas: Lucha química de las plantas*, **Schironia. Revista científica del Colegio Oficial de Farmacéuticos de Madrid**, 33p.
- Gierl, A., Frey, M. (2001). *Evolution of benzoxazinone biosynthesis and indole production in maize*. **Planta**, (213): 493-498p;
- Grombacher, A., Russel, W. A. y Guthrie, W.D. (1989). *Resistance to first generation european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and DIMBOA concentration in midwhorl leaves of the B59 maize synthetic*. **J. Kans. Entom. Soc.**, (62): 103-107p;

- Hahn, M. G. (1996). *Microbial elicitors and their receptors In plants*. **Annual Review of Phytopathology**, (34): 387-412p;
- Harbone, J. B., (1988). *Introduction to Ecological Biochemistry*. **London Academic Press**.
- Harborne, J. B., (1999). *The comparative Biochemistry of phytoalexin induction in plants*, **Biochemical, Systematics and Ecology**, (27): 335-367p;
- Keen, N. T., (1990). *Phytoalexins and their elicitors*. In Hoagland, R. E., (ed.), *Microbes and Microbial Products as Herbicides*, **Washington, American Chemical Society**, 114-129p;
- Linthorst, H. J. M. (1991). *Pathogenesis-related proteins of plants*, **Critical Reviews in Plant Science**, (10): 123p;
- Nair, M. G., Whitenack, C. J., Putnam, A. R., (1990). *2,2'-oxo-1,1'-azobenzene a microbially transformed allelochemical from 2,3- benzoxazolinone*, **Journal of Chemical Ecology**, New York, (16): 353-364p;
- Nicholson, R. L., Hammerschmidt, (1992). *R. Phenolic compounds and their role in disease resistance of the plants*, **Plant disease**, 260-280p;
- Niemeyer, H. M. (1988). *Hydroxamic acids (4-hydroxy-1, 4-benzoxacin-3-ones), defense chemicals in Gramineae*. **Phytochem.**, (27): 3349-3358p;
- Paxton, J. D., (1981). *A working redefinition*, **Phytopathologische Zeitschrift 101**, 106-109p;
- Scalbert, A. (1992). *Tannins in woods and their contribution to microbial decay prevention*, **Plant Polyphenols**, Plenum Press, New York, 935-946p;
- Solomons, T. W. G., (1983). *Química Orgânica*, Vol. 3, **Livros Científicos**, Editora S. A., Rio de Janeiro, 876- 880p;
- Schwan-Estrada, K.R.F.,(2000). *Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogenicos*. **Floresta**, (30), 129-137p.
- Stangarlin , J.R. et al., (1999). *Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatogenos*. **Biociencia**, (11), 16-21p.
- René Milcent, (2003). *Chimie Organique heterocyclique*, **EDP Sciences**, France, 521-526p.



- Virtanen, A., (1958). *Antimicrobiell wirksame Substanzen in Kulturpflanzen*. **Angew. Chemie**, (70), 544p.

**Sites:**

1. Fittoalexinas: O Mecanismo de Defesa das Plantas. Disponível em: [www.pgqu.net/arquivos/Seminarios/AnaBernardo\\_MSc.pdf](http://www.pgqu.net/arquivos/Seminarios/AnaBernardo_MSc.pdf). acessado em 01-05-2011.
2. Purificação e caracterização de compostos orgânicos. Ponto de Fusão; Recristalização; Uso do ponto de fusão como critério de pureza. Disponível em: [http://vsites.unb.br/iq/litmo/LQO2\\_2009/roteiro/Recristalizacao\\_e\\_Ponto\\_de\\_Fusao\\_LQO\\_2\\_09.pdf](http://vsites.unb.br/iq/litmo/LQO2_2009/roteiro/Recristalizacao_e_Ponto_de_Fusao_LQO_2_09.pdf). acessado em 21-04-2011.