

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA VIOLETA ARAÚJO LÓPEZ

**BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS *DE Croton urucurana* Baill E
SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS**

CURITIBA

2010

PATRICIA VIOLETA ARAÚJO LÓPEZ

**BIOPROSPECÇÃO DE EXTRATOS *DE Croton urucurana* Baill E
SEUS FUNGOS ENDOFÍTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração Microbiologia, Departamento de Patologia Básica, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vânia Aparecida Vicente.

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Chirlei Glienke.

CURITIBA

2010

DEDICATÓRIA

*A meus pais Davina e Juan Carlos,
meu irmão Carlos David e
minha avó Dona Picuta (in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde e bênçãos dadas à minha pessoa e a meus seres queridos.

Aos meus pais, Davina López e Juan Carlos Araújo, pelo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

A meu irmão Carlitos, pelo apoio constante e incentivo.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Vania Aparecida Vicente, pela oportunidade, sábios conselhos e por se tornar em um exemplo de vida dedicada à pesquisa.

À Prof^a Dr^a Chirle Glienke pela coorientação, críticas construtivas e paciência em corrigir a dissertação.

À Prof^a Dr^a Edilene Alcântara de Castro e Prof^a Dr^a Vanete Tomaz Soccol, pelo apoio e por terem possibilitado minha inserção no programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

À Prof^a Dr^a Beatriz Helena Noronha de Sales Maia, pela colaboração no trabalho e pelo apoio, amizade e conselhos e por ser uma pessoa tão generosa e sempre disposta a me ajudar.

Ao Prof. Dr. João Lucio de Azevedo por ter participado da banca examinadora e pelas valiosas sugestões para o melhoramento do presente trabalho.

À Prof^a Dr^a Selma Faria Zawadzki Baggio, pelo apoio, conselhos e pela disponibilidade dos equipamentos do laboratório.

À Prof^a Dr^a Rosa Degen, por me iniciar na pesquisa científica na graduação e pela amizade, incentivo, ensinamentos e por ter me mostrado que com força de vontade e sacrifício podemos alcançar nossos objetivos.

À Prof^a Dr^a Celma Aguilera de Fernández pelo carinho, amizade, palavras de incentivo.

À Prof^a Dr^a Andréia Sthingen pelo apoio e por ter participado da minha banca de qualificação.

Aos professores do Programa do Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pelos valiosos ensinamentos que contribuíram grandemente para minha formação profissional e pessoal.

Aos Prof. Dr. José Plans, Prof^a Dr^a Juana Ortellado de Canese e Dra Herminia Perez pelas cartas de recomendação para o ingresso no programa de Pós-graduação e por terem me ensinado tanto na área da Microbiologia e incentivado meu interesse por esta maravilhosa ciência.

Às Dras. do Departamento de Microbiologia do Hospital das Clínicas de Asunción - Paraguai: Juana Ortellado, Marcela Laconich, Graciela Lird, Mirta Casco, Gladys Velazquez, Maria Eugenia Mayor, Myriam Rivas, Carmen Menacho e Ana Zubeldia, por terem conduzido meus primeiros passos na área da Microbiologia. Muito obrigada pela paciência e generosidade em me ensinar tantos aspectos importantes na Microbiologia clínica.

À profa Dra Marisol Domingues Muro, pela disponibilização dos isolados clínicos de fungos filamentosos.

A amiga, colega e companheira de luta Fabiana Tonial pela amizade, paciência e apoio constante.

A amiga Dicler Barbieri pela amizade, conselhos e grande ajuda nos momentos difíceis.

Aos colegas da Pós-graduação, Juliana Burjack, Samarina de França Braga, Juliana Duarte, Raquel Schier, Saloe Bispo, Paulo Dantas Marangoni, Eduardo Zardo, Angela Bozza, Mariana Porsani e Sabina Tralamazza pela ajuda e pelos agradáveis momentos de convivência.

As estagiárias do LabMicro Poliana M. Mazur, Ismaína de Lima e Daniele Santos, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À doutoranda Josiane Gomes Figueiredo, pela importante ajuda no isolamento dos microrganismos endofíticos.

À doutoranda Nelissa Pacheco Vaz pela amizade e paciência em me ajudar na realização das cromatografias e pela ajuda na formatação das fotos da dissertação.

A minha tia Emilia López pelo apoio e por ter-me presente nas suas orações.

As amigas Yenny González e Rocio Riveros pela amizade e ajuda.

A todas as pessoas que de uma maneira ou outra colaboraram com a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos.

“El Señor creó las plantas medicinales que brotan de la tierra: un hombre inteligente no las menosprecia”.

Sirácida 38, 4

RESUMO

A bioprospecção de plantas medicinais e microrganismos endofíticos constitui uma atividade promissora na pesquisa e detecção de novos compostos com atividades biológicas de interesse na área da saúde e na área agrônômica. *Croton urucurana* Baill (Euphobiaceae) é uma planta amplamente utilizada na medicina tradicional em países como Brasil, Paraguai e Uruguai. Entre as várias propriedades medicinais atribuídas à planta, destaca-se seu uso para tratar doenças de etiologia infecciosa. No presente trabalho foi avaliada a atividade antibacteriana e antifúngica de diferentes extratos de *C. urucurana* contra as bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*, bactérias gram negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e contra os fungos filamentosos *Microsporium gypseum*, *Fonsecaea monophora* e *Guignardia citricarpa*. Devido ao fato de que nos últimos anos vários trabalhos vêm demonstrando a importância dos microrganismos endofíticos de plantas medicinais como fontes de compostos bioativos, neste trabalho também se realizou a bioprospecção de fungos endofíticos isolados da planta. Avaliou-se o potencial antibacteriano e antifúngico como também a capacidade de produção de compostos bioativos em diferentes meios de cultura desses microrganismos. Em relação à atividade da planta, comparando a atividade antimicrobiana de extratos brutos da folha e casca do caule, este último demonstrou maior atividade. As bactérias mais sensíveis a esse extrato foram *P. aeruginosa* (CIM: 0,1 mg/mL) e *S. aureus* (CIM: 0,5 mg/mL). Nenhuma das frações demonstrou uma atividade maior que a do extrato bruto, devido provavelmente a atividade do extrato ser produzida por um sinergismo entre vários princípios ativos. Porém, notou-se que as frações mais polares foram as mais ativas. Para selecionar os fungos endofíticos com maior potencial antimicrobiano foi realizado o teste de antagonismo de 27 isolados endofíticos contra os fungos *G. citricarpa* e *F. monophora*. Também foi realizada uma triagem de atividade antibacteriana contra bactérias gram positivas e gramnegativas. Seis isolados foram selecionados para a produção de metabólitos em diferentes meios de cultura: meios líquidos, malte e milho, e meios sólidos arroz e milho. Os extratos obtidos apresentaram diferentes graus de atividade antimicrobiana. A análise dos extratos mais ativos da planta, através de cromatografia em camada delgada demonstrou a presença de metabólitos da classe dos polifenóis. Em relação aos extratos dos endofíticos, o perfil cromatográfico variou bastante em função do fungo e meio de cultura utilizado. O extrato do isolado endofítico FCU 055 *Epicoccum sp* cultivado em meio sólido milho demonstrou uma interessante atividade antimicrobiana contra *G. citricarpa* e *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: *Croton urucurana*, atividade antimicrobiana, endofíticos, produção de compostos bioativos.

ABSTRACT

The bioprospection of medicinal plants and endophytic microorganisms constitutes a promising activity in research and detection of new compounds with biological activities of interest in health and agricultural areas. *Croton urucurana* Baill (*Euphobiaceae*) is a plant widely used in traditional medicine of countries like Brazil, Paraguay and Uruguay. Among many of medicinal properties attributed to this plant, stands out its use to treat diseases of infectious etiology. The present study evaluated the antibacterial and antifungal activity of different extracts of *C. urucurana* against Gram-positives bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*, Gram-negatives bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and against filamentous fungi *Microsporum gypseum*, *Fonsecaea monophora* and *Guignardia citricarpa*. As in recent years several studies have shown the importance of endophytic microorganisms of medicinal plants as sources of bioactive compounds, in this study was also done the bioprospection of endophytic fungi isolated from the same plant. It were evaluated the antibacterial and antifungal potential as well as the ability of these microorganisms to produce bioactive compounds in different culture media. Regarding the activity of the plant, comparing the antimicrobial activity of crude extracts of leaf and stem bark, the latter showed greater activity. The bacteria most sensitive to this extract were *P. aeruginosa* (MIC: 0.1 mg / mL) and *S. aureus* (MIC: 0.5 mg / mL). None of the fractions showed greater activity than the crude extract, probably because the activity of the extract is produced by a synergism between various active principles. However, it was noted that the more polar fractions were most active. To select the endophytic fungi with the greatest antimicrobial potential it was performed an antagonism test in which 27 fungi were faced against *G. citricarpa* and *F. monophora*, it was also done a screening of antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Six isolates were chosen for the production of metabolites in different culture media: the liquid media, malt and corn, and the solid media, rice and corn. The extracts showed varying degrees of antimicrobial activity. The analysis of the most active extracts of the plant by thin layer chromatography revealed the presence of metabolites class of polyphenols. With regard to the endophytes extracts the chromatographic profile varied depending on the fungus and culture medium used. The extract from isolated endophytic FCU 055 *Epicoccum* sp grown on corn solid medium showed an interesting antimicrobial activity against *G. citricarpa* and *P. aeruginosa*.

Key words: *Croton urucurana*, antimicrobial activity, endophyte, production of bioactive compounds.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – <i>Croton urucurana</i>	31
FIGURA 2 – PARTES DA PLANTA UTILIZADAS PARA A OBTENÇÃO DOS EXTRATOS: FOLHA (A) CASCA DO CAULE (B) DE <i>Croton urucurana</i>	51
FIGURA 3 – MÉTODO DE MACERAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DE FOLHAS (A) E CASCA DO CAULE (B) DE <i>Croton urucurana</i>	52
FIGURA 4 – ETAPAS DO ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS A PARTIR DE FOLHAS DE <i>Croton urucurana</i>	57
FIGURA 5 – CULTIVO EM MEIO SÓLIDO (GRÃOS DE MILHO E ARROZ) DO ISOLADO ENDOFÍTICO FCU 055.....	60
FIGURA 6 – ESQUEMA DE PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO.....	61
FIGURA 7 – AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS E CASCA DO CAULE DE <i>Croton urucurana</i>	65
FIGURA 8 – FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO: A) COLUNA CROMATOGRÁFICA. B) ESQUEMA DE SOLVENTES UTILIZADOS	66
FIGURA 9 – CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DE <i>M. gypseum</i> NA PRESENÇA DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE CASCA DO CAULE de <i>C. urucurana</i>	74
FIGURA 10 – MACRO E MICROMORFOLOGIA ISOLADO ENDOFÍTICO <i>Epicoccum sp</i> FCU 055	76
FIGURA 11 – MACRO E MICROMORFOLOGIA DO ISOLADO ENDOFÍTICO FCU 028.....	76
FIGURA 12 – MACRO E MICROMORFOLOGIA ISOLADO ENDOFÍTICO FCU 054	76
FIGURA 13 – MACRO E MICROMORFOLOGIA ISOLADO ENDOFÍTICO FCU 060.	77
FIGURA 14 – TESTE DE ANTAGONISMO DE PAREAMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS CONTRA O FUNGO <i>Guignardia citricarpa</i>	82
FIGURA 15 – ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE ENDOFÍTICOS CONTRA O CRESCIMENTO DE <i>Guignardia citricarpa</i>	85
FIGURA 16 – CROMATOGRAFIAS EM CAMADA DELGADA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>Croton urucurana</i>	90
FIGURA 17 – EXTRATOS DO FUNGO ENDOFÍTICO FCU 055 CULTIVADOS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E ANALISADOS POR CCD.....	93

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS EXTRATOS BRUTOS METABÓLICOS DE FOLHAS E CASCA DO CAULE DE <i>Croton urucurana</i> BASEADA NO HALO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO EXPRESSO EM mm.....	64
QUADRO 2 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS BRUTOS METABÓLICOS DE CASCA DE CAULE E FOLHAS DE <i>Croton urucurana</i>	67
QUADRO 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO DE CASCA DE CAULE DE <i>Croton urucurana</i> CONTRA BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA	68
QUADRO 4 – DIÂMETRO DAS COLÔNIAS E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>M. gypseum</i> NA PRESENÇA DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE CASCA DE CAULE DE <i>Croton urucurana</i>	72
QUADRO 5 – DIÂMETRO DAS COLÔNIAS E PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Fonsecaea monophora</i> NA PRESENÇA DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE CASCA DE CAULE DE <i>Croton urucurana</i>	73
QUADRO 6 – NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS E BACTÉRIAS ISOLADOS DE FOLHAS E CASCA DE CAULE DE <i>Croton urucurana</i>	75
QUADRO 7 – ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE ENDOFÍTICOS FRENTE A BACTÉRIAS E LEVEDURAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA.....	86
QUADRO 8 – PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO <i>Guignardia citricarpa</i> NA PRESENÇA DE DIFERENTES EXTRATOS DO FUNGO ENDOFÍTICO FCU 055	88
QUADRO 9 – PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO <i>Guignardia citricarpa</i> NA PRESENÇA DE DIFERENTES EXTRATOS DO FUNGO ENDOFÍTICO FCU 028	88
QUADRO 10 – DETECÇÃO DE CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES EM EXTRATOS DE <i>Croton urucurana</i>	89
QUADRO 11 – DETECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Croton urucurana</i>	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO <i>Guignardia citricarpa</i> NO TESTE DE ANTAGONISMO CONTRA FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Croton urucurana</i>	80
TABELA 2 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO <i>Fonsecaea monophora</i> NO TESTE DE ANTAGONISMO CONTRA FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Croton urucurana</i>	81

LISTA DE SIGLAS

ATCC: American Type Culture Collection

BDA: Batata Dextrose Agar

BHI: Brain Heart Infusion

CBS: Centraal Bureau Vorr Schimmelcultures

CCD: Cromatografia em camada delgada

CIM: Concentração inibitória mínima

CV%: Coeficiente de variação em porcentagem

DMS: Diferencia mínima significativa

F.V.: Fonte de variação

F: Estatística do teste F

G.L: Graus de liberdade

MH: Mueller Hinton

NCCLS: National Committee of Clinical Laboratory Standards

nr: número de repetições

OMS: Organização Mundial da Saúde

Q.M.: Quadrado médio

S.Q.: Soma de quadrado

UFPR: Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 USO DE PLANTAS COM FINS MEDICINAIS	19
3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR PLANTAS	20
3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS MEDICINAIS.COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	21
3.3.1 Quinonas	22
3.3.2 Flavonoides	23
3.3.3 Taninos	23
3.3.4 Terpenoides e Óleos Essenciais	24
3.3.5 Alcaloides	26
3.3.6 Saponinas	27
3.4 SINERGISMO ENTRE PRINCÍPIOS ATIVOS	28
3.5 <i>Croton urucurana</i>	30
3.5.1 Descrição Botânica	30
3.5.2 Uso Popular	32
3.5.3 Atividades Biológicas de <i>Croton urucurana</i>	32
3.6 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	33
3.6.1 Definição – Generalidades	33
3.6.2 Interação Planta – Endofítico.	35
3.6.3 Microrganismos como Fontes de Compostos de Interesse Médico	39
3.6.4 Endófitos Produtores de Substâncias Antimicrobianas	41
3.6.5 Cultivo de Microrganismos Endofíticos Visando à Produção de Substâncias Bioativas – Fatores que Afetam a Produção	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 MEIOS DE CULTURA	46
4.1.1 Agar Batata Dextrose – BDA	46

4.1.2 Meio BHI (Brain Hearth Infusion)	46
4.1.3 Agar Fubá	46
4.1.4 Agar Arroz.....	47
4.1.5 Agar Mueller Hinton	47
4.1.6 Caldo Extrato de Malte	47
4.1.7 Caldo Milho (fubá)	48
4.1.8 Meio Arroz Sólido	48
4.1.9 Meio Milho Sólido	48
4.1.10 Agar Nutriente	48
4.2 SOLUÇÕES E REAGENTES	49
4.2.1 Solução de Anisaldeido	49
4.2.2 Solução de Cloreto Férrico.....	49
4.2.3 Solução de Dragendorff	49
4.2.4 Solução de Hidróxido de Potássio Metanólica	50
4.2.5 Solução de Ninhidrina.....	50
4.2.6 Solução de Vanillina – Acido Sulfúrico	50
4.2.7 Solução Fisiológica.....	50
4.3 MATERIAL VEGETAL	50
4.3.1 Coleta	50
4.3.2 Identificação Botânica	51
4.3.3 Elaboração de Extratos Brutos Vegetais	51
4.3.4 Fracionamento de Extrato Bruto Metanólico de Casca do Caule de <i>Croton urucurana</i> por Cromatografia em Coluna a Vácuo	52
4.4 TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	53
4.4.1 Microrganismos Utilizados	53
4.4.2 Avaliação Preliminar da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Brutos Vegetais – Método de Difusão em Poços de Agar	53
4.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – Método da Macrodiluição	54

4.4.4 Avaliação da Ação do Extrato Bruto de Casca do Caule Sobre o Crescimento de Fungos Filamentosos – Diluição em Meio Sólido.....	55
4.5 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	56
4.5.1 Isolamento de Microrganismos Endofíticos	56
4.5.2 Conservação de Microrganismos Endofíticos.....	57
4.5.3 Identificação Microscópica de Microrganismos Endofíticos.....	57
4.5.4 Seleção de Microrganismos com Maior Potencial Antimicrobiano.....	58
4.5.4.1 Antagonismo contra fungos patogênicos – cultura pareada	58
4.5.4.2 Antagonismo dos microrganismos endofíticos contra bactérias e leveduras patogênicas humanas.....	59
4.5.5 Cultivo Visando a Produção de Metabólitos Bioativos.....	59
4.5.5.1 Cultivo em meio líquido.....	59
4.5.5.2 Cultivo em meio sólido	60
4.5.6 Extração de Metabólitos de Cultivos Fúngicos	60
4.5.6.1 Extração de metabólitos secundários de fungos cultivados em meio líquido.....	61
4.5.6.2 Extração de metabólitos secundários de fungos cultivados em meio sólido.....	62
4.5.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos de Endofíticos	62
4.5.7.1 Método de difusão em poços de agar	62
4.5.7.2 Método de disco difusão: disco de extrato vs disco de micélio	62
4.6 DETECÇÃO PRELIMINAR DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES EM EXTRATOS ATIVOS	63
4.6.1 Cromatografia em camada delgada	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 MATERIAL VEGETAL	64
5.1.1 Extratos Brutos Metanólicos.....	64
5.1.2 Avaliação Preliminar da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Brutos de Casca do Caule e Folhas de <i>Croton urucurana</i>	64
5.1.3 Fracionamento em Coluna a Vácuo.....	66

5.1.4	Concentração Inibitória Mínima dos Extratos Vegetais	66
5.1.4.1	Extratos brutos de casca do caule e folha	66
5.1.4.2	Frações do extrato bruto metanólico de <i>Croton urucurana</i>	67
5.1.5	Ação do Extrato Bruto Metanólico Sobre o Crescimento de Fungos Filamentosos – Diluição em Agar	72
5.2	MICROORGANISMOS ENDOFÍTICOS	75
5.2.1	Identificação Macroscópica e Microscópica	76
5.2.2	Seleção de microrganismos com maior potencial antimicrobiano	78
5.2.2.1	Antagonismo contra fungos patogênicos – cultura pareada	78
5.2.2.2	Antagonismo contra bactérias e leveduras patogênicas	82
5.2.3	Produção de Metabólitos a Partir de Fungos Endofíticos Cultivados em Meios Líquidos e Sólidos	82
5.2.4	Atividade Antimicrobiana dos Extratos de Endofíticos	83
5.2.4.1	Atividade dos extratos diante de <i>Guignardia citricarpa</i> e <i>Fonsecaea monophora</i>	84
5.2.4.2	Atividade dos extratos frente a bactérias e levedura	86
5.2.5	Variação da Produção de Compostos Antimicrobianos nos Diferentes Meios de Cultura	87
5.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	89
5.3.1	Cromatografia em Camada Delgada de Extratos Vegetais	88
5.3.2	Cromatografia em Camada Delgada de Extratos de Endofíticos	90
6	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS	96
	ANEXOS	119

1 INTRODUÇÃO

A bioprospecção consiste na exploração e investigação de plantas, animais e microrganismos a fim de identificar princípios ativos e ou enzimas úteis em diferentes áreas como na indústria farmacêutica e alimentícia, na agronomia entre outras. A bioprospecção também pode ser definida como o estudo da diversidade biológica com fins econômicos e sociais (STROBEL e DAISY, 2003; TRIGUEIRO, 2002).

O crescente número de pacientes imunocomprometidos, o ressurgimento de várias infecções que pareciam ter sido controladas e o preocupante aumento da resistência bacteriana criaram a necessidade de estudos no sentido de desenvolver novos agentes antimicrobianos.

As plantas utilizadas na medicina popular e os seus microrganismos endofíticos constituem uma fonte promissora na obtenção de princípios ativos com atividades biológicas de interesse, entre elas a atividade antimicrobiana. Estudos demonstraram que em determinadas plantas os microrganismos endofíticos produzem metabólitos secundários que possuem uma atividade biológica similar à atribuída à planta que coloniza (KUSARI *et al.*, 2008; EYBERGER, DONDAPATI e PORTER, 2006; PURI *et al.*, 2005).

Croton urucurana é uma árvore usada amplamente na medicina tradicional, com diversos fins medicinais, entre eles o tratamento de infecções. É muito citada em estudos etnobotânicos por sua capacidade de curar feridas infectadas na pele e micoses superficiais. Este fato faz que seja uma planta muito interessante para o aprofundamento do estudo de sua atividade antimicrobiana, assim como também o estudo dos seus microrganismos endofíticos que potencialmente podem estar exercendo uma importante influência na produção de metabólitos secundários da planta, responsáveis pela atividade medicinal atribuída ao vegetal.

Sendo assim, o presente estudo propõe avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos da planta *C. urucurana*, coletada da região oriental do Paraguai, assim como isolar e avaliar o potencial antimicrobiano e a capacidade de produção de metabólitos bioativos em diferentes meios de cultura de fungos

endofíticos da planta, como também realizar uma caracterização química preliminar dos compostos presentes nos extratos mais ativos.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de *Croton urucurana* Baill e de seus microrganismos endofíticos.

Objetivos específicos:

- Obter, fracionar e avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de folhas e casca do caule de *C. urucurana* diante de microrganismos de importância clínica e agronômica.
- Isolar fungos endofíticos de folhas e casca do caule de *C. urucurana*.
- Realizar uma triagem para detectar fungos com potencial antimicrobiano.
- Obter e avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos.
- Determinar os grupos de metabólitos secundários presentes nos extratos mais ativos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 USO DE PLANTAS COM FINS MEDICINAIS

Através da história, a medicina tradicional e sua prática permitiram conhecer o uso de plantas para o tratamento de diversas doenças. Entre os povos de América Latina existe uma antiga tradição no uso de plantas com fins curativos, porém a maioria dessas plantas não conta com suficientes estudos que proporcionem um aval científico a suas propriedades.

O uso das plantas medicinais remonta praticamente ao princípio da evolução do homem na terra. O homem pré-histórico observava o comportamento instintivo dos animais na hora de restaurar suas feridas ou paliar suas doenças. Em seu contínuo deambular, observou que certas espécies eram aptas para o consumo alimentício e outras eram tóxicas. As referidas observações deram origem ao processo intuitivo que caracterizou o homem primitivo e lhe permitiu e ele testar com diversas plantas com a finalidade de discernir quais possuíam atividades medicinais e quais não (ALONSO, 2007).

Vários achados arqueológicos demonstraram que as antigas civilizações do Egito, Grécia, China, Índia e Árabe faziam um amplo uso de plantas com fins medicinais. Na América Latina, o desenvolvimento da Fitoterapia está muito relacionado com os costumes de seus povos indígenas que possuem um conhecimento muito amplo sobre as propriedades medicinais das plantas de nossa região.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) constatou que 80 % da população mundial utilizam a medicina tradicional para atender suas necessidades primárias de assistência médica. Devido a isso, estabeleceu que os países necessitam de informação atualizada e autorizada sobre as propriedades benéficas e possíveis efeitos dos fitoterápicos (ALONSO, 2007).

As plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas têm contribuído ao longo dos anos para a obtenção de inúmeros fármacos, até hoje amplamente usados na clínica. Como exemplo, podemos citar a

morfina, a emetina, a vincristina, a colchicina, a rutina, etc (CECHINEL FILHO e YUNES, 1997).

O uso de plantas medicinais, especialmente na América Latina, contribui significativamente para os cuidados básicos com a saúde. Para o tratamento de infecções comuns, muitas plantas são utilizadas na forma de extratos brutos, infusões ou emplastos sem nenhuma evidência científica de sua eficácia (PESSINI *et al.*, 2003).

3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS POR PLANTAS

Vegetais, microrganismos e, em menor escala, animais apresentam um arsenal metabólico capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias não relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo encontram-se substâncias cuja produção e acúmulo estão restritas a um número limitado de organismos, com bioquímica e metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização (WINK, 1990). A todo esse conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (SIMÕES *et al.*, 2007).

Quando se fala das propriedades terapêuticas das plantas medicinais, é lógico que nos referimos aos princípios ativos que elas contêm para a sua utilização em diferentes patologias. Esses princípios ativos são os metabólitos secundários. Hoje em dia se aceita a idéia de que muitos dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação da planta ao seu meio. De fato, já foram reconhecidas as funções ecológicas e fisiológicas de várias dessas substâncias, por exemplo, na defesa contra herbívoros e microrganismos, a proteção contra os raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de ambientes, como compostos de reserva de nitrogênio, na mediação de interações entre bactérias simbióticas e sua planta hospedeira (WINK, 2008b; SIMÕES *et al.*, 2007; BRUNETON, 2001; HARBORNE, 1993; ROSENTHAL e BERENBAUM, 1991, 1992).

O padrão de metabólitos secundários de uma determinada planta é complexo, muda de acordo com o tecido e órgão de uma maneira específica. Regularmente, diferenças podem ser vistas entre diferentes estágios de desenvolvimento, entre indivíduos e entre populações.

Os metabólitos secundários podem estar presentes na planta em um estado ativo ou como “pró-drogas” que serão ativadas depois de um fermento ou infecção ou no corpo de um herbívoro. A biossíntese de alguns metabólitos secundários é induzida depois de um fermento ou infecção e os metabólitos secundários são feitos *de novo* (fitoalexinas) (WINK, 2003; TAPIERO, 2001). São consideradas como fitoalexinas compostos antimicrobianos de baixo peso molecular os quais são sintetizados *de novo* após a infecção, a partir de precursores remotos com gasto energético por parte da planta (TAPIERO, 2001; VANETTEN *et al.*, 1994). Além da atividade antimicrobiana desses compostos, também se atribui uma atividade antiproliferativa e preventiva de câncer das fitoalexinas extraídas de plantas e testadas em modelos animais (MEZENECV *et al.*, 2003).

Inúmeras evidências experimentais sustentam o fato de que muitos metabólitos secundários como os alcaloides, glicosídeos cianogênicos, terpenos, saponinas, taninos, antraquinonas são aleloquímicos que representam caracteres adaptativos e que têm se diversificado durante a evolução pela seleção natural a fim de proteger as plantas contra vírus, bactérias, fungos, plantas concorrentes e contra os herbívoros (WINK, 2003).

3.3 METABÓLITOS DE PLANTAS MEDICINAIS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As plantas são conhecidas como produtoras de constituintes químicos que são de natureza tóxica para bactérias e fungos. Vários estudos demonstraram que uma ampla gama de plantas possui atividade antimicrobiana *in vitro*. O estímulo para a síntese de metabólitos com atividade antimicrobiana nas plantas pode produzir-se na presença de frações de polissacarídeos (elicitores) presentes na parede celular de patógenos (TAPIERO, 2001; DEMAIN, 1998). Vários tipos de metabólitos secundários de plantas foram relacionados com a atividade antimicrobiana:

compostos fenólicos (quinonas, flavonoides e taninos), terpenoides e óleos essenciais, alcaloides, saponinas e carotenoides.

A seguir serão descritas as características dos citados metabólitos secundários e trabalhos que demonstraram o seu potencial antimicrobiano.

3.3.1 Quinonas

Quinonas são anéis aromáticos com duas cetonas. São ubíquas na natureza e são caracteristicamente de alta reatividade. As quinonas podem ser consideradas como produtos de oxidação de fenóis; da mesma forma, a redução de quinonas pode originar os correspondentes fenóis. Sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado, com pelo menos duas ligações duplas C-C (COWAN, 1999; SIMÕES *et al.*, 2007). É conhecido que as quinonas formam complexos irreversíveis com aminoácidos nucleofílicos em proteínas, muitas vezes levando à inativação da proteína e perda de função. Por esse motivo, o potencial de efeitos antimicrobianos de quinonas é grande. Prováveis alvos na célula microbiana são as adhesinas expostas na superfície, polipeptídeos da parede celular e enzimas unidas à membrana (COWAN, 1999).

Em geral, aceita-se a teoria de que certas quinonas tenham um papel na defesa da planta contra insetos e outros patógenos. Na quina (*Cinchona ledgeriana*, Rubiaceae) só foram encontradas antraquinonas em partes da planta infectadas com fungos patogênicos para a espécie (WIJNSMA *et al.*, 1986).

Brandell *et al.* (2004) evidenciaram que a complexação de metais é um dos mecanismos envolvidos na atividade antimicrobiana de naftoquinonas. As naftoquinonas são responsáveis pelas atividades antibacteriana, antifúngica e antitumoral de extratos de *Kigelia pinnata*, Bignoniaceae (HOUGHTON *et al.*, 1994; BINUTO *et al.*, 1996).

Decosterd *et al.* (1993) demonstraram atividade inibitória da replicação do vírus HIV pela naftoquinona trimérica, conocurvona isolada de *Conospermum incurvum* Lindl. Proteaceae. Em outro estudo, Agarwal *et al.* (2000) comprovaram a atividade antifúngica das quinonas reina, fisciona, aloe-emodina e crisofanol isoladas de *Rheum emodi*, Polygonaceae.

3.3.2 Flavonoides

Flavonóides são também substâncias fenólicas hidroxiladas que ocorrem como unidades $C_6-C_3-C_6$. Uma vez que foi conhecido que esses compostos são sintetizados pelas plantas em resposta a infecções microbianas (DIXON, 1983), não é surpresa que tais compostos demonstrem atividade antimicrobiana *in vitro* contra um amplo espectro de microrganismos. Essa atividade deve-se provavelmente à habilidade de formar complexos com proteínas solúveis extracelulares e com a parede bacteriana. Os flavonoides mais lipofílicos podem também romper as membranas microbianas (TSUCHIYA *et al.*, 1996).

As catequinas, que são a forma mais reduzida de unidades C_3 em compostos flavonoides, tem sido amplamente pesquisadas devido a sua ocorrência no chá verde (*Camellia sinensis*). Esses compostos demonstraram sua capacidade de inibir a enzima glicosiltransferase de *Streptococcus mutans* (NAKAJARA, 1993). As flavonas diosmina e hesperidina inibem a replicação do rotavírus, agente etiológico de diarreias (BAE *et al.*, 2000). Em outro estudo, Marasciulo *et al.* (2006) isolaram um flavonoide glicosilado com atividade antimicrobiana das partes aéreas de *Pavonia distinguenda*.

3.3.3 Taninos

Tanino é um nome comum para nomear um grupo de substâncias poliméricas fenólicas que são capazes de curtir o couro e precipitar gelatina, propriedade conhecida como adstringência. O peso molecular desses compostos varia entre 500 a 3000, e são encontrados em quase todo tipo de parte de plantas: casca, madeira, folhas, frutos e raízes (SCALBERT, 1991).

O papel biológico dos taninos nas plantas tem sido investigado e acredita-se que eles estejam envolvidos na defesa química das plantas contra o ataque de herbívoros vertebrados ou invertebrados e contra microrganismos patogênicos (SIMÕES *et al.*, 2007). Esse grupo de compostos recebe grande atenção de pesquisadores devido a que se acredita que o consumo de bebidas que contêm taninos, como chás e vinhos, podem prevenir e curar uma grande variedade de

doenças (COWAN, 1999). Min *et al.* (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos ricos em taninos de diferentes plantas lenhosas, e os resultados indicaram que a fonte e concentração são importantes fatores que influenciam a atividade antimicrobiana.

Vários autores relacionaram a atividade antimicrobiana de extratos vegetais com a presença de taninos nesses extratos: Souza *et al.* (2007) com extratos de casca de *Stryphnodendron adstringens*, Djipa, Delmée e Leclerq (2000), com extratos de caule de *Syzygium jambos*. Eles demonstraram que a eliminação de taninos dos extratos suprimia a atividade antimicrobiana. Também Grujić-Vasić *et al.* (2006) observaram a atividade antimicrobiana de frações ricas em taninos da planta *Potentilla alba*.

Existem três hipóteses para o mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos: a primeira hipótese pressupõe a inibição de enzimas de bactérias e fungos e/ou complexação dos substratos dessas enzimas; a segunda seria a ação dos taninos sobre membranas celulares de microrganismos, modificando o seu metabolismo. Finalmente a terceira hipótese menciona a complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo assim a disponibilidade destes elementos essenciais para o metabolismo dos microrganismos (SIMÕES *et al.*, 2007; HASLAM, 1996).

Os taninos e outros compostos fenólicos possuem um grande número de grupos hidroxila que podem formar várias ligações de hidrogênio e iônicas com todo tipo de proteínas. As proteínas mudam a sua conformação quando o complexo tanino- proteína é formado e, portanto, perdem sua atividade e função (WINK, 2003).

3.3.4 Terpenoides e Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são responsáveis pela fragrância das plantas. Esses óleos são metabólitos secundários que estão altamente enriquecidos com compostos com estrutura base do isopreno. Estes compostos são chamados monoterpenos, a estrutura química geral é $C_{10}H_{18}$ e eles também podem existir como diterpenos, triterpenos e tetraterpenos (C_{20} , C_{30} , C_{40} respectivamente), assim também como hemiterpenos e sesquiterpenos, e também como hemiterpenos (C_5) e sesquiterpenos

(C₁₅). Quando os compostos contêm elementos adicionais, usualmente oxigênio, são chamados de terpenoides (SIMÕES *et al.*, 2007; COWAN, 1999).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos terpenos não foi ainda completamente elucidado, porém supõe-se que envolve uma ruptura da membrana por meio dos compostos lipofílicos. De acordo com Mendoza *et al.* (1997), aumentando a hidrofiliabilidade de caureno diterpenoides, diminui drasticamente a atividade antimicrobiana. Terpenos lipofílicos são solúveis em biomembranas. Em altas concentrações, eles podem interagir com canais iônicos, transportadores e receptores presentes nas membranas e assim mudar a conformação e bioatividade.

Hernandez *et al.* (2005) demonstraram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cordia curassavica* contra bactérias grampositivas e gramnegativas e contra os fungos *Rhizoctonia solani* e *Trichophyton mentagrophytes*.

Em 2008, Costa *et al.* avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies de *Guateriopsis blepharophylla*, *G. friessiana* e *G. hispida* contra 11 espécies de microrganismos. O óleo de *G. fressiana* exibiu significativa atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, enquanto que *G. hispida* e *G. blepharophylla* tiveram potente atividade contra *Rhodococcus equi* com concentração inibitória mínima (CIM) de 50 µg/mL. A composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Lippia alba* (Verbenaceae) obtidas de duas diferentes regiões do Brasil (Paraná e Rondônia) foram pesquisadas por Nogueira *et al.* (2007); houve diferença quanto à composição química e atividade dos óleos obtidos.

O sesquiterpeno cinamoyloxy-1-hydroxieuodesm-4-em 3-ona, proveniente de raízes de *Vernonathura tweediana*, isolado e identificado por Portillo *et al.* (2005) demonstrou-se particularmente efetivo contra o fungo *Trichophyton mentagrophytes* (CIM: 4 µg/mL).

A eficácia do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (campim-limão) em inibir o crescimento de bactérias grampositivas e negativas e fungos causadores de micoses superficiais e sistêmicas foi demonstrada por Guerra Ordonez *et al.* (2004).

Hammer *et al.* (2003) estudaram a atividade antifúngica dos componentes do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), que é amplamente utilizado em formulações fitoterápicas e cosméticas. Os compostos terpinen-4-ol, α terpineol, linalool, α -pineno e β -pineno e 1,8-cineol foram os mais ativos (com CIMs < 0,25%) contra linhagens ATCC e isolados clínicos de leveduras e fungos filamentosos.

3.3.5 Alcaloides

Alcaloides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos e são encontrados predominantemente nas angiospermas. Na sua grande maioria, possui caráter alcalino, com exceções tais como colchicina, piperina, oximas e alguns sais quaternários, como cloridrato de laurifolina (KUTCHAN, 1995; EVANS, 1996).

Assim como outros metabólitos secundários, os alcaloides também possuem um comprovado papel na defesa contra a invasão de microrganismos e vírus (WINK, 1993). Essa função pode ser exemplificada pelo aumento da concentração de solanina em batatas quando estas estão sendo atacadas por microrganismos. Também como exemplo dessa função pode-se citar a produção de sanguinarina, um alcalóide com elevada atividade antimicrobiana, em culturas celulares de *Eschscholzia californica*, após o tratamento com filtrados derivados de fungos. (SCHUMACHER *et al.*, 1987). Mais recentemente, Singh *et al.* (2009) isolaram os alcaloides isoquinolínicos hunnemanine e norsanguinarine desta mesma planta e observaram a atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Alternaria brassicae*, *Helminthosporium penniseti* *Fusarium lini* e *Curvularia maculans*.

Souza, Stingham e Santos (2004) demonstraram a atividade antimicrobiana da fração alcaloídica de um extrato de caule de *Himatanthus lancifolius*, os alcaloides do tipo indólico são os principais compostos químicos presentes no gênero *Himatanthus*. Tanaka *et al.* (2006) também demonstraram a atividade antibacteriana de alcaloides de *Aspidosperma rímiflorum*. A partir de um extrato metanólico foi realizado o fracionamento bioguiado até a obtenção dos alcaloides indólicos ramiflorine A e B. Ambos apresentaram significativa atividade contra *S. aureus* (CIM: 25 μ g/mL) e *E. faecalis* (CIM 50 μ g/mL).

Alcaloides diterpénicos, comumente isolados de plantas da família Ranunculaceae, frequentemente apresentam atividade antimicrobiana (ATTA-UR e CHOUDLHARY, 1995; OMULOKOLI, KHAN e CHHABRA, 1997).

Karou *et al.* (2006) estudaram a atividade antibacteriana de um arbusto, *Sida acuta* (Malvaceae). Os alcaloides indoloquinolínicos demonstraram boa atividade antimicrobiana contra bactérias grampositivas. Em 1999, Navarro e Delgado isolaram dois alcalóides, dihidrocheleritrina e dihidrosanguinarina a partir das partes aéreas de *Bocconia arbórea*. Os dois compostos demonstraram uma importante atividade antimicrobiana contra bactérias grampositivas e negativas e contra a levedura *Candida albicans*.

3.3.6 Saponinas

Saponinas são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos. Este tipo de estrutura, que possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra hidrofílica (açúcares), determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e sua ação detergente e emulsificante. O comportamento anfifílico das saponinas e a capacidade de formar complexos com esteroides, proteínas e fosfolipídios de membranas determinam um número variado de propriedades biológicas para essas substâncias, destacando-se a sua ação sobre membranas celulares, formando poros, produzindo vazamento das células e alterando a sua permeabilidade; um amplo efeito citotóxico ou antimicrobiano é geralmente consequência desta interação (SIMÕES *et al.* 2007; WINK, 2003).

Diversos autores (AMOROS *et al.*, 1988; HUDSON, 1990; DETOMMASI *et al.*, 1991; KASHIWADA *et al.* 1998; SIMÕES *et al.*, 1999; KRISHNAN, GOPIESH e HAMEED, 2010) demonstraram a atividade antiviral de saponinas isoladas das plantas medicinais *Glycyrrhiza glabra* L., *Gymnema sylvestre* (Retz.), *Anagallis arvensis* L.; *Calendula arvensis* L., *Bupleurum falcatum* L.; *Guettarda platypoda* e *Eclipta prostrata*.

Com relação à atividade contra bactérias, Mandal, Babu e Mandal (2005) observaram a atividade antibacteriana contra *B. megaterium*, *S. typhimurium* e *P. aeruginosa* de saponinas extraídas de *Acacia auriculiformis*. Avato *et al.* (2006)

avaliaram extratos de saponinas e sapogeninas obtidas das plantas *Medicago sativa*, *M. arborea* e *M. arábica* e observaram uma grande atividade especialmente contra bactérias grampositivas. Este resultado está em conformidade ao observado por Soetam *et al.* (2006), que detectaram atividade antibacteriana de saponinas extraídas de *Sorghum bicolor* contra *S. aureus*, porém *Escherichia coli* mostrou resistência.

Também a atividade antifúngica de saponinas contra fungos filamentosos e leveduras foi demonstrada por Mandal, Babu e Mandal (2005) e Miyakoshi *et al.* (2000). Leveduras deteriorantes de alimentos, leveduras formadoras de biofilme e fungos dermatofílicos demonstraram sensibilidade a saponinas monodesmosídicas isoladas de *Y. schidigera*. O mecanismo sugerido para a atividade antifúngica das saponinas é sua interação com os esteróis da membrana fúngica (FRANCIS *et al.*, 2002).

3.4 SINERGISMO ENTRE PRINCÍPIOS ATIVOS

Os metabólitos secundários frequentemente contêm mais de um grupo funcional, por conseguinte, com frequência exibem múltiplas funcionalidades e bioatividades. Além disso, os metabólitos secundários estão presentes em complexas misturas constituídas por vários tipos estruturais. Esta estratégia garantirá uma interferência com mais de um alvo molecular em herbívoros e micróbios, e pode assim proteger a planta contra uma ampla variedade de inimigos (WINK, 2003).

Mesmo que a interação individual de um metabólito secundário particular possa ser inespecífica e fraca, a soma de todas as interações leva a um efeito substancial (WINK, 2003). Muroi e Kubo (1993) analisaram a atividade antibacteriana do chá verde (*Camellia sinensis*). Eles demonstraram um sinergismo na combinação de hidrocarbonetos de sesquiterpenos (δ -candineno e β -cariofileno) com o indol, combinação que faz com que a atividade antimicrobiana se incremente entre 128 a 256 vezes.

A ação das plantas medicinais pode nunca ser completamente compreendida, analisando os seus componentes separadamente. Os defensores dessa teoria argumentam que as propriedades são devidas às interações entre os

múltiplos constituintes (KLIGER *et al.*, 2004; THOISON *et al.*, 2004 e WINK, 2008b). Estas interações são conhecidas como sinergia química. Este efeito existe, no caso de plantas medicinais, quando a ação dos compostos juntos é maior que a soma aritmética da ação individual dos componentes (CSEKE *et al.*, 2006).

Wu *et al.* (2002) salientaram que os efeitos alelopáticos usualmente resultam de um grupo de constituintes, que frequentemente demonstram sinergismo, em vez de a ação ser devida a um só composto. Essa estratégia protege contra várias pestes e desestimula o desenvolvimento de resistências, como comumente ocorre quando um único composto químico é usado como inseticida (CSEKE *et al.*, 2006).

Outro exemplo de sinergismo pode ser observado na ação das saponinas presentes em muitas plantas medicinais, estas aumentam a absorção e atividade de outras substâncias. As saponinas do jaboncillo japonês (*Sapindus mukorossi*) aumentam a absorção intestinal de certos antibióticos naturais. De igual maneira, as saponinas do ginseng (*Panax ginseng*) ajudam a solubilizar os componentes insolúveis da raiz da planta (ALONSO, 2007). Também, Delucca *et al.* (2006) comprovaram que uma saponina, CAY-1, isolada de *Capsicum annum* melhorou significativamente a atividade dos antifúngicos convencionais anfotericina B e itraconazol contra três espécies de *Aspergillus* e *Candida albicans*.

O látex obtido de *Croton lechleri*, mediante ensaios hemolíticos *in vitro*, mostrou uma potente atividade inibitória das vias clássicas e alternativa do sistema do complemento. O efeito do látex é maior do que o apresentado pela taspina (um alcaloide isolado do látex) que produz inibição sobre a via clássica e não mostra efeito sobre a via alternativa (VANACLOCHA e CANIGUERAL, 2004).

Esta lição da natureza, o uso de múltiplas substâncias como medida defensiva, é a mesma estratégia que está ganhando reconhecimento na medicina (CSEKE *et al.*, 2006). O uso de “coquetéis” de vários fármacos em doses menores frequentemente demonstra-se mais efetivo que um só fármaco em alta dosagem. Na infecção por HIV (Human Immunodeficiency vírus), os coquetéis de fármacos têm afetado grandemente o tratamento dos pacientes. As combinações de drogas contra o HIV atuam sinergicamente e demonstraram uma parcial restauração do sistema imune e redução da doença e morte (BULGHERONI *et al.*, 2004; LEDERMAN *et al.*, 1998). A combinação de topotecan com vincristina (ambos compostos derivados de

plantas) em vários cânceres infantis demonstrou ação sinérgica em muitos modelos de tumores pediátricos sólidos (THOMPSON *et al.*, 1999). Infecções bacterianas são também tratadas com combinações sinérgicas. A infecção por *Enterococcus faecium* vancomicina resistente, tratada com ampicilina e doxiciclina demonstrou uma atividade benéfica, usualmente exibindo sinergismo ou, ao menos, efeitos aditivos (BROWN e FREEDMAN, 2004).

Ezra *et al.* (2004) analisaram a atividade antimicrobiana de compostos individuais e misturas produzidas por isolados do fungo endofítico *Muscodor albus*. A mistura mais ativa foi a composta por naftaleno, ácido propanoico e butanol, na proporção 9:45,5:45,5. O fungo patogênico *Pythium ultimum* respondeu com 100% de inibição à citada mistura, depois de 6 dias de exposição, com uma concentração inibitória mínima (CIM₁₀₀) de 15 µL no vial de teste. Os compostos isolados puros: naftaleno, ácido propanoico e butanol tiveram CIM₁₀₀ de 100 µL ou maiores.

3.5 *Croton urucurana* Baill

3.5.1 Descrição Botânica

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Malpighiales

Família: Euphorbiaceae

Sub família: Crotonoiedae

Gênero: *Croton*

Espécie: *Croton urucurana* Baill

Croton urucurana Baill é uma árvore de 4 a 15 metros de altura, copa aberta e caule claro, com até 20 cm de diâmetro (FIGURA 1). Os ramos jovens são tomentosos, os adultos pubérulos, indumento alvacento e ferrugíneo, tricomas estrelados, resina avermelhada, cor sangue. As folhas medem 7,5-13,5 cm x 5-10,5 cm, palmatinervas, cordadas a oval-lanceoladas, membranáceas, face adaxial ferrugíneo-tomentosa, nas folhas jovens, pubérula nas adultas, face abaxial

tomentosa, tricomas estrelados, alvacenta, ferrugínea nas nervaduras, margem inteira, base cordada ou auriculada. Ápice acuminado, pecíolo de 6-9 cm de comprimento, tomentosos, com 2 a 4 glândulas pateliformes no ápice, estípulas com 1,0-1,5 cm de comprimento, foliáceas. As inflorescências medem de 10 a 25 cm de comprimento, em forma de racimos. As flores são esbranquiçadas, estaminadas e pistiladas, reunidas em fascículos ou estaminadas em cima das pistiladas. O fruto mede de 5-6,5 mm de diâmetro, é globoso, pubescente, muricado, mericarpos pouco acentuados, cálices persistente durante o amadurecimento. As sementes medem 3,5-4 mm de comprimento, são de cor castanha, estriada na face dorsal (CAVALCANTE, 2006; PAOLI, 1995).

Exclusiva ou predominante de matas ciliares ou de várzeas, ocorrendo em solos permanentemente muito úmidos, encharcados ou brejosos, sujeitos a inundações periódicas, sendo pouco frequentes nas matas de terra firme, e, portanto, indicada para plantios mistos em áreas ciliares degradadas (SALVADOR, 1987; CATHARINO, 1989; LUCHI; 2004). É uma árvore comumente encontrada no Paraguai, norte da Argentina, sul do Brasil e no Uruguai. É conhecida popularmente com os seguintes nomes: Sangue da água, sangue de drago, sangue de grado, capixingui, urucuana, lucurana, tapexingui, tapixingui.

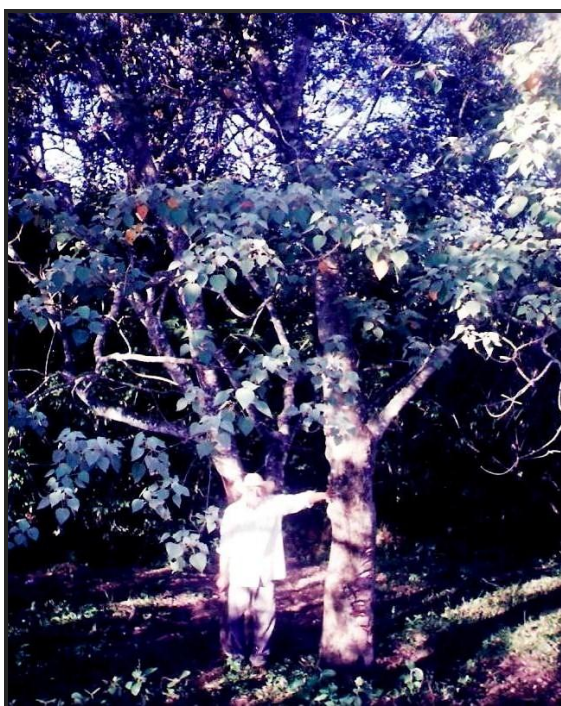


FIGURA 1 – *Croton urucurana* Baill

Entre as espécies do gênero *Croton*, além de *C. urucurana*, existem outras que também são popularmente conhecidas como sangue de dragão: *C. lechleri*, *C. salutaris*, *C. palanostigma*, *C. draconoides*, *C. erythrochilus* entre outras (DI STASI, 2003; VANACLOCHA e CANIGUERAL 2003; GUPTA, BLEALEY e GUPTA, 2008). Ainda o nome de sangue de dragão é utilizado para designar resinas e exudatos de cor avermelhada, obtidos de plantas de diferentes gêneros: *Croton* (Euphorbiaceae), *Dracaena* (Dracaneaceae), *Daemonorops* (Palmaceae) e *Pterocarpus* (Fabaceae) (GUPTA, BLEALEY e GUPTA, 2008).

3.5.2 Uso Popular

A medicina popular atribui inúmeras propriedades medicinais à planta: é utilizada para tratar câncer, hemorragias internas, no tratamento de aftas bucais, cicatrizante de úlceras, feridas externas e micoses superficiais. Também no tratamento de bronquites, asma, anemia, transtornos renais, disenterias, reumatismo, infecções vaginais, no tratamento de dor de dente entre outros usos (GONZALEZ TORRES, 1997; LORENZI e ABREU DE MATTOS, 2002; GURGEL *et al.*, 2002).

As partes da planta utilizadas com fins medicinais são: folhas, casca do caule e látex ou resina da casca do caule.

3.5.3 Atividades Biológicas de *Croton urucurana*

O primeiro estudo descrito na literatura em relação à atividade antimicrobiana de *Croton urucurana* foi o trabalho realizado por Peres *et al.* (1997). Os autores avaliaram a atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* do extrato etanólico aquoso, algumas frações e as substâncias puras, catequina e ácido acetil aleurítico isolados da casca do caule dessa espécie.

Gurgel *et al.* (2005) demonstraram a atividade antifúngica do látex de *Croton urucurana* contra fungos causadores de micoses de peles, os dermatófitos *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporium canis* e *Epidermophyton floccosum*.

A atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial da casca do caule de *Croton urucurana* foi avaliada por Simionatto *et al.* (2007). Os microrganismos mais sensíveis ao óleo foram *S. epidermidis* e *E. coli* (CIM= 1,25 mg/mL) enquanto que os mais resistentes foram *B. subtilis* e *C. albicans* (CIM= 10 mg/mL). Foi detectada atividade antioxidante e análises por Cromatografia gasosa (CG) e Cromatografia gasosa – Espectrometria de massas (CG-EM) revelaram os principais compostos da fração com melhor atividade antioxidante: α -bisabolol (38,3%), α -eudesmol (9,3%) e guaiol (8,2%).

Gurgel *et al.* (2002a) avaliaram a atividade antidiarreica do látex de *Croton urucurana*. Foi detectado um potente efeito inibitório da diarreia induzida por óleo de rícino. Também foi avaliado o modelo de secreção intestinal em ratas, induzido pela toxina colérica. O látex de *C. urucurana* (600 mg/kg) produziu uma significativa inibição da secreção intestinal.

Esmeraldino *et al.* (2005) avaliaram a atividade antihemorrágica da casca do caule de *C. urucurana* por duas metodologias: análise gráfica computadorizada do halo de hemorragia e quantificação da hemoglobina no halo hemorrágico. Foi demonstrado que o extrato aquoso da casca do caule de *C. urucurana* antagoniza a atividade hemorrágica do veneno de *Bothrops jararaca*, e que as proantocianidinas estão envolvidas nessa atividade.

Vários compostos com atividade analgésica foram identificados na casca do caule de *C. urucurana*: campesterol, β -sitosterol, stigmasterol, ácido acetil aleurítico, catequina, galocatequina e glicosídeo de sitosterol (PERES *et al.*, 1998). A comparação entre a potência analgésica dos extratos e dos compostos puros sugere que existem outros compostos com maior potência e que provavelmente se encontram em uma proporção muito pequena, ou que exista um sinergismo entre os princípios ativos.

3.6 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

3.6.1 Definição – Generalidades

Os microrganismos endofíticos são todos aqueles que podem ou não crescer em meios de cultura e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos a seu hospedeiro (AZEVEDO E ARAÚJO, 2007).

O estudo dos microrganismos endofíticos tem aumentado substancialmente nos últimos 20 anos, pois foi observado que essa comunidade apresenta um importante papel no desenvolvimento da planta hospedeira. Algumas espécies de microrganismos endofíticos são produtoras de fármacos, por exemplo, antitumorais e antibióticos, e outras produzem fatores de crescimento do vegetal, toxinas e enzimas (FAVARO, 2009; GU, 2009; KJER *et al.*, 2009; BORGES, 2008; KUSARI *et al.*, 2008; RALPHS *et al.*, 2008; CHANDRA PAUL *et al.*, 2007; EYBERGER, DONDAPATI e PORTER, 2006; REDKO *et al.*, 2006; FIGUEIREDO, 2006; BERDY, 2005; CAFFEU, 2005; PURI, *et al.*, 2005; EZRA e STROBEL, 2004; CASSADY *et al.* 2004; STROBEL e DAISY, 2003; DOS SANTOS, 2003; ARAUJO *et al.*, 2002; HELLWING *et al.*, 2002; STROBEL, 2002; SCHULZ *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2002; STIERLE, STROBEL e STIERLE, 1993).

A espécie hospedeira, as interações entre os endofíticos e o hospedeiro, interações inter e intraespecíficas dos endofíticos, tipo e idade do tecido, distribuição geográfica, tipo de colonização fúngica, condições de cultura, esterilização superficial e seletividade do meio de cultura podem influenciar na eficiência da estratégia de amostragem para a detecção de microrganismos endofíticos (STONE, POLISHOOK e WHITE, 2004; BACON e WHITE, 1994; PETRINI, 1986).

Investigações detalhadas da microbiota interna de plantas frequentemente levam à descoberta de novos taxons e também revelam novas distribuições de espécies conhecidas (STONE, POLISHOOK e WHITE, 2004).

Até agora os endofíticos ainda não têm sido amplamente explorados em relação a suas propriedades terapêuticas. Um único endófito pode ser capaz de produzir não só um, mas vários metabólitos bioativos (RAMASAMY *et al.*, 2009). Os microrganismos endofíticos são uma fonte rica e confiável de novos compostos bioativos farmacologicamente ativos e com grande potencial na medicina e agricultura (STROBEL, 2002; TAN e ZOU, 2001).

Devido ao fato de que só uma pequena parte de plantas potencialmente hospedeiras de endofíticos tem sido estudada, os fungos endofíticos podem representar um número consideravelmente alto de fungos ainda não descobertos (ARNOLD, MAYNARD e GILBERT, 2000; STONE *et al.*, 1996).

3.6.2 Interação Planta – Endofítico

Os fungos endofíticos gastam uma parte ou a totalidade de seu ciclo de vida dentro dos tecidos da planta hospedeira e estabelecendo uma relação com o hospedeiro que pode variar de uma simbiose a uma ligeira patogenicidade (KJER *et al.*, 2009).

A natureza e o papel biológico dos fungos endofíticos na planta hospedeira são variáveis. É conhecido que fungos endofíticos têm uma relação mutualista com seus hospedeiros, frequentemente protegem a planta contra o ataque de herbívoros, ataque de insetos e a invasão dos tecidos por patogênicos (SCHULZ *et al.*, 2002; CANNON e SIMMONS, 2002; AZEVEDO *et al.* 2000, SIEGEL, LATCH e JOHNSON, 1985; YANG *et al.*, 1994). Também podem melhorar o crescimento da planta hospedeira. Em algumas instâncias, um endofítico pode sobreviver como um patógeno latente causando infecções quiescentes por longos períodos e produz sintomas só quando condições fisiológicas ou ecológicas favorecem a virulência (BETTUCCI e SARAVAY, 1993; CARROLL, 1986).

Alguns fungos endofíticos aparentemente são capazes de produzir metabólitos secundários e contribuir com as defesas químicas da sua planta hospedeira (WINK, 2008b).

As interações metabólicas entre os endofíticos e seus hospedeiros podem favorecer a síntese de metabólitos secundários biologicamente ativos (SCHULZ *et al.*, 2002). Alguns trabalhos demonstraram que na relação micróbio-planta, endofíticos contribuem com substâncias que possuem vários tipos de bioatividade, tais como atividade antibacteriana e antifúngica (RADU e YOKE, 2002). Os endófitos colonizam tecidos vegetais internos e obtêm nutrição e proteção da planta hospedeira. Em troca, eles produzem metabólitos funcionais que melhoram o estado da planta (TAN e ZOU, 2001).

Em todas as interações endofíticas, o caráter assintomático de colonização dá-se através de um equilíbrio de antagonismos, entre a virulência do microrganismo e a defesa da planta, na qual há produção de metabólitos de interesses opostos por parte de ambos, pois os microrganismos secretam enzimas e outros metabólitos, necessários ao processo de infecção, e a planta, por sua vez produz metabólitos

responsáveis pela contenção da infecção (SCHULZ e BOYLE, 2005). Porém nessa interação, ocorrem benefícios tanto para a planta como para os microrganismos endofíticos: os metabólitos produzidos pelos endofíticos podem melhorar o crescimento e competitividade do hospedeiro, incrementando a resistência a herbívoros, patógenos e outros estresses abióticos. Em troca os endofíticos são supridos com nutrientes e proteção pela planta (KJER *et al.*, 2009; RALPHS, CREAMER e BAUCOM, 2008; SAIKKONEN *et al.*, 1998).

Os patógenos superam o sistema defensivo das plantas, por exemplo, reduzindo as concentrações de metabólitos fenólicos de defesa (AGRIOS, 1997 *apud* SCHULZ *et al.*, 2002). Em contraste quando as raízes são colonizadas por endofíticos, a concentrações desses metabólitos são as mesmas do controle ou ainda maiores (SCHULZ *et al.*, 1999). Por exemplo, quando as raízes do lariço são inoculadas com *Cryptosporidiopsis sp.*, as concentrações de proantocianidinas solúveis incrementam-se em comparação com o controle; quando está infectada com o patógeno *Heterobasidium annosum*, a concentração decresce (SCHULZ *et al.*, 2002).

Os endofíticos permanecem quiescentes ao longo do período de vida do hospedeiro, logo podem interceptar e utilizar os metabólitos mobilizados durante o período de senescência precoce (CHAPELA e BODDY 1988; GRIFFITH e BODDY, 1988; BODDY e GRIFFITH, 1989). As interações competitivas entre os endofíticos com a posterior invasão de fungos saprobios podem ser responsáveis pela grande produção de metabólitos antagônicos pelos fungos endofíticos (STONE, POLISHOOK e WHITE, 2004).

Os microrganismos endofíticos não somente sintetizam metabólitos para competir com os epifíticos e com os patógenos a fim de colonizar o hospedeiro, mas presumivelmente também para regular o metabolismo do hospedeiro em sua associação delicadamente equilibrada (SCHULZ *et al.*, 2002).

A estreita relação entre microrganismos endofíticos e seus hospedeiros envolve processos de coevolução, que podem influenciar os mecanismos fisiológicos da planta (REDKO *et al.*, 2006; MISAGHI e DONNDELINGER, 1990).

Apesar de as plantas superiores desenvolverem uma variedade de mecanismos de resistência para prevenir a infecção pela maioria dos fungos oportunistas, os fungos simbióticos, incluindo os endofíticos, evoluíram com suas plantas hospedeiras e se adaptaram a elas. Estas adaptações incluem reconhecimento do hospedeiro, meios para superar e complementar as defesas do hospedeiro, mecanismos de fixação ao hospedeiro, indução da germinação dos esporos pelo hospedeiro e diversificação das estruturas de infecção (STONE *et al.*, 1994).

A produção de dois alcaloides macrocíclicos com atividade antibiótica, produzidos pelo fungo endofítico *Acremonium zeae* tem sido implicada na proteção da sua planta hospedeira, o milho, contra fungos fitopatogênicos e produtores de micotoxinas *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* (WICKLOW *et al.*, 2005).

Os extratos de plantas utilizados na medicina tradicional podem ter suas atividades influenciadas de grande maneira pelos microrganismos endofíticos presentes nelas. A questão é se a atividade da planta é produzida pela própria planta ou é consequência de uma relação mutualista entre microrganismos benéficos em seus tecidos (RADU e YOKE, 2002).

Vários autores demonstraram que as atividades biológicas dos microrganismos e, por conseguinte, os metabólitos secundários produzidos pelos mesmos são semelhantes aos produzidos pela planta hospedeira. Exemplos deste fato são os estudos realizados por Stierle, Strobel e Stierle (1993) que isolaram um endofítico, *Taxomyces andreana*, produtor de taxol da planta *Taxus brevifolia*. Puri *et al.* (2005) descobriram que um fungo endofítico isolado de *Nothapodytes foetida* tem a capacidade de produzir camptotencina um alcaloide que apresenta uma considerável atividade antitumoral, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da topoisomerase I, enzima presente em altas concentrações nos tumores.

Eyberg, Dondapati e Porter (2006) demonstraram a capacidade de um fungo endofítico da espécie *Phialocephala fortinni*, isolado de rizomas da planta *Podophyllum peltatum*, em produzir podofilotoxina, uma valiosa lignana utilizada para o tratamento de infecções por vírus do papiloma humano, e como precursora de drogas antitumorais etopósido, tenipósido e fosfato de etopósido.

Mais recentemente, Kusari *et al.* (2008) revelaram a capacidade de um fungo endofítico isolado do caule de *Hypericum perforatum* em produzir hipericina, uma antraquinona bastante utilizada em preparações fitoterápicas para o tratamento da depressão. A planta é conhecida popularmente como erva de São João.

Redko *et al.* (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de *Erythrina crista galli*, (planta medicinal utilizada popularmente para tratamento de infecções), e os extratos de um fungo endofítico isolado da planta, *Phomopsis sp.* O extrato de acetona de ramos jovens de *Erythrina crista-galli* inibiu o crescimento de *Bacillus brevis* ATCC 9999 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633. O extrato de *Phomopsis sp.* foi também ativo contra esses microrganismos e também contra *Micrococcus luteus* ATCC 381, *Enterobacter dissolvens* LMG 2683, *Nematospora coryli* ATCC 10647, *Penicillium notatum* coleção IBWF e *Paecilomyces variotti* ETH 114646. Foram comparados os perfis de HPLC do extrato de galhos velhos da planta e do extrato de micélio do fungo e foram encontrados dois compostos comuns.

No Brasil e na maioria dos países da América Latina, a maioria das investigações de fontes de novos fármacos concentra-se em plantas (RAMOS, 2008). Porém, os citados estudos de Stierle, Strobel e Stierle (1993); Eyberg, Dondapati e Porter (2006); Redko *et al.* (2006); Kusari *et al.* (2008) confirmam a importância de uma nova abordagem na pesquisa de atividade das plantas medicinais, as quais deveriam não só ser focalizadas nos extratos vegetais como também nos microrganismos endofíticos presentes no vegetal.

Schulz *et al.* (2002) concluíram que a pesquisa das atividades biológicas produzidas por microrganismos endofíticos não é aleatória, já que as atividades biológicas e os metabólitos produzidos estão associados como o respectivo biótopo e ou hospedeiro.

Wink (2008b) sugere que a produção de metabólitos secundários comuns entre a planta hospedeira e seus microrganismos endofíticos pode ser devida a uma transferência lateral de genes que ocorreu durante o processo de evolução. Isso explicaria o motivo pelo qual tanto a planta como os microrganismos endofíticos sejam capazes de produzir metabólitos bioativos comuns.

Tem sido recentemente demonstrado que a formação de alcaloides de ergot é devida a fungos endofíticos clavicipitáceos que vivem com certas espécies de plantas da família Convolvulaceae (AHIMSA-MULLER *et al.*, 2007).

Aly *et al.* (2008) estudaram a composição química de extratos obtidos da planta *Polygonum senegalense* e de um isolado endofítico pertencente ao gênero *Alternaria* sp., cultivado em meio sólido e líquido. Tanto no extrato da planta como nos extratos dos cultivos do fungo foi detectada a presença dos compostos Alternariol 5-O-metil-eter, Altenusin e Alternariol. Este resultado sugere que a produção, embora em quantidades menores de metabólitos do tipo alternariol por fungos endofíticos sob condições *in situ* dentro de tecidos saudáveis da planta hospedeira, implica a possível contribuição da interação mutualista entre endofíticos e seu hospedeiro e provando a contribuição do fungo endofítico na composição química da planta hospedeira. Existem outros poucos estudos que reportam o isolamento de típicos metabólitos fúngicos a partir de uma origem vegetal, por exemplo, alternariol, 5-O-metil éter de *Anthocleista djalonensis* (ONOCHA *et al.*, 1995 *apud* ALY *et al.* 2008), 2,5-dimetil-7-hidroxicromona de *Polygonum cuspidatum* (KIMURA *et al.*, 1983 *apud* ALY ET AL. 2008)) e *Hypericum perforatum* (YIN *et al.*, 2004), como também aurenitol, um metabólito comum de espécies do fungo *Chaetomium* de um extrato da planta *Helichrysum aureo-nitens*.

3.6.3 Microrganismos como Fonte de Metabólitos de Interesse Médico

Os metabólitos secundários microbianos continuam sendo uma diversa fonte de substâncias químicas para o descobrimento de desenvolvimento de agentes farmacêuticos (IGARASHI *et al.*, 2002).

A exploração de microrganismos como fontes de compostos terapêuticamente úteis tem uma história mais curta e menos conhecida que a do uso de plantas e extratos de plantas na medicina humana (VICENTE *et al.*, 2002). Porém, uma das primeiras evidências da antibiotocoterapia é relatada pelo costume dos egípcios de tratar infecções urinárias e feridas supuradas com pão mofado. Esse povo também era um grande conhecedor das virtudes medicinais das plantas (ALONSO, 2007).

O amplo número e variedade de agentes quimioterápicos isolados de fontes naturais microbianas e usados no tratamento de infecções bacterianas tiveram uma grande contribuição para o melhoramento da saúde humana durante o século passado (VICENTE *et al.*, 2002). Metabólitos secundários de fungos são extremamente importantes para nossa saúde e nutrição e possuem um grande impacto econômico (ADRIO e DEMAINE, 2003).

Microrganismos, em particular fungos, são importante fonte de novos metabólitos com pronunciada atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral (RODRIGUES, HESSE e WERNER, 2000). Além disso, os fungos são extremamente úteis na realização de processos de biotransformação (ADRIO e DEMAINE, 2003).

Apesar de que quase 20.000 metabólitos microbianos e cerca de 100.000 produtos vegetais foram descritos até agora, metabólitos secundários de fontes naturais ainda parece ser uma fonte inesgotável de novas moléculas com atividade antimicrobiana, antiviral, antitumoral e outras de interesse na farmacologia e agricultura (VICENTE, 2002).

Os microrganismos constituem uma valiosa fonte de substâncias de aplicação em diversas áreas. São utilizados na produção de antibióticos, antitumorais, imunossupressores, antiparasitários, vitaminas, pigmentos e enzimas. (GUNATILAKA, 2006; ADRIO 2003; DEMAINE, 1999).

Os mais importantes compostos antitumorais usados na quimioterapia atual são antibióticos produzidos microbiologicamente: actinomicina D, mitomicina, bleomicina e as antraciclinas, daunorrubicina, e doxorrubicina (DEMAINE, 1999). O taxol (paclitaxel), que foi originalmente descoberto em plantas, também foi descrito como um metabólito produzido por um fungo endofítico (STIERLE, STROBEL e STIERLE; 1993).

Devido a que somente uma mínima porcentagem de microrganismos que vivem na biosfera têm sido descritos e estudados até hoje, há uma enorme fonte (reservatório) inexplorada de compostos naturais de grande diversidade estrutural que poderia ser usada para o desenvolvimento de novos antifúngicos (VICENTE *et al.*, 2002).

Considerando-se que 6 dos 20 medicamentos mais comumente prescritos são de origem fúngica (GLOER, 1997), e que aproximadamente só 5% dos fungos foram descritos até o momento, estes organismos oferecem um enorme potencial para a obtenção de novos fármacos.

Hawksworth e Rossman (1997) acreditam que entre as espécies ainda não descritas de fungos, muitas delas devem ser fungos da floresta tropical, em particular, endofíticos. Estes microrganismos são particularmente uma das fontes mais promissoras para a descoberta de novos princípios bioativos. A proporção de compostos químicos inéditos isolados a partir de endofíticos (51%) é consideravelmente mais alta que a produzida por microrganismos isolados do solo (38 %) (SCHULZ *et al.*, 2002).

Um fato interessante é que a maioria dos metabólitos secundários úteis de origem fúngica foi descoberta por estudos de triagem rotineiros, ou seja, testando a atividade de extratos de caldos de cultura de um grande número de fungos isolados em determinados ensaios biológicos ou bioquímicos, que vão desde o uso de organismos inteiros à utilização de enzimas isoladas. Extratos que mostraram atividade em um tipo de triagem são comumente testados em outros tipos de triagem e, muitas vezes com resultados inesperados. Por exemplo, a ciclosporina foi originalmente descoberta em uma triagem de atividade antifúngica, porém demonstrou uma atividade insuficiente para o desenvolvimento como droga antifúngica, no entanto demonstrou grande potência em uma triagem para detecção de agentes imunossupressivos (CARLILE, WATKINSON e GOODAY, 2001).

3.6.4 Endófitos Produtores de Substâncias Antimicrobianas

Vários autores descreveram a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana obtidos a partir de culturas de fungos endofíticos. Gu (2009) isolou 48 microrganismos a partir de folhas de *Malus halliana* e submeteu à triagem de atividade antimicrobiana os extratos de acetato de etila das culturas desses microrganismos. Como resultado, 22 isolados exibiram atividade antimicrobiana contra ao menos um dos microrganismos testados. Entre os extratos brutos dos endofíticos, *Alternaria brassicicola* ML-P08 demonstrou a mais potente atividade

antimicrobiana (0,31-2,5 mg/mL). O fracionamento bioguiado deste extrato levou ao isolamento de 7 compostos: altenariol(1), alteraniol 9-metil éter (2), altercromona A (3), herbarin A (4), cerevisterol(5), 3 β -hidroxi (22EM 24R)-ergosta-7,22-dien-6-one (6) e 3 β ,hidroxi (22R,24R)-ergosta-5,8,22-trien-7-one(7). Entre estes compostos isolados, a altercromona A demonstrou a melhor atividade antimicrobiana in vitro contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Candida albicans* com CIMs de 3,9 ug/mL, 3,9 μ g/mL, 1,8 μ g/mL e 3,9 μ g/mL, respectivamente. O composto herbarin A demonstrou pronunciada atividade antifúngica contra *Trichophyton rubrum* e *C. albicans*, com CIMs para ambos de 15,6 μ g/mL. Além disso, o composto alternariol produziu uma forte atividade inibitória da enzima xantina oxidase (IC₅₀ 15,5 μ M).

Kjer *et al.* (2009) isolaram a partir de planta *Sonneratia alba*, uma linhagem de *Alternaria* sp. Este microrganismo foi cultivado em meio arroz sólido, extratos obtidos a partir deste meio levaram ao isolamento dos compostos novos: ácido xanaltérico I e II (exibiram fraca atividade antimicrobiana contra uma linhagem de *Staphylococcus aureus* multirresistente), junto aos já conhecidos metabólitos fúngicos ácido alternarienônico, altenusina,(demonstrou amplo espectro de ação contra varias bactérias e fungos multirresistentes) altenuene, 4'-epialtenueno, alternariol, altertoxin I, 2,5-dimetil-7-hydroxychromone e ácido alternariânico.

Um novo composto antibacteriano, altersetin foi isolado a partir de culturas líquidas de dois endofíticos do gênero *Alternaria*. Este composto demonstrou uma potente CIM contra várias bactérias gram positivas patogênicas, enquanto que bactérias gram negativas e leveduras não se mostraram muito suscetíveis ao composto (HELLWING *et al.*, 2002).

LU *et al.* (2000) isolaram a partir de culturas de *Colletotrichum* sp. endófitos da planta *Artemisia annua* novos compostos bioativos: 6-isoprenilindona-3-carboxylic acid, 3 β ,5 α dihydroxy-6 β -acetoxy-ergosta-7,22-diene e 3 β ,5 α -dihydroxy-6 β -phenylacety-loxy-ergosta-7,22 diene. Esses compostos inibiram o crescimento de todas as bactérias testadas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lútea*, e *Pseudomonas* sp. com CIMs no rango de 25 a 75 μ g/mL.

Em uma ampla revisão de compostos bioativos produzidos por endofíticos, Gunatilaka (2005) observou que a maioria dos compostos produzidos por

microrganismos endofíticos demonstrou ter atividade antimicrobiana, e, em muitos casos, estes compostos têm sido implicados na defesa da planta hospedeira contra microrganismos fitopatogênicos.

3.6.5 Cultivo de Microrganismos Endofíticos Visando a Produção de Substancias Bioativas- Fatores que Afetan a Produção

É bem conhecido que a composição do meio de cultura tem um grande impacto no crescimento e produção de metabólitos secundários (NIELSEN *et al.*, 2004; BERDY, 2005; BODE, 2002; MONAGHAN, 1995).

As condições ótimas para o crescimento e produção de metabólitos variam muito de uma espécie à outra. Além de fatores gerais como fonte de carbono, nitrogênio, metais traça, temperatura, aeração, tempo de cultivo, alguns microrganismos requerem estimulação por moléculas sinais provenientes de outros microrganismos (LARSEN *et al.*, 2005).

As características do meio de cultivo são fundamentais para a produção de metabólitos secundários já que podem privilegiar ou não a produção de substâncias de interesse. O uso de elicitores (também chamados eliciadores) pode direcionar a produção de certas substâncias de interesse (FURTADO *et al.*, 2002).

É muito vantajoso conhecer o gênero do microrganismo para assim escolher o meio de cultura ótimo para a produção de metabólitos (MONAGHAN *et al.* 1995). Por exemplo, YES (Yeast Extract Sucrose) e CYA (Czapeck yeast agar) são, em geral, excelentes meios para a produção de metabólitos a partir de *Penicillium* e *Aspergillus*, enquanto que resultam pouco efetivos para *Rhizopus* (JENNESSEN *et al.*, 2005). Meios de cultura como arroz e milho frequentemente produzem boa esporulação e produção metabólica (WILD, TOTH e HUMPF, 2002).

Gloer (1995) e Nielsen *et al.* (2004) argumentam fortemente a favor do uso de substratos sólidos em estudos de metabólitos de fungos, devido que os fungos ao contrario de outros microrganismos, geralmente crescem na natureza sob substratos como madeira, raízes e folhas de plantas.

A síntese de metabólitos secundários na natureza por microrganismos endofíticos é influenciada por vários fatores. O bioma no qual se encontram inseridos, pode influenciar as vias biogénicas da produção de metabólitos secundários (SCHULZ *et al.*, 2002).

Overy e Blunt (2004) e Overy *et al.* (2005) demonstraram que a presença de tecido vegetal macerado no meio de cultura estimulou a produção de alguns novos compostos fenólicos por parte de endofíticos e patogênicos de plantas.

Outro fator que influencia a produção de metabólitos é a diferenciação da cultura fúngica durante a fase de crescimento, especialmente a conidiação. Alguns metabólitos secundários só são produzidos durante a esporulação (FRISVALD *et al.*, 2008).

A produção de metabólitos secundários por fungos é um processo complexo, estes produtos secundários pertencem a diversos grupos estruturais, como esteroides, xantonas, compostos fenólicos, isocumarinas, quinonas, terpenos, citocalasanas, alcaloides e diversos outros grupos estruturais (RAMOS, 2008).

Alguns produtos naturais são produzidos somente sob certas condições ambientais, e se todas as condições estão presentes como traços de metais, e outros elementos como o fosfato em determinado intervalo de concentrações, portanto se faz necessário experimentar vários meios de cultura para otimizar a produção de metabólitos bioativos. As linhagens de microrganismos devem estar em boas condições e não deterioradas por causa de repetidos repique. A acumulação de dióxido de carbono pode inibir a produção de metabólitos e o solvente utilizado na extração pode influenciar na detecção de metabólitos ativos (LARSEN, *et al.* 2005).

Ramos (2008) testou várias condições para a otimização na produção de metabólitos secundários pelo fungo *endofítico Arthrimum state of Apiospora montagnei*. A sacarose como fonte de carbono e o nitrato de sódio como fonte de carbono foram as melhores substratos para a produção de metabólitos com atividade contra *Escherichia coli* e *Aspegillus fumigatus*.

Fatores genéticos desempenham uma importante função na produção de metabólitos secundários. Frequentemente uma simples mutação pontual em um gene regulatório é suficiente para converter um isolado em não-produtor de um

metabólito dado. Em outros casos, genes podem ser silenciados por outras razões, o que faz que os metabólitos não sejam expressos (LARSEN *et al.*, 2005).

A produção de certos metabólitos está associada à formação de esporo ou esclerócio, que são produzidos em condições de cultura sólida, enquanto que a produção de outros metabólitos é melhorada em condições líquidas. Isso foi demonstrado para *Penicillium solitum*, os alcaloides viridicatol e análogos de ciclopenol são produzidos em quantidades relativamente altas em meio semisólido, entanto que policetídeos são os compostos dominantes produzidos sob condições de cultura líquida (NIELSEN *et al.*, 2004).

Aly *et al.* (2008) investigaram a atividade biológica e composição química de extratos produzidos por um isolado de *Alternaria sp.* endofítico da planta medicinal *Polygonum senegalense*. A triagem química indicou diferenças entre os extratos obtidos do meio de cultura líquido Wickerham e o meio de cultura sólido arroz. Essas diferenças foram refletidas também na citotoxicidade dos extratos contra a linhagem L5178Y, linfoma de ratos. O extrato de acetato de etila, obtido da cultura em meio arroz sólido, foi mais efetiva que o extrato obtido em cultura líquida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MEIOS DE CULTURA

4.1.1 Agar Batata Dextrose – BDA

Dextrose	20 g
Agar	15 g
Batatas	200g
Água destilada	1000 mL

As batatas foram cozidas em 500 mL de água destilada durante 4 minutos em forno de micro-ondas. Em seguida, foram filtradas com algodão, adicionou-se a dextrose e o agar ao caldo e completou-se com água destilada para 1000 mL

4.1.2 Meio BHI (Brain Hearth Infusion)

BHI pó	37g
Agar	17 g
Água Destilada	1000ml

Os ingredientes foram misturados e autoclavados durante 20 minutos a 1 atm de pressão.

4.1.3 Agar Fubá

Tween 80	10 mL
Fubá	40 g
Agar	15 g
Água destilada	1000 mL

O fubá foi fervido em banho-maria por 1 hora a 60°C, com metade do volume da água. A suspensão foi filtrada com algodão. Seguidamente acrescentou-

se o tween 80, o agar e o restante da água destilada até alcançar 1000 mL. Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C e 1 atm.

4.1.4 Agar Arroz

Arroz integral em grãos	10 g
Tween 80	10 mL
Agar	15 g
Água destilada	1000 mL

O arroz foi fervido por 1 hora a 60°C. Seguidamente acrescentou-se o tween 80, o agar e o restante da água destilada até alcançar 1000 mL. Autoclavou-se por 20 minutos a 120°C e 1 atm.

4.1.5 Agar Mueller Hinton

Infusão de carne bovina	30 g
Peptona de caseína ácida	17,5 g
Amido	1,5 g
Agar	17 g
Água destilada	1000 mL

Para a preparação de caldo Mueller Hinton são os mesmos ingredientes sem a adição do agar.

4.1.6 Caldo Extrato de Malte

Extrato de malte	20 g
Peptona	1,0 g
Glicose	20 g
Água destilada	1000 mL
pH	6,8

Todos os ingredientes foram misturados em água destilada. O volume foi completado com água destilada para 1000 mL

4.1.7 Caldo Milho (fubá)

Farinha de milho (fubá)	40 g
Sacarose	3%
K ₂ HPO ₄	0,1%
MgSO ₄	0,05%
Água destilada	1000 mL

Dissolveu-se a farinha de milho em água destilada, logo levou-se a banho-maria a 52°C por uma hora, filtrar. Adicionou-se ao líquido filtrado a sacarose e os sais e autoclavou-se por 20 minutos. Adaptado de Baute *et al.* (1978).

4.1.8 Meio Arroz Sólido

Arroz integral em grãos	100 g
Água destilada	100 mL

Ao arroz em grãos foi adicionada a água destilada e seguidamente autoclavou-se duas vezes por 40 minutos.

4.1.9 Meio Milho Sólido

Milho em grãos	100 g
Água destilada	100 mL

Ao milho em grãos foi adicionada a água destilada e seguidamente autoclavou-se duas vezes por 40 minutos.

4.1.10 Agar Nutriente

Peptona de carne	5 g
------------------	-----

Extrato de carne bovina	3 g
Agar	15 g
Água destilada	1000 mL

Os ingredientes foram misturados e autoclavados durante 20 minutos a 1 atm de pressão.

4.2 SOLUÇÕES E REAGENTES

4.2.1 Solução de Anisaldeido

Anisaldeido	0,5 mL
Ácido acético glacial	50 mL

4.2.2 Solução de Cloreto Férrico

Cloreto férrico	1,5 g
Ácido clorídrico 0,5%	100 mL

4.2.3 Solução de Dragendorff

Solução A

Nitrato de bismuto	0,85 g
Ácido acético glacial	10 mL
Água	40 mL

Dissolveu-se o sal no ácido acético glacial e acrescentou-se 40 mL de água fervente.

Solução B

Iodeto de potássio	8 g
Água	30 mL

A solução estoque foi preparada misturando a solução A e B.

4.2.4 Solução de Hidróxido de Potássio Metanólica

KOH	5 g
Metanol	100 mL

4.2.5 Solução de Ninhidrina

Ninhidrina	0,3 g
Butanol	100 mL
Ácido acético glacial	3mL

4.2.6 Solução de Vanillina – Ácido Sulfúrico

Vanillina	1 g
Acido sulfúrico	100 mL

4.2.7 Solução Fisiológica

NaCl	0,9 g
Água destilada	100 mL

A solução foi autoclavada e estocada sob refrigeração a 4°C

4.3 MATERIAL VEGETAL

4.3.1 Coleta

O material vegetal foi coletado na Fazenda Violeta, distante a 25 km da cidade de Pedro Juan Caballero, Paraguai, elevação de 960 metros, coordenadas geográficas 606628.67m E, 749192925 m S.

Duas coletas foram realizadas: em janeiro de 2008 e fevereiro de 2009. Na primeira foram coletadas folhas *C. urucurana*, na segunda foi coletada casca do caule de *C. urucurana*, ambas com o objetivo da produção de extratos vegetais.

4.3.2 Identificação Botânica

O material vegetal foi submetido a estudos botânicos para a identificação da espécie no departamento de Botânica da Faculdade de Ciências Químicas – Universidade Nacional de Asunción – Paraguai. No Herbário desta Instituição foi depositada uma exsicata da planta, registrada com o código Gonzalez, Y. 78 (FCQ).

4.3.3 Elaboração de Extratos Brutos Vegetais

O material coletado, folhas e casca do caule de *C. urucurana* (FIGURA 2) foi submetido à secagem em estufa, a temperatura utilizada para as folhas foi de 30°C, e para a casca do caule, 40°C.

Uma vez seco o material, realizou-se uma trituração com o objetivo de facilitar a liberação dos princípios ativos presentes no tecido vegetal. Para a trituração das cascas de caule foi utilizado moinho de martelos. As folhas foram trituradas manualmente.

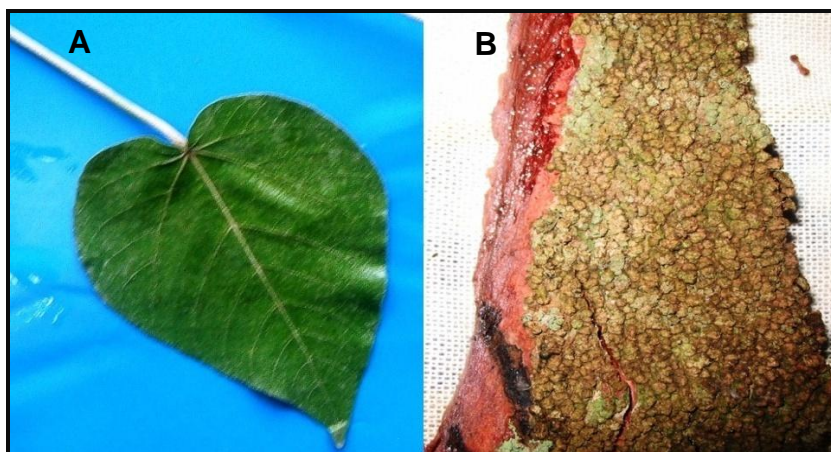


FIGURA 2 – PARTES DA PLANTA UTILIZADAS PARA A OBTENÇÃO DOS EXTRATOS: FOLHA (A) E CASCA DO CAULE (B) DE *Croton urucurana*

O método utilizado para a extração de princípios ativos foi o método da maceração (SIMÕES *et al.*, 2007; CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). O material vegetal foi colocado em um erlenmeyer, ao qual se adicionou o solvente extrator em um volume que correspondeu a duas vezes a altura da amostra. Para a extração

dos princípios ativos das folhas foram realizadas 6 extrações sucessivas, em intervalos de 3 dias entre as extrações. As primeiras três, com éter de petróleo, com o objetivo de retirar o excesso de compostos apolares como ácidos graxos, lipídeos e ceras. As três últimas extrações foram realizadas com metanol. A casca do caule de *Croton urucurana* foi extraída com metanol, 4 extrações sucessivas, em intervalos de 10 dias entre as extrações (modificado de CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

Os extratos foram filtrados, rotaevaporados a 40°C, guardados em dessecador e pesados periodicamente até a obtenção de um peso constante ou liofilizados. Foi testada a solubilidade destes extratos em água e álcool etílico a diferentes concentrações. Foi escolhida a solução de álcool 70 % para a diluição dos extratos e posteriores testes para avaliar a atividade antimicrobiana.

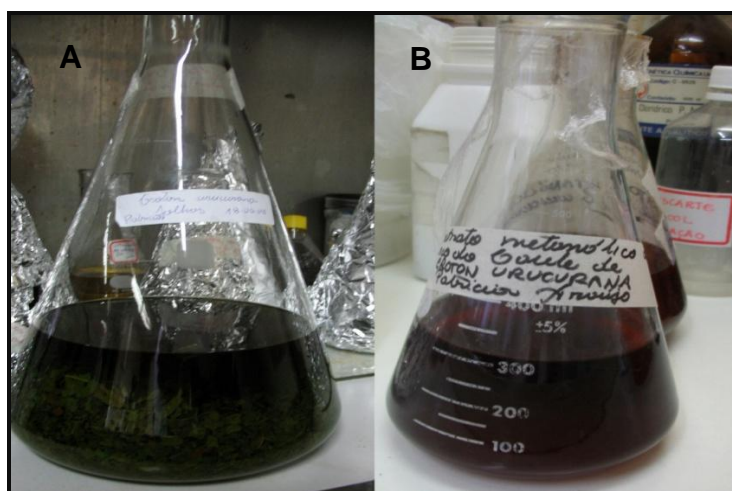


FIGURA 3 – MÉTODO DA MACERAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE PRINCÍPIOS ATIVOS DE FOLHAS (A) E CASCA DO CAULE (B) DE *Croton urucurana*

4.3.4 Fracionamento de Extrato Bruto Metanólico de Casca do Caule de *Croton urucurana* – Cromatografia em Coluna a Vácuo

O extrato metanólico bruto de casca do caule de *C. urucurana* foi fracionado utilizando solventes e misturas de solventes com polaridade crescente. Primeiramente misturou-se 8 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) e 4,2394 g do extrato bruto metanólico, até a obtenção de uma pasta de consistência homogênea. A

coluna de fracionamento foi previamente empacotada com 83 g de sílica gel 60 (70-230 mesh). A pasta foi colocada no extremo superior da coluna. Foi ativado o vácuo do sistema e seguidamente foram adicionados à coluna 250 mL de solventes e misturas de solvente em ordem crescente de polaridade: éter de petróleo, éter de petróleo:diclorometano (1:1), diclorometano, diclorometano:acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila: metanol (1:1) e metanol. Cada fração foi coletada em diferentes balões, foram concentradas em rotaevaporador em banho-maria a 40°C e guardadas em pequenos frascos de vidro num dessecador até obter um peso constante.

4.4 TESTES DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.4.1 Microrganismos Utilizados

Para os testes de atividade antimicrobiana foram utilizadas as seguintes linhagens de referência: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* 25175, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, linhagens cedidas gentilmente pela Dra Andreia Sthingen, *Fonsecaea monophora* (linhagem CBS 102248, gene bank AY 366926, Hospital das Clínicas-Pr MMHC 82) cedida gentilmente pela Dra Vania Vicente, *Guignardia citricarpa* 33/05 (labGeM) cedida gentilmente pela Dra Chirlei Glienke. Também foram utilizados isolados clínicos das espécies *Microsporum gypseum*, *Microsporum canis* e *Trychophyton rubrum*, cedidos gentilmente pela Dra. Marisol Domingues Muro – Laboratório de Micologia do Hospital das Clínicas – Curitiba, PR.

4.4.2 Avaliação Preliminar da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Brutos Vegetais – Método de Difusão em Poços de Agar

Para este teste foram utilizados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Estas linhagens foram repicadas em placas de petri contendo agar BHI (Brain Heart Infusion) e ou agar Nutriente.

Depois de 18 a 24 horas de incubação, com o auxílio de uma alça, pelo menos três a cinco colônias foram selecionadas da placa de ágar e transferidas para um tubo contendo 5 mL de solução fisiológica esterilizada. A turbidez do tubo foi ajustada até atingir um padrão visual da escala Mc Farland 0,5 que corresponde a uma suspensão de aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL (FERRARO *et al.*, 2003).

Foram utilizadas placas de petri contendo Meio Mueller Hinton (MH), pH 7,2 a 7,4. Nessas placas, foram realizados orifícios de aproximadamente 6 mm de diâmetro, utilizando um vazador de rolhas. Para a inoculação dos microrganismos na placa, mergulhou-se um swab de algodão estéril na suspensão ajustada a escala Mc Farland 0,5. A superfície seca de placa de MH foi inoculada esfregando o swab em toda a superfície esterilizada do ágar. Esse procedimento foi repetido 3 vezes a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo, como passo final passou-se um swab na margem da placa de ágar (FERRARO *et al.*, 2003).

Para a avaliação preliminar dos extratos brutos vegetais, foram preparadas soluções de 10 mg/mL do extrato bruto metanólico de folhas e casca do caule de *Croton urucurana*, diluídas em álcool 70 %.

Com auxílio de uma pipeta foram transferidos 50 μ L de cada solução de extrato bruto nos orifícios feitos na placa com meio MH. As placas foram incubadas por 18-24 h em estufa de 36 °C, finalizado este período foram medidos os halos de inibição. Como controle positivo para bactérias foi utilizada uma solução de gentamicina 0,2 mg/mL (10 μ g por poço) , para a levedura nistatina 100000 UI/mL (5000 UI por poço), como controle do solvente (branco) álcool 70 % e solução fisiológica como controle negativo. As provas foram realizadas em triplicata.

4.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – Método da Macrodiluição

Foram preparadas as soluções de microrganismos testados conforme descrito no item 3.1.5.1. A partir dessa solução (ajustada a concentração de Mc Farland 0,5) foram transferidos 100 μ L a frascos contendo 100 mL de solução fisiológica esterilizada, obtendo uma solução com concentração final 1.10^6 ufc/mL.

Em tubos esterilizados de 13 x 100 mm de diâmetro foram transferidos 0,8 mL de caldo Mueller Hinton e 0,2 mL do extrato a ser testado, seguidamente foi adicionado 1 mL da solução de concentração 1.10^6 ufc/mL para finalmente obter um sistema de teste com uma concentração de 1.10^5 ufc/mL. Os tubos foram incubados por 16-20 h em estufa a 36°C. Finalizado este tempo, alíquotas de 100 µL foram semeadas em placas com meio Nutriente, para avaliar a viabilidade das células bacterianas. A ausência de crescimento do microrganismo depois de 48 h de incubação considerou-se ação bactericida. As provas foram realizadas em triplicata.

Para a prova com *S. mutans* foram incubados os tubos e placas em jarras com atmosfera de CO₂. Também foram preparados os respectivos controles: positivo (gentamicina 0,2 mg/mL), negativo (solução fisiológica), e do solvente (etanol 70%).

Foram testadas várias concentrações de extrato bruto e frações (0,1 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,7 mg/mL, 0,8 mg/mL, 0,9 mg/mL e 1 mg/mL) até obter a concentração inibitória mínima que corresponde à menor concentração de um agente microbiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em caldo ou agar (FERRARO *et al.*, 2003).

4.4.4 Avaliação da Ação do Extrato Bruto de Casca do Caule Sobre o Crescimento de Fungos Filamentosos – Diluição em Meio Sólido

O método utilizado para avaliar a atividade do extrato metanólico bruto de cascas de *C. urucurana* foi o método de diluição em agar, descrito por Hadecek e Grefer (2000), método no qual diferentes concentrações do extrato testado são incorporadas ao agar fundente. Os fungos utilizados nesse teste foram: *Fonsecaea monophora* 82 (CBS 102248), *Guignardia citricarpa* 33/05 *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporium canis*.

Foram utilizadas placas de petri c com 60 mm de diâmetro (contendo Agar Sabouraud, ARENAS, 2008), no centro de cada placa foram inoculados discos de micélio de 6 mm de diâmetro com fungos com crescimento de 7 dias a 28°C. Foram avaliadas as seguintes concentrações do extrato bruto metanólico de *C. urucurana*: 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL e 0,125 mg/mL.

As avaliações foram realizadas por meio das medições do diâmetro das colônias (média das medidas perpendiculares e uma diagonal) após 7 dias de incubação para fungos de crescimento rápido, e 15 dias para fungos de crescimento mais lento (DIAS *et al.*, 2005).

A porcentagem de inibição foi determinada utilizando a fórmula:

Porcentagem de inibição (PI%) = $\frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100$, onde D_c é o diâmetro médio da colônia do fungo patogênico no controle de crescimento (sem extrato), e D_t é o diâmetro médio da colônia do patógeno crescido na placa contendo o extrato testado. Os controles positivos utilizados foram miconazol (0,07 mg/mL), fluconazol (0,2 mg/mL) e nistatina (10000 UI/mL).

4.5 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

4.5.1 Isolamento de Microrganismos Endofíticos

O material vegetal coletado em agosto de 2008 foi submetido a uma lavagem com água corrente e com auxílio de uma esponja para remoção dos microrganismos epifíticos e outros contaminantes. O processo de desinfecção foi realizado mergulhando sequencialmente o material vegetal em frascos com: água destilada autoclavada (1 minuto), etanol (1 minuto), hipoclorito de sódio 3% (4 minutos), etanol (30 segundos) e água destilada autoclavada (6 minutos) (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Para o isolamento foram utilizados os seguintes meios: agar BDA com adição de antibióticos (tetraciclina 50 µg/mL e cloranfenicol 100 µg/mL) para o isolamento de fungos e agar Nutriente com adição de antifúngico (benomil 50 µg/mL) para isolamento de bactérias.

Os microrganismos endofíticos foram isolados a partir de 120 fragmentos de folhas e 120 fragmentos de casca do caule, cada um com tamanho aproximado de 5 mm x 5mm. Em cada placa foram inoculados 8 fragmentos de tecido vegetal (FIGURA 3). As placas foram observadas por um período de um mês, cada colônia

emergida a partir do material vegetal foi repicada em tubos de penicilina contendo meio de cultura adequado ao tipo de microrganismo.

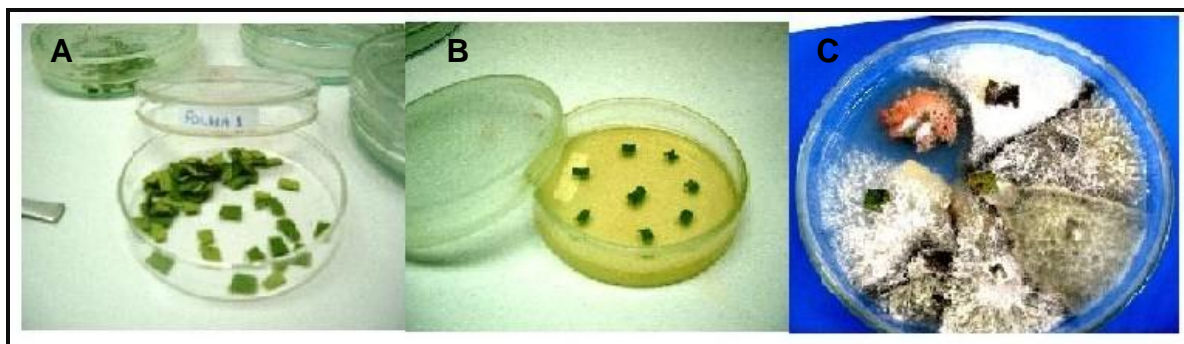


FIGURA 4 – ETAPAS DO ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS A PARTIR DE FOLHAS DE *Croton urucurana*

A) Folhas fragmentadas de *Croton urucurana*, B) Placa com agar BDA inoculada com os fragmentos de folha, C) Placa com 15 dias de crescimento onde se visualiza o crescimento micelial de fungos endofíticos.

4.5.2 Conservação de Microrganismos Endofíticos

Todos os isolados endofíticos foram numerados e estocados em frascos contendo meio BDA inclinado (fungos) ou Nutriente (bactérias), mantidos em geladeira a 4°C, realizando-se repiques em intervalos de 4 meses.

4.5.3 Identificação Microscópica de Microrganismos Endofíticos

Utilizando uma alça bacteriológica, foram retirados pequenos pedaços de micélio das culturas fúngicas de 7 dias de crescimento a 28°C e colocados em lâminas. Seguidamente uma gota de solução de lactofenol ou azul de lactofenol foi adicionada ao micélio, que foi coberto com uma lamínula.

A preparação foi visualizada em microscópio ótico com aumentos de 100 e 400x. As estruturas fúngicas visualizadas foram fotografadas e comparadas com as descritas na literatura (WATANABE, 2002; LARONE, 1995). Também foram realizados microcultivos em agar BDA, Sabouraud, Fubá e Arroz.

A identificação foi realizada, observando-se as características macroscópicas das colônias (cor, aspecto, consistência, presença de pigmento) e características microscópicas (morfologia de estruturas vegetativas e reprodutivas).

4.5.4 Seleção de Microrganismos com Maior Potencial Antimicrobiano

4.5.4.1 Antagonismo contra fungos patogênicos – cultura pareada

O antagonismo de 27 isolados de fungos endofíticos de *Croton urucurana* foi ensaiado pelo método da cultura pareada, chamado também de método do pareamento, que consistiu no confronto direto do provável antagonista (endofítico) com os fungos patogênicos, em placas de petri contendo meio de cultura sólido (MARIANO, 1993). Foi testada a atividade contra o fungo patogênico humano *Fonsecaea monophora* (MMHC 82 (Hospital das Clínicas, Curitiba, PR, linhagem CBS 102248), e o fungo fitopatogênico *Guignardia citricarpa* 33/05.

Os fungos endofíticos foram crescidos em placas de petri com meio BDA pH 6,8, a 28°C por 7 dias. Com o auxílio de um vazador de rolhas, foram retirados cilindros de agar de 6 mm de diâmetro das colônias em crescimento. O mesmo procedimento foi adotado em relação aos fungos patogênicos. Um cilindro de endófito e outro de patogênico foram então transferidos para placas de petri contendo meio de cultura BDA e colocados a uma distância de 20 mm entre cilindros de micélio no centro da placa. As placas foram vedadas com filme de PVC e mantidas durante 14 dias em estufa BOD, com fotoperíodo de 12 horas a 28°C. Como controle foi inoculado apenas o fungo patogênico. A avaliação foi realizada mediante medição do diâmetro da colônia, comparando com o controle e observação das interações entre as colônias. Os testes foram realizados em 5 repetições.

Para determinar a porcentagem de inibição do crescimento, mediu-se o diâmetro das colônias do fitopatógeno com 7 e 14 dias de crescimento, subtraindo-se o diâmetro do inóculo original. Os cálculos foram realizados de acordo com Edginton *et al.* (1971), pela fórmula descrita no item 4.4.4. Sendo Dt o diâmetro médio da colônia do patógeno crescido na placa contendo o endofítico testado

4.5.4.2 Antagonismo dos microrganismos endofíticos contra bactérias e leveduras patogênicas humanas (método de blocos em agar ou método de Ichicawa)

Vinte e sete fungos endofíticos foram submetidos ao ensaio antimicrobiano em meio sólido baseado na metodologia de Ichicawa *et al.* (1971) para a seleção de endófitos com potencial de produção de metabólitos com atividade antimicrobiana.

Cada fungo endofítico foi cultivado em placas de petri contendo meio BDA a 28°C por sete dias. Após este período, com um auxílio de um vazador de rolhas, foram cortados discos de micélio de 6 mm de diâmetro e transferidos para poços de placas de petri, contendo médio Mueller Hinton, previamente semeadas com uma solução de 1.10^6 ufc/mL das seguintes linhagens: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 10231. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas quando os microrganismos testes eram bactérias, e por 48 horas quando foi testada a levedura. Seguidamente foi avaliada a presença de halos de inibição. As provas foram realizadas em triplicata.

4.5.5 Cultivo Visando à Produção de Metabólitos Bioativos

4.5.5.1 Cultivo em meio líquido

Os fungos endofíticos FCU028, FCU042, FCU 054, FCU055, FCU060 e FCU077 foram cultivados em dois tipos de meio de cultura: Meio milho e meio malte:

Como potencial elicitor para a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana foi preparado um extrato de microrganismos descrito por Furtado *et al.* (2002) com algumas modificações. Em tubos contendo 8 mL de meio BHI caldo foram adicionados de 3 a 8 colônias de 24 h de crescimento das seguintes linhagens: *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. mutans* ATCC 25175 *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *C. albicans* ATCC 10231. Os tubos foram incubados por 16 h, seguidamente, em um recipiente, misturaram-se todos os cultivos e adicionaram-se 10 cilindros de micélio de cultivos de 7 dias de

crescimento de *F. monophora* MMHC 82 e *G. citricarpa* 33/05. Este extrato de microrganismos foi autoclavado duas vezes por 40 minutos.

Três cilindros de micélio de 6 mm de diâmetro de cada fungo endofítico (cultivados em meio BDA por 7 dias a 28°C) foram inoculados em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio de cultura e 1mL do extrato de microrganismos. Incubou-se por 15 dias em estufa com mesa rotatória a 28°C e 120 rpm.

4.5.5.2 Cultivo em meio sólido

Os fungos endofíticos FCU028, FCU042, FCU055, FCU060 e FCU077 foram cultivados em meio BDA por 7 dias em estufa BOD a 28°C. Foram cortados 10 cilindros das bordas dos micélios e inoculados em frascos de 500 mL de capacidade, contendo 100 g de grãos de arroz integral e milho. Estes foram incubados por 30 dias a 28°C (ALY *et al.*, 2008; CAFEU *et al.*, 2005; DOS SANTOS e RODRIGUES, 2003).



FIGURA 5 – CULTIVO EM MEIO SÓLIDO (GRÃOS DE MILHO E ARROZ) DO ISOLADO ENDOFÍTICO FCU 055

4.5.6 Extração de Metabólitos de Cultivos Fúngicos

4.5.6.1 Extração de metabólitos secundários de fungos cultivados em meio líquido

Após a obtenção de culturas de 15 dias em estufa rotatória 120 rpm, a 28°C, procedeu-se à filtração com a finalidade de separar o micélio do meio líquido. Foi utilizado papel de filtro Whatman Nro 4.



Cultura de 15 dias em meio líquido



Separação do meio de cultura do micélio



Caldo: extração com acetato de etila. Partição líquido-líquido



Micélio: extração com metanol, método da maceração

FIGURA 6 –ESQUEMA DE PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO

Para a extração de metabólitos secretados ao meio de cultura foi utilizada a metodologia de partição líquido-líquido. Foi utilizado como solvente de extração acetato de etila. Em um balão de separação de 250 mL foi adicionado o meio de cultura 50 mL de acetato de etila. Procedeu-se à agitação do balão duas vezes, e esperou-se a separação das duas fases não miscíveis, então separou-se a fração de acetato de etila. O extrato de acetato de etila foi concentrado em rotaevaporador e, em seguida, foi colocado em dessecador, até a obtenção de peso constante após três pesadas em balança analítica de precisão.

Também foi realizada a extração de princípios ativos do micélio. O micélio separado do meio líquido foi colocado em um liquidificador e, em seguida, foi adicionado 250 mL de metanol e liquidificado por 3 minutos.

4.5.6.2 Extração de metabólitos secundários de fungos cultivados em meio sólido

Transcorridos os 30 dias de incubação dos fungos endofíticos inoculados em meios de cultura sólidos, grãos arroz integral e milho. E após foram adicionados 200 mL de metanol nos cultivos. O sistema foi macerado com auxílio de um bastão de vidro e agitado manualmente por 5 minutos e deixado em repouso por 5 dias. Seguidamente procedeu-se à separação do solvente extrator do meio de cultura mediante filtração. Os extratos obtidos foram rotaevaporados e guardados em dessecador até obtenção de peso constante ou liofilizados.

4.5.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos de Endofíticos

4.5.7.1 Método de difusão em poços de agar

O método é o descrito no item 4.4.1. Os 32 extratos brutos de fungos endofíticos obtidos foram testados para avaliar a atividade antimicrobiana contra as linhagens: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC 10231.

4.5.7.2 Método de disco difusão: disco de extrato vs disco de micélio

Foram obtidos discos de 6 mm de diâmetro a partir de colônias de 14 dias de crescimento em meio BDA do fungo fitopatogênico *Guignardia citricarpa* 33/05 e do fungo patogênico humano *F. monophora* FP82. Estes foram inoculados no centro de placas de petri, contendo meio de cultura BDA. A 1,5 cm do micélio dos fungos patogênicos em posição oposta foi colocado um disco de papel de filtro esterilizado de 5 mm de diâmetro e sobre este foram inoculados 10 µL do extrato a ser avaliado.

As placas foram incubadas em estufa BOD a 28°C por 14 dias (QUIROGA, SAMPIETRO e VATTUONE, 2001, adaptado por FIGUEIREDO, 2006).

Avaliou-se o potencial de inibição medindo-se o diâmetro das colônias após sete dias de crescimento, comparando-se com os controles negativos: discos de papel de filtro com 10 µL de água destilada autoclavada e metanol. Como controles positivos foram utilizados os fungicidas Derosal® (1mg/mL) e Glifosinato para *Guignardia citricarpa*, e Fluconazol (5 mg/mL) e Nistatina (100000 UI/mL) para *Fonsecaea monophora*.

4.6 DETECÇÃO PRELIMINAR DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES EM EXTRATOS ATIVOS

4.6.1 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada para avaliação analítica qualitativa dos componentes dos extratos. Foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel 60 com marcador de fluorescência F₂₅₄ Merck.

Os extratos (10 mg/mL) foram adicionados as cromatofolhas com o auxílio de capilares. Uma vez secas, as placas foram acondicionadas em cubas contendo a fase móvel a ser testada. Testaram-se várias combinações de solventes (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etila e metanol) para determinar a FAE móvel mais adequada para a separação dos compostos.

Foram utilizados os seguintes agentes reveladores: Anisaldeído, para detecção de açúcares, esteroides e terpenos. Solução de Cloreto férrico para a detecção de compostos fenólicos e ácidos hidroxâmicos; Reagente de Dragendorff, para a detecção de alcaloides e compostos nitrogenados heterocíclicos; solução metanólica de Hidróxido de potássio detecta cumarinas, antraquinonas e suas agliconas; ninhidrina, possibilita a detecção de aminoácidos, aminas e aminoaçúcares; Solução de Vanillina- Acido sulfúrico, detecta a presença de alcoóis superiores, fenóis, esteroides e óleos essenciais. A revelação foi realizada por aspersão das soluções reveladoras sobre a superfície das cromatofolhas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MATERIAL VEGETAL

5.1.1 Extratos Brutos Metanólicos

Foram obtidos os seguintes rendimentos dos extratos preparados para a avaliação de atividade antimicrobiana: A partir de 400 g de casca do caule de *C. urucurana* foram obtidos 57, 284 g. A partir de 101, 1 gs de folhas foram obtidos 12, 124 g.

5.1.2 Avaliação Preliminar da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Brutos de Casca do Caule e Folhas de *Croton urucurana*

	Microorganismos testados			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
Extrato bruto de folhas de <i>C. urucurana</i>	-	-	-	-
Extrato bruto de casca do caule <i>C. urucurana</i>	12 mm	-	15 mm	-
Gentamicina 0,2 mg/mL	30 mm	28 mm	26 mm	nt
Nistatina 100000 UI/mL	nt	nt	nt	25 mm
Alcool 70 %	-	-	-	-

QUADRO 1 – AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS METANÓLICOS DE FOLHAS E CASCA DO CAULE DE *Croton urucurana* BASEADA NO HALO DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO EXPRESSO EM mm

Nota: (-): ausência de zona de inibição; nt: não testado.

Um estudo preliminar da ação dos extratos brutos metanólicos de folhas e casca do caule de *Croton urucurana* foi realizado, utilizando o método descrito na seção 4.4.1 (método de poços de agar). O extrato bruto metanólico de casca do caule demonstrou um maior potencial inibitório no crescimento dos microrganismos testados em relação ao extrato de folhas (QUADRO 1 e FIGURA 7), motivo pelo qual foi selecionado para o fracionamento e posterior avaliação da ação das frações. No entanto, Araujo, Degen e González, (2008) detectaram atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico (tintura) a 10% de folhas da mesma planta contra um isolado clínico de *S. aureus*. Esses resultados sugerem que a atividade do extrato pode ser altamente influenciada pelo solvente utilizado durante a extração, época e lugar da coleta e pelas variações existentes entre linhagens de uma mesma espécie de microrganismo utilizado para testar a atividade.

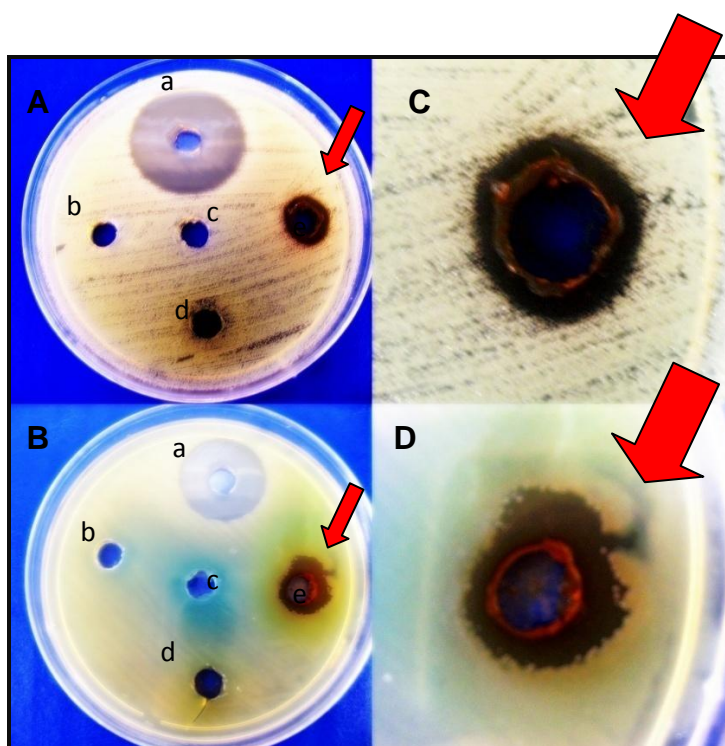


FIGURA 7 – AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS DE FOLHAS E CASCA DO CAULE DE *Croton urucurana*

A) Atividade dos extratos contra *S. aureus*, B) Atividade contra *P. aeruginosa*; C) Detalhe do halo de inibição do extrato bruto de casca do caule contra *S. aureus*; D) Detalhe do halo de inibição do extrato bruto de casca do caule contra *P. aeruginosa*; a) Controle positivo gentamicina; b) Controle do solvente (branco) álcool 70%; c) Controle negativo solução fisiológica; d) Extrato bruto de folhas de *C. urucurana*; e) Extrato de casca do caule. Setas vermelhas indicam os extratos vegetais que produziram halos de inibição.

5.1.3 Fracionamento em Coluna a Vácuo

Considerando que o extrato metanólico da casca foi mais ativo, procedeu-se ao fracionamento deste extrato bruto.

Foram obtidos os seguintes rendimentos das frações de extrato bruto metanólico de casca do caule *Croton urucurana*: fração éter de petróleo (1): 0 g, fração éter de petróleo-diclorometano(2) 0,005 g; fração diclorometano(3), 0,0143 g; diclorometano: acetato de etilo(4), 0,4293 g; fração acetato de etila(5), 0,0621 g; fração acetato de etila: metanol,(6) 1,8822 g; fração metanol(7), 1,2797 g. A coluna cromatográfica usada no fracionamento pode ser visualizada na figura 8 A.

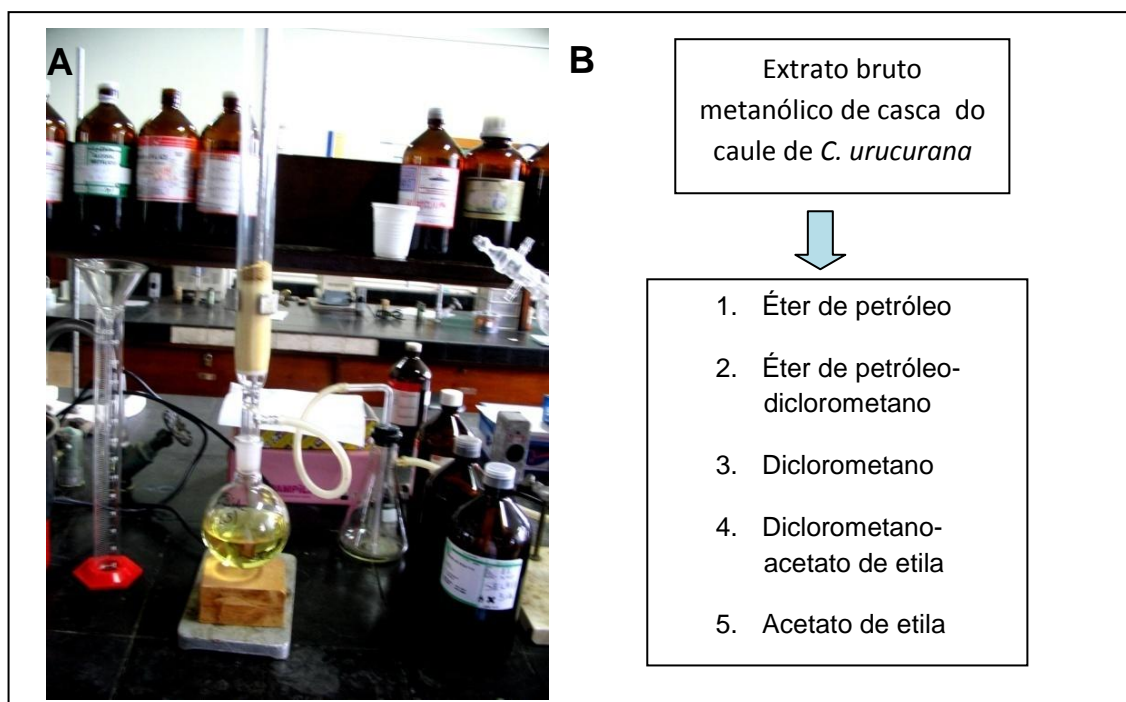


FIGURA 8 – FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO: A) COLUNA DE CROMATOGRAFIA E B) ESQUEMA DE SOLVENTES UTILIZADOS

5.1.4 Concentração Inibitória Mínima dos Extratos Vegetais

5.1.4.1 Extratos brutos de casca do caule e folha

Foram avaliadas concentrações a partir de 1 mg/mL e menores. No quadro 2 estão detalhadas as diferentes CIMs determinadas contra as 5 bactérias patogênicas testadas.

Como previsto pelo teste preliminar de difusão em poços de agar (item 5.1.2), o extrato bruto metanólico de casca do caule de *Croton urucurana* também se demonstrou mais ativo que o extrato de folhas pelo método de diluição em meio líquido. O extrato bruto de folhas teve uma CIM maior a 1 mg/mL contra as 5 bactérias testadas.

A menor CIM do extrato bruto metanólico da casca do *Croton urucurana* (0,1mg/mL) foi observada contra a bactéria gramnegativa *Pseudomonas aeruginosa*, um importante patógeno humano frequentemente isolado de pacientes com infecções hospitalares.

Microrganismos testados	Extrato bruto metanólico de casca do caule <i>C. urucurana</i>	Extrato bruto metanólico de folhas de <i>C. urucurana</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,5 mg/mL	>1 mg/mL
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,9 mg/mL	>1 mg/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	0,6 mg/mL	>1 mg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,1 mg/mL	>1 mg/mL
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	>1mg/mL	>1 mg/mL

QUADRO 2 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS EXTRATOS BRUTOS METANÓLICOS DE CASCA DO CAULE E FOLHAS DE *Croton urucurana*

5.1.4.2 Frações do extrato bruto metanólico de *Croton urucurana*

Após a determinação das CIMs dos extratos brutos de casca do caule e folhas, procedeu-se à avaliação da ação antibacteriana das frações do extrato bruto de casca do caule.

Devido ao baixo rendimento obtido das frações 2 e 3, estas foram testadas só em concentrações de 0,1mg/mL e 0,2 mg/mL; as demais frações foram testadas em concentrações de 1 mg/mL e em concentrações iguais a CIMs dos extratos brutos para cada microrganismo testado. Também foi testada uma solução com metade da concentração da CIM do extrato bruto, com o intuito de verificar a existência de uma fração que concentre os princípios ativos antimicrobianos e produza uma ação mais eficiente que o extrato bruto. Se a atividade antibacteriana de *Croton urucurana* deve-se a um composto ou grupo de compostos de polaridade

semelhante, seria esperado que os extratos fracionados fossem mais ativos que o extrato bruto metanólico.

Os resultados dos testes de macrodiluição com as frações estão resumidos no quadro 3.

Bactérias ensaiadas	Fração 2 Éter de petróleo-diclorometano	Fração 3 Diclorometano	Fração 4 Diclorometano-Acetato de etila	Fração 5 Acetato de etila	Fração 6 Acetato de etila-metanol	Fração 7 Metanólica
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	CIM>0,2 mg/mL	>0,2 mg/mL	>1,0 mg/mL	>1,0 mg/mL	<1,0 mg/mL e >0,5 mg/mL	<1,0 mg/mL
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	CIM >0,2 mg/mL	>0,2 mg/mL	>1,0 mg/mL	>1,0 mg/mL	<1,0 mg/mL	<1,0 mg/mL
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	CIM>0,2 mg/mL	>0,2 mg/mL	>1,0 mg/mL	>1,0 mg/mL	>1,0 mg/mL	<1,0 mg/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	CIM>0,2 mg/mL	>0,2 mg/mL	>1,0 mg/mL	>1 mg/mL	<1 mg/mL >0,1 mg/mL	<1 mg/mL <0,1 mg/mL

QUADRO 3 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO BRUTO DE CASCA DO CAULE DE *Croton urucurana* CONTRA BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Na análise da atividade contra *S. aureus* as duas frações mais apolares (éter de petróleo: diclorometano e diclorometano) não inibiram o crescimento de *S. aureus*. Como citado anteriormente, não foi possível testar as frações a concentrações maiores devido ao baixo rendimento obtido.

As frações 4 (diclorometano: acetato de etila), 5 (acetato de etila), 6 (acetato de etila:metanol) e 7(metanol) não foram mais ativas que o extrato bruto (CIM = 0,5 mg/mL). No entanto entre essas frações, a mais ativa foi a 6 (acetato de etila: metanol) que teve uma CIM menor a 1 mg/mL. A fração 7, apesar de não ter inibido totalmente o crescimento do *S. aureus* na concentração de 1 mg/mL, produziu importante diminuição no número de ufc (3180 ufc/mL) em relação ao controle negativo (solução fisiológica) onde se obteve uma contagem maior que 1.10^7 ufc/mL.

Esses resultados indicam que os compostos ativos seriam de polaridade alta, possivelmente do grupo dos polifenóis (taninos, flavonoides, quinonas).

Em relação à análise da atividade das frações contra *E. faecalis*, as frações 4, 5, 6 e 7 não tiveram CIMs menores a 1mg/mL. As duas frações mais apolares: 2 e 3 (testadas em concentrações de 0,1 mg/mL e 0,2 mg/mL) não inibiram o crescimento de *E. faecalis*. Comparando com a sensibilidade da outra bactéria grampositiva (*S.aureus*), o *Enterococcus faecalis* revelou-se menos sensível aos extratos testados. Esse resultado era esperado tendo-se em conta que na prática clínica, a terapia antimicrobiana para as infecções causadas por enterococos é mais complicada porque a maioria dos antibióticos não tem efeito bactericida em concentrações clinicamente relevantes. Dessa forma, as infecções enterocócicas sistêmicas são tratadas com um agente que atue na parede celular (um betalactâmico como a ampicilina, ou um glicopeptídeo, como a vancomicina) e um aminoglicosídeo (usualmente gentamicina ou estreptomicina).

O resultado obtido contra *Escherichia coli* foi semelhante ao apresentado com *E. faecalis*, pois nenhuma das frações testadas teve uma CIM menor que 1 mg/mL quando testadas contra *E. coli*.

O resultado mais expressivo foi obtido contra a bactéria gramnegativa *P. aeruginosa*, contra a qual, duas frações (6 e 7) demonstraram ter uma CIM menor que 1 mg/L. Porém a CIM não foi menor a obtida com o extrato bruto metanólico (CIM 0,1 mg/mL).

Comparando os resultados obtidos em relação à atividade antibacteriana do extrato bruto de casca do caule de *Croton urucurana* e suas diferentes frações obtidas com solventes orgânicos de diferentes polaridades, pode-se inferir que exista sinergismo entre os princípios ativos presentes no extrato bruto, uma vez que a CIM do extrato bruto é menor que a CIM das frações. Este resultado foi observado com as quatro bactérias testadas.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles de Vardar-Unlu *et al.* (2003), que observaram uma perda ou menor atividade antimicrobiana das frações do extrato metanólico da planta *Thymus pectinatus* em relação ao extrato bruto. Também Ramirez e Diaz (2007) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos e frações de *Rumex conglomeratus* e observaram que a

atividade deve-se a mais de um composto presente no extrato. Semelhante aos resultados obtidos no presente trabalho, os extratos mais polares da planta *Syzygium jambos* testados por Ramirez e Diaz (2007) e Djipa, Delmée e Quetin-Leckercq (2000) foram os mais ativos.

Além de verificar sinergismo entre os princípios ativos presentes no extrato de um mesmo órgão vegetal, também se pode obter um efeito sinérgico misturando os extratos obtidos de diferentes partes da planta, como observado por Van Vuuren e Viljoen (2008). Os autores testaram misturas de extratos de folhas, caule e raízes de *Croton gratisisimus*.

Esse sinergismo entre os princípios ativos de plantas medicinais é um dos pilares que sustentam os princípios da Fitoterapia, ciência que considera que, na maioria dos casos, a ação conjunta dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas tem uma melhor ação medicinal que a de um composto puro. Além disso, a Fitoterapia considera que o uso de misturas complexas evita os efeitos secundários e reações adversas produzidas por compostos isolados usados na medicina alopática (ALONSO, 2008; WINK, 2008b; PHILLIPSON, 2001; WILLIAMSON, 2001).

Winck (2008a) afirmou que as plantas produzem complexas misturas de metabólitos secundários compostos de diferentes classes estruturais que as protegem contra o ataque de herbívoros, bactérias, fungos e vírus. Essas complexas misturas podem conter um metabólito secundário que atua especificamente contra um alvo. Porém, a maioria dos metabólitos secundários pode ter diferentes alvos moleculares e atuar de uma maneira pleiotrópica.

No entanto, em outros estudos foi observado um aumento da atividade antimicrobiana nas frações. Por exemplo, Tonial (2010) observou que a fração de diclorometano-acetato de etila do de *Schinus terebenthifolius* foi três vezes mais ativa que o extrato bruto da folha contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Também Delaquis *et al.* (2002) observaram que frações de *Anethum graveolens* e *Coriandrum sativum* foram mais ativas contra *Pseudomonas fragi* e *Escherichia coli* O157:H7 em relação ao óleo bruto.

Um dos primeiros estudos da composição química e biológica de extratos de *Croton urucurana* foi realizado por Peres *et al.* (1997). Nesse estudo foi avaliada a atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *Salmonella typhimurium*, de frações e

compostos puros isolados de um extrato metanólico bruto de casca do caule da planta, coletada na cidade de Dourados (Mato Grosso do Sul, Brasil). O extrato aquoso-etanólico, as frações hexânica, hexano:diclorometano, acetato de etilo e metanol e os compostos puros catequina e ácido acetil aleurítico tiveram os seguintes valores de CIMs contra *S. aureus* linhagem ITAL SFCO 001: 2,0 mg/mL, 3,5 mg/mL, 0,8 mg/mL, 4,0 mg/mL e 5,0 mg/mL, 1,0 mg/mL e 0,1 mg/mL respectivamente. Contra *S. typhimurium* as CIMs foram de 5,0 mg/mL, 6,0 mg/mL, 4,0 mg/mL, 4,0 mg/mL, 5,0 mg/mL, 1,0 mg/mL e 0,1 mg/mL respectivamente.

Simionatto *et al.* (2007) analisaram a atividade antibacteriana e antioxidante do óleo essencial obtido de cascas do caule de *Croton urucurana*. Os microrganismos que se revelaram mais sensíveis ao óleo foram *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. setubal* com CIMs de 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL respectivamente.

Recentemente, Oliveira *et al.* (2008) realizaram uma triagem da atividade antibacteriana da folha, entrecasca e látex de *Croton urucurana*, coletados no Município de Melgaço (Mato Grosso, Brasil). As metodologias usadas foram o método de difusão em discos e microdiluição. Alguns dos resultados obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos obtidos pelos autores. Por exemplo, *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi um dos microrganismos mais sensíveis aos extratos etanólico e clorofórmico da entrecasca, ambos extratos tiveram CIMs de 0,25 mg/mL. No presente trabalho, utilizando o método da macrodiluição, o extrato metanólico bruto de casca do caule teve CIM de 0,1 mg/mL. Em relação à ação contra *S. aureus* ATCC 25923, no presente trabalho obteve-se CIM do extrato bruto metanólico de 0,5 mg/mL, igual valor foi obtido por Oliveira *et al.* (2008) com o extrato etanólico da entrecasca.

Comparando os resultados do presente trabalho com os de Peres *et al.* (1997) e Oliveira *et al.* (2008), e apesar de que não haver uma uniformidade nas metodologias de avaliação de atividade antimicrobiana, e no modo de extração dos princípios ativos e fracionamento, (fato que dificulta um estudo comparativo mais fidedigno), não há dúvida de que existam vários compostos com atividade antibacteriana na planta *Croton urucurana*, e que é muito provável que esses compostos atuem de maneira sinérgica. As diferentes sensibilidades das bactérias aos extratos brutos e frações devem-se provavelmente às diferenças estruturais entre elas, principalmente em termos de parede celular. Os extratos se mostraram

mais efetivos contra a bactéria *P. aeruginosa*, que apesar de ter uma estrutura de parede mais complexa, tem mais tipos de canais que possibilitariam a entrada dos metabólitos secundários com atividade antibacteriana.

Também se deve considerar que a atividade antimicrobiana de extratos vegetais pode ser influenciada pela fase de desenvolvimento do vegetal, clima, altura, tipo de solo, radiação solar, estresse, etc (VOLPATO *et al.*, 2001).

5.1.5 Ação do Extrato Bruto Metanólico Sobre o Crescimento de Fungos Filamentosos – Diluição em Agar

Os resultados da ação do extrato bruto metanólico contra *Microsporium gypseum* e *Fonsecaea monophora* estão descritos nas quadros 4 e 5 respectivamente e apresentam o diâmetro das colônias e a percentagem de inibição de crescimento em relação ao controle, após 7 dias de crescimento.

Extrato ou controle	Diâmetro da colônia aos 7 dias de crescimento	Porcentagem de inibição
Controle de crescimento	53,5 mm	-
Controle da ação do solvente	47,0 mm	12,1 %
Controle positivo fluconazol	6,3 mm	88,2 %
Controle positivo nistatina	19 mm	64,5%
Controle positivo miconazol	7,9 mm	85,2%
Extrato 5 mg/mL	6,6 mm	87,7%
Extrato 2,5 mg/mL	7,5 mm	86,0%
Extrato 0,5 mg/mL	10,3 mm	80,7%
Extrato 0, 25 mg/mL	25,3 mm	52,7%
Extrato 0,125 mg/mL	28,7 mm	46,4%

QUADRO 4 – DIÂMETRO DAS COLÔNIAS E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE DE *M. gypseum* NA PRESENÇA DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE CASCA DO CAULE DE *Croton urucurana*

Extrato ou controle	Diâmetro da colônia aos 15 dias de crescimento	Porcentagem de inibição
Controle de crescimento	29,8 mm	-
Controle da ação do solvente	22,8 mm	23,5%
Controle positivo fluconazol	8,0 mm	73,2%
Controle positivo nistatina	13,8 mm	53,7%
Controle positivo miconazol	13,2 mm	55,7%
Extrato 5 mg/mL	9,1 mm	69,5 %
Extrato 2,5 mg/mL	11,0 mm	63,1%
Extrato 0,5 mg/mL	13,5 mm	54,7%
Extrato 0, 25 mg/mL	21,4 mm	39,3%
Extrato 0,125 mg/mL	29 mm	2,7%

QUADRO 5 – DIÂMETRO DAS COLÔNIAS E PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DE *Fonsecaaea monophora* NA PRESENÇA DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE CASCA DO CAULE DE *Croton urucurana*

O extrato bruto de casca do caule de *Croton urucurana* demonstrou significativa ação de inibição sobre o crescimento do fungo patogênico humano, causador de micoses de peles *Microsporium gypseum* (FIGURA 9), sendo obtida inibição do crescimento de 87,7 % com a solução do extrato de 5 mg/mL. Entre os dermatófitos de origem geofílico que afetam o homem, esse fungo é um dos mais freqüentes.

O poder inibitório no crescimento de *M. gypseum* está em concordância com os estudos etnobotânicos realizados por Basualdo *et al.* (2003) e González Torres (1992) que coletaram dados do uso popular da planta *C. urucurana* no tratamento de micoses superficiais. Os resultados do presente trabalho contribuem para a validação científica do uso tradicional da planta.

O extrato também demonstrou atividade contra o fungo causador de micoses subcutâneas de difícil tratamento, *F. monophora* com 69,5% de inibição com solução de 5mg/mL do extrato.

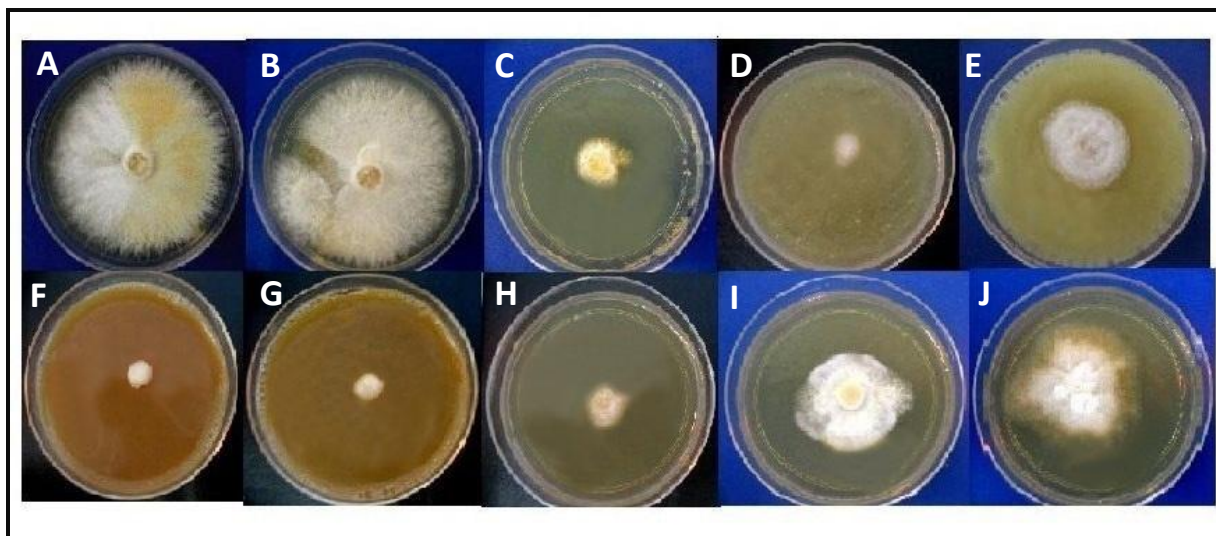


FIGURA 9 – CRESCIMENTO MICELIAL DAS COLÔNIAS DE *M. gypseum* NA PRESENÇA DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO DE CASCA DO CAULE DE *Croton urucurana*

A) Controle de crescimento de *Microsporium gypseum* (sem extrato); B) Controle da ação do solvente álcool etílico 70%; C) Controle positivo fluconazol; D) Controle positivo miconazol; E) Controle positivo nistatina; F) Extrato 5 mg/mL; G) Extrato 2,5 mg/mL; H) Extrato 0,5 mg/mL; I) Extrato 0,25 mg/mL; J) Extrato 0,125 mg/mL.

Não foi possível avaliar a ação do extrato com relação aos fungos *Guignardia citricarpa*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporium canis* devido à ação inibitória do solvente utilizado, já que os citados fungos demonstraram uma pronunciada inibição de crescimento na presença de álcool 70 %.

Outros autores também avaliaram a atividade antifúngica de extratos de *Croton urucurana*. Porém, tais estudos foram feitos com extratos de outras partes da planta e utilizando metodologias e linhagens de fungos diferentes. Gurgel *et al.* (2005) avaliaram a atividade antifúngica do látex pelo método de difusão em discos e pelo método da macrodiluição contra os fungos dermatófitos *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *M. canis* e *Epidermophyton floccosum*. No método de difusão em discos, utilizando o meio de cultura BDA e concentrações do extrato de 3,0-0,175 mg/mL, foram obtidos diâmetros de inibição de 25,6 a 6,0 mm. As CIMs foram determinadas realizando diluições seriadas do extrato em agar Sabouraud e todos os fungos testados tiveram CIMs de 2,5 mg/mL exceto o *T. tonsurans*, que teve uma CIM de 1,25 mg/mL. Portillo *et al.* (2001) realizaram uma triagem de atividade antifúngica de extratos aquosos, etanólicos e diclorometânicos

de 14 plantas utilizadas na medicina tradicional paraguaia, entre elas, testaram a atividade de folhas de *Croton urucurana*. Os autores utilizaram o método de difusão em discos, porém diferentemente de Gurgel *et al.* (2005), foi utilizado o agar Sabouraud ao invés do BDA. Foram observados halos de inibição do extrato diclometanico (10 mg/disco) contra *M. gypseum* (17 mm) e contra *T. mentagrophytes* (16 mm).

Outras espécies do gênero *Croton* também demonstram ter ação contra fungos patogênicos. Fontenelle *et al.* (2008) avaliaram a atividade de óleos essenciais de *C. zehntneri*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyloides* contra 10 linhagens de *M. canis*, 5 linhagens de *C. albicans* e 3 linhagens de *C. tropicalis* isolados de cachorros e gatos sintomáticos. Os óleos essenciais de *C. neapetifolius* e *C. argyrophyloides* mostraram-se inativos contra as espécies de *Candida*, entretanto apresentaram atividade contra *M. canis*. O óleo de *C. zehntneri* apresentou atividade antifúngica contra as duas espécies de *Candida* e contra *M. canis*.

Os resultados do presente trabalho, em concordância com os de Portillo *et al.* (2001); Gurgel *et al.* (2005) e Fontenelle *et al.* (2008), revelam que espécies vegetais do gênero *Croton* são uma fonte promissora para a obtenção de compostos com ação fungicida, em particular a espécie *Croton urucurana*, devido ao fato que mais de um órgão da planta contém princípios bioativos com ação contra os fungos testados.

5.2 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

A partir de 120 fragmentos de folhas e 120 fragmentos de caule de *Croton urucurana* foram isolados 194 fungos e 65 bactérias. No isolamento de microrganismos das folhas houve predominância de fungos. No entanto, na casca do caule houve predominância de bactérias. Os resultados estão sumarizados no quadro 6.

Partes da planta <i>Croton urucurana</i>	Número e porcentagem de bactérias	Número e porcentagem de fungos
<i>Croton urucurana</i> folhas	16 (8,2%)	178 (91,8%)
<i>Croton urucurana</i> casca do caule	49 (75,4%)	16 (24,6%)

QUADRO 6 –NÚMERO E PORCENTAGEM DE FUNGOS E BACTÉRIAS ISOLADOS DE FOLHAS E CASCA DO CAULE DE *Croton urucurana*

5.2.1 Identificação Macroscópica e Microscópica

Os fungos endofíticos foram identificados por meio das características macro e microscópicas. As figuras 10 a 13 ilustram exemplos. As colônias que não produziram conídios não foram identificadas.

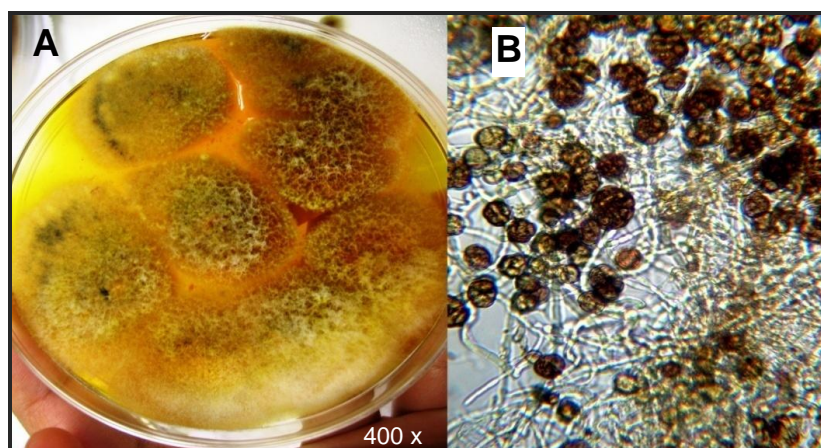


FIGURA 10 – MACRO E MICROMORFOLOGIA DO ISOLADO ENDOFITICO *Epicoccum* sp. FCU 055

A) Macromorfologia após 7 dias de crescimento meio BDA colônia de cor amarelada aspecto aveludado;
B) Micromorfologia: conídios globosos, amarelados, com septos transversais e longitudinais em agar fubá.

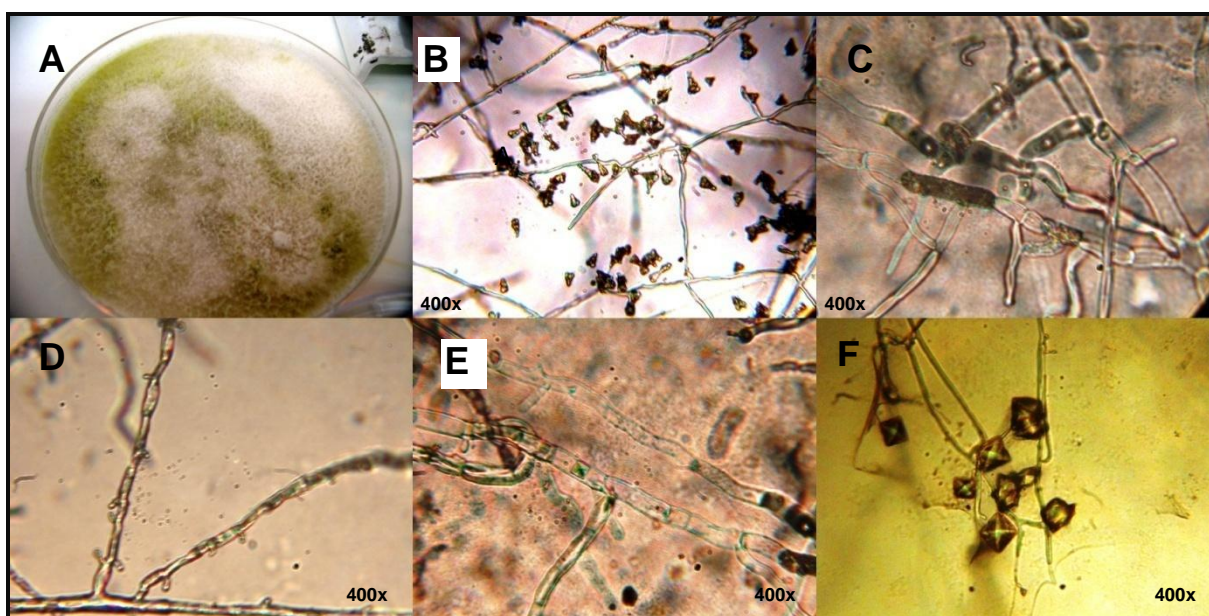


FIGURA 11 – MACRO E MICROMORFOLOGIA DO ISOLADO ENDOFITICO FCU 028

A) Macromorfologia aos 7 dias de crescimento meio BDA; B) Hifas e conídios agar BDA microcultivo; C) Hifas Meio BDA microcultivo; D) Hifas meio BDA microcultivo; E) Hifas com incrustação de cristal de oxalato de calcio Meio BDA microcultivo; F) Hifas e cristais de oxalato de cálcio em agar fubá microcultivo.

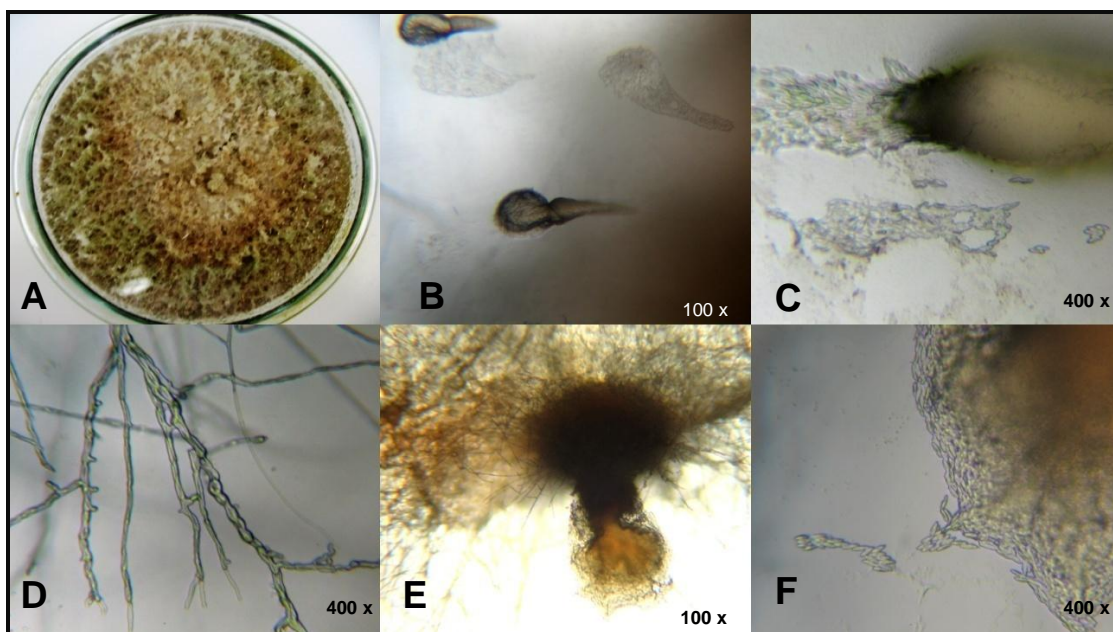


FIGURA 12 – MACRO E MICROMORFOL DO ISOLADO ENDOFITICO FCU 054

A) Macromorfologia aos 7 dias de crescimento meio BDA; B) e C) Estruturas fúngicas em meio BDA microcultivo; D) Hifas agar fubá milho; E) Peritécio em agar fubá microcultivo; F) conídios

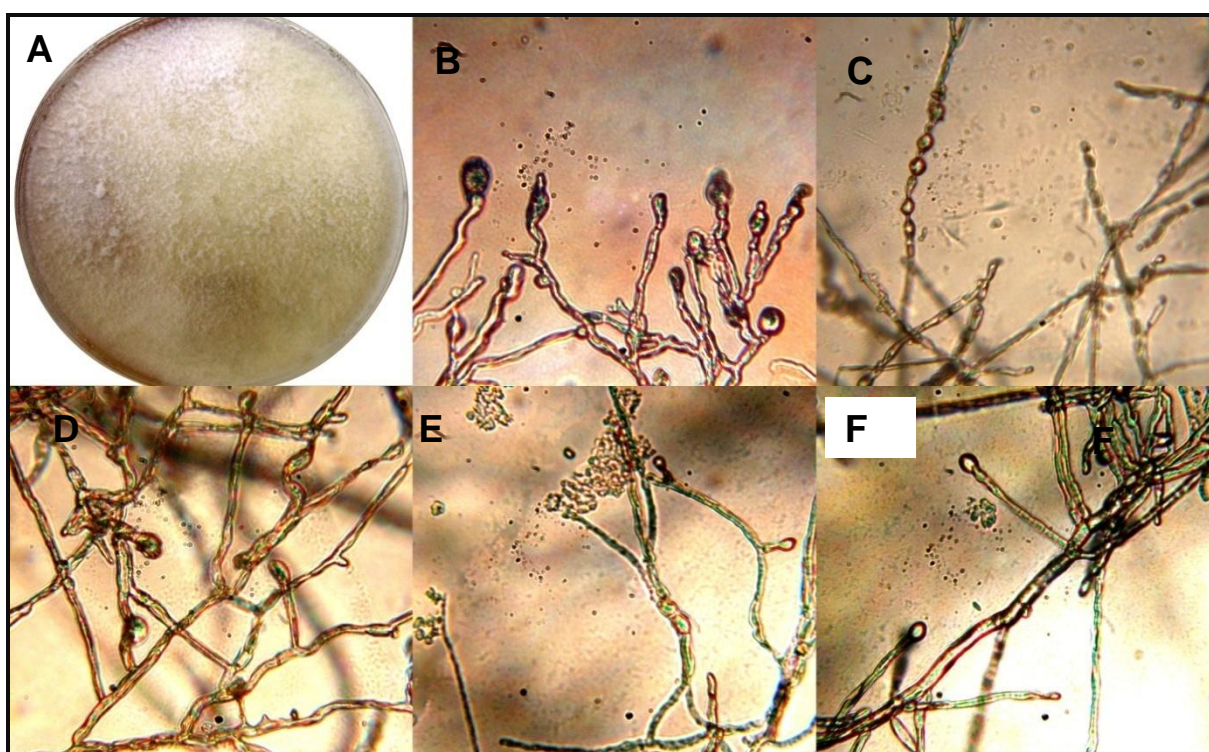


FIGURA 13 – MACRO E MICROMORFOLOGIA DO ISOLADO ENDOFITICO FCU 060

Notas: A) Macromorfologia aos 7 dias de crescimento meio BDA; B) Hifas meio Arroz microcultivo; C) Hifas e clamidoconídios Meio BDA microcultivo; D) Hifas em agar fubá microcultivo; E) e F) meio Sabouraud microcultivo

Em alguns dos fungos observados foi detectada a presença de cristais semelhantes aos observados por Benedek (1961, 1962) (ANEXOS 14 a 17). Segundo Stodůlková *et al.* (2008) a presença de cristais se relaciona com um composto cristalino com atividade antimicrobiana produzida pelo fungo *Quambalaria cyanescens*.

5.2.2 Seleção de Microorganismos com Maior Potencial Antimicrobiano

5.2.2.1 Antagonismo contra fungos patogênicos – cultura pareada

Um total de 27 fungos endofíticos foi escolhido para o ensaio de culturapareada contra as linhagens *G. citricarpa* 33/05 e *F. monophora* (CBS 102248). Os resultados desse teste de triagem de potencial antifúngico estão sumarizados nas tabelas 1 e 2.

As interações entre os fungos endofíticos e os patógenos foram classificadas em dois grupos:

Interação tipo 1, na qual ocorre uma superposição de hifas do endofítico sobre o patógeno, sugere a ocorrência de parasitismo. Contra *F. monophora*, 78% dos fungos endofíticos tiveram este tipo de interação, contra *G. citricarpa*, 74% dos fungos endofíticos apresentaram este tipo de interação.

Interação tipo 2, não ocorre sobreposição das hifas. Com *F. monophora* 22%, dos fungos endofíticos tiveram este tipo de interação, entretanto contra *G. citricarpa*, 26% apresentaram este tipo de interação.

O único isolado endofítico que não apresentou atividade antagônica contra os fungos patogênicos, aos 15 dias do teste, foi o isolado FCU 021. Todos os demais apresentaram efeito antagônico, sendo que os valores oscilaram entre 1,4% e 56,9% contra *Guignardia citricarpa* e 5,4% e 76,7% contra *F. monophora*.

Dos 27 fungos endofíticos testados, 5 (18,5%) apresentaram porcentagem de inibição maior de 50% contra *G. citricarpa*. Em relação ao antagonismo contra *Fonsecaea monophora*, 44,5% apresentaram inibição maior de 50%. Os fungos endofíticos que apresentaram altas porcentagens de inibição contra o fitopatógeno

são candidatos a futuros trabalhos para o aprofundamento de seu potencial no uso de controle biológico da mancha preta dos citros.

Os três isolados endofíticos que demonstraram maior poder inibitório contra *G. citricarpa* foram os isolados FCU 060 (58,5%), FCU 028 (56,9%) e FCU 136 (56,4%). Em relação á atividade contra *F. monophora* os mais ativos foram os isolados FCU 060 (76,7%), FCU 028 (70,2%) e FCU 077 (69,4%).

Na placa do teste de antagonismo do isolado FCU 028 contra *G. citricarpa*, chamou a atenção a produção de um pigmento amarelo-esverdeado ao redor do fungo fitopatogênico (FIGURA 13 B). Este pigmento pode tratar-se de compostos antifúngicos produzidos pelo endofítico.

Análise estatística dos resultados do teste de antagonismo aos 15 dias (Anova, teste de Tukey) demonstrou que há diferenças significativas entre o controle e os isolados de endofíticos avaliados. Os resultados do estudo estatístico estão sumerizados nos anexos 1 ao 11.

TABELA 1 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICIAL DO FUNGO *Guignardia citricarpa* NO TESTE DE ANTAGONISMO CONTRA FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana*

Código do endofítico	Gênero	<i>Guignardia citricarpa</i>	
		% de inibição 7 dias	% de inibição 15 dias
FCU 001	-	22,9 %	39,3%
FCU 021	<i>Phoma</i> sp.	Não houve inibição	Não houve inibição
FCU 027	<i>Alternaria</i> sp.	9,4%	25,4%
FCU 028	-	44,5%	56,9%
FCU 037	<i>Helminthosporium</i>	18,1%	35,9%
FCU 038	<i>Fumago</i> sp.	14,8%	38,3%
FCU 042	<i>Alternaria</i> sp.	26,3%	41,0%
FCU 048	-	29,9%	43,6%
FCU 054	-	16,7%	50,8%
FCU 055	<i>Epicoccum</i> sp.	4,4%	1,6%
FCU 056	<i>Alternaria</i> sp.	14,5%	42,7%
FCU 060	-	55,5%	58,5%
FCU 067	<i>Epicoccum</i> sp.	14,6%	29,0%
FCU 075	<i>Alternaria</i> sp.	3,2%	12,7%
FCU 077	-	12,5%	50,8%
FCU 081	-	14,5%	25,6%
FCU 085	<i>Alternaria</i> sp.	16,9%	32,5%
FCU 087	-	Não houve inibição	16,2%
FCU 088	-	Não houve inibição	11,5%
FCU 103	<i>Alternaria</i> sp.	13,7%	28,4%
FCU 124	-	17,7%	42,1%
FCU 129	<i>Alternaria</i> sp.	15,8%	38,8%
FCU 136	-	24,1%	56,4%
FCU 143	<i>Aspergillus</i> sp.	15,7%	32,5%
FCU 168	<i>Epicoccum</i> sp.	Não houve inibicao	17,9%
FCU 172	<i>Helminthosporium</i> sp.	Não houve inibicao	26,5%
FCU 174	-	13,7%	36,6%

TABELA 2 – PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO *Fonsecaea monophora* NO TESTE DE ANTAGONISMO CONTRA FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana*

Código do endofítico	Gênero	<i>Fonsecaea monophora</i>	
		% de inibição 7 dias	% de inibição 15 dias
FCU 001	-	36,4%	61,5%
FCU 021	<i>Phoma</i> sp.	2,8%	Não houve inibição
FCU 027	<i>Alternaria</i> sp.	8,5%	39,5%
FCU 028	-	44,6%	70,2%
FCU 037	<i>Helminthosporium</i>	42,4%	65,9%
FCU 038	<i>Fumago</i> sp.	9,1%	27,4%
FCU 042	<i>Alternaria</i> sp.	38,4%	60,5%
FCU 048	-	41,3%	66,7%
FCU 054	-	39,2%	63,9%
FCU 055	<i>Epicoccum</i> sp.	25,6%	36,9%
FCU 056	<i>Alternaria</i> sp.	6,2%	13,4%
FCU 060	-	57,7%	76,7%
FCU 067	<i>Epicoccum</i> sp.	26,5%	47,0%
FCU 075	<i>Alternaria</i> sp.	2,8%	39,5%
FCU 077	-	47,5%	69,4%
FCU 081	-	8,7%	16,2%
FCU 085	<i>Alternaria</i> sp.	28,3%	50,3%
FCU 087	-	21,2%	50,3%
FCU 088	-	22,5%	31,9%
FCU 103	<i>Alternaria</i> sp.	23,2%	43,0%
FCU 124	-	42,3%	63,3%
FCU 129	<i>Alternaria</i> sp.	10,7%	29,9%
FCU 136	-	40,8%	63,4%
FCU 143	<i>Aspergillus</i> sp.	48,9%	67,2%
FCU 168	<i>Epicoccum</i> sp.	12,0%	5,4%
FCU 172	<i>Helminthosporium</i> sp.	38,0%	63,9%
FCU 174	-	21,5%	48,1%

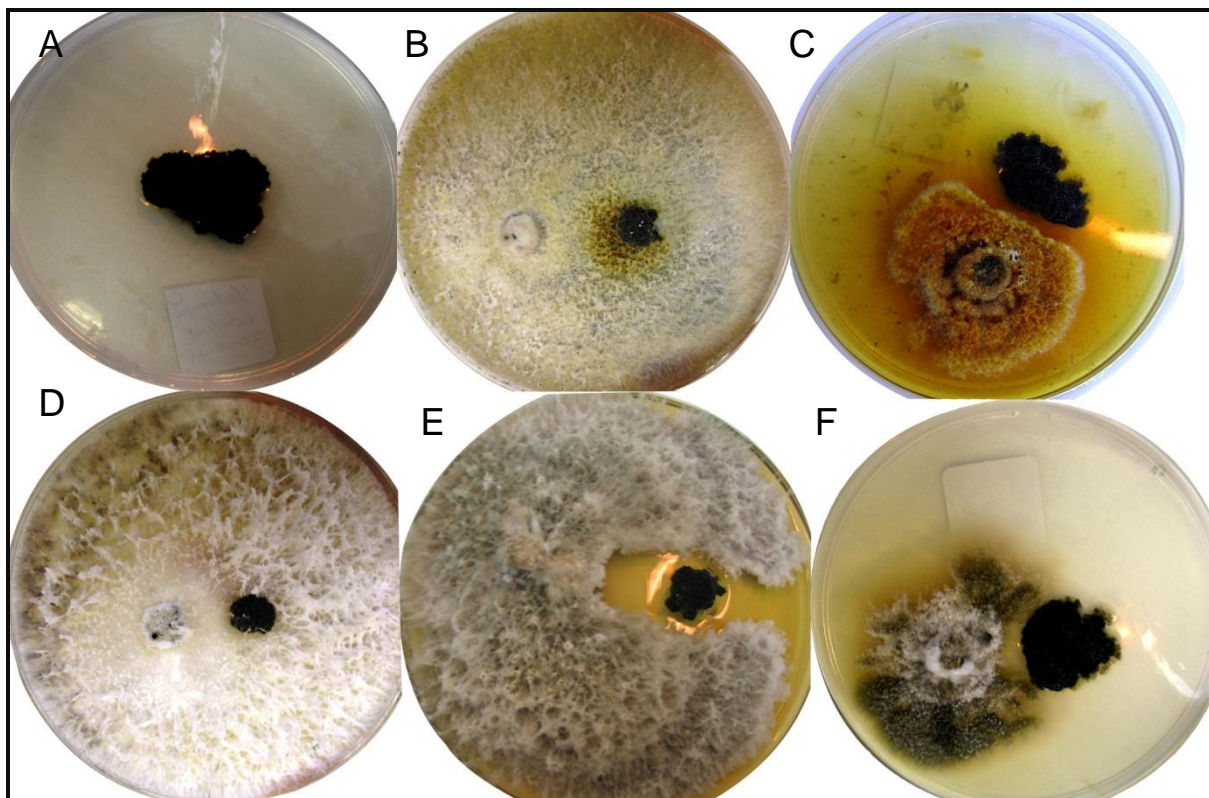


FIGURA 14 –TESTE DE ANTAGONISMO DE PAREAMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS CONTRA O FUNGO *Guignardia citricarpa*

A) Controle de crescimento do fungo *G. citricarpa* após 15 dias de incubação, B) Efeito antagônico do isolado endofítico FCU 028, C) Efeito antagônico do isolado endofítico FCU 055, D) Efeito antagônico do isolado endofítico FCU 060, E) Efeito antagônico do isolado endofítico FCU 075, F) Efeito antagônico do isolado endofítico FCU 088.

Quando dois diferentes microrganismos são cultivados na superfície de um meio de cultura, como no teste de cultura pareada realizado, um deles é frequentemente afetado negativamente pelo crescimento do outro. O referido antagonismo pode ocorrer por uma variedade de maneiras, mas frequentemente é devido à produção de metabólitos secundários por um microrganismo que interfere com o metabolismo do outro. Estes metabólitos secundários são conhecidos como antibióticos (CARLILE, WATKINSON e GOODWAY, 2007). Esta interação pode ser visualizada na figura 14.

Em testes de atividades antagônicas realizados por Klingström e Johansson (1972) com isolados do fungo *Scytalidium* observaram que os fungos que produziam pigmentos e cristais apresentaram pronunciado antagonismo contra

fungos patogênicos. Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho, conforme Tabelas 1 e 2 e Anexos 14 a 17.

5.2.2.2 Antagonismo contra bactérias e levedura patogênicas

Em contraste com o teste de antagonismo contra fungos patogênicos, uma porcentagem muito pequena (7,4%) dos 27 fungos endofíticos testados apresentou atividade inibitória contra as bactérias e a levedura testadas. Somente os fungos endofíticos FCU 027 e FCU 055 produziram halos de inibição. Os resultados do teste estão sumarizados no anexo 12.

Esse fato pode se dever ao período curto de incubação realizado na prova (24 h para o teste contra as bactérias e 48 h para a levedura), já que a produção de metabólitos secundários (que são os responsáveis pela atividade biológica) sucede geralmente na fase de crescimento estacionário dos microrganismos (CARLILE, WATKINSON e GOODWAY 2007; BERDY, 2005; DEMAINE, 1998).

Também a metodologia usada pode influenciar notoriamente a detecção de uma atividade biológica. Favaro (2009) testou a atividade antibacteriana de *Epicoccum* sp isolados como endófitos de *Saccharum officinarum* L. pelos métodos de blocos de agar (método de Ichicawa) e pelo método de difusão em agar semissólido. 50% dos isolados de *Epicoccum* testados contra *Xanthomonas albilineans* demonstraram atividade, entretanto, pelo método de agar semissólido, 87% dos isolados evidenciaram atividade antibacteriana.

Portanto infere-se que para futuros testes seja necessário testar mais de uma metodologia para evitar a obtenção de resultados falsos negativos.

5.2.3 Produção de metabólitos a partir de fungos endofíticos cultivados em meios líquidos e sólidos

Seis fungos endofíticos foram selecionados para cultivo em meio líquido (milho e malte) para a produção de metabólitos secundários: FCU 028, FCU 042, FCU 054, FCU 055, FCU 060 e FCU 077.

Não foi possível a extração com acetato de etila dos metabólitos produzidos pelos endofíticos FCU 042 e FCU 055 em meio malte líquido devido à formação de uma emulsão persistente ao adicionar o solvente, que não foi quebrada com a adição de uma solução sobressaturada de cloreto de sódio. Em total foram obtidos 22 extratos de endofíticos cultivados em meio líquido.

Foram selecionados 5 fungos endofíticos para cultivo em meio sólido (milho e arroz em grãos) para a produção de metabólitos secundários (FCU 028, FCU 042, FCU 055, FCU 060 e FCU 077), obtendo-se 10 extratos.

5.2.4 Atividade Antimicrobiana dos Extratos de Endofíticos

5.2.4.1 Atividade dos extratos diante de *Guignardia citricarpa* e *Fonsecaea monophora*

Os 32 extratos de endofíticos foram avaliados em seu potencial antifúngico contra *G. citricarpa* e *F. monophora* pelo método descrito no item 4.5.7.2 . Os resultados estão apresentados no anexo 13. A ação dos controles e de alguns extratos pode ser observada na figura 15.

O melhor resultado foi obtido com o extrato bruto metanólico do isolado endofítico FCU 055 *Epicoccum* sp. (41% de inibição sobre o crescimento de *G. citricarpa*, os controles deorsal e glifosinato inibiram 47,2% e 44,1% respectivamente) cultivado em meio milho em grãos. Esse resultado é bastante interessante já que o fungo endofítico foi capaz de produzir substâncias bioativas em um meio de cultura bastante barato como é o caso do milho.

Vários trabalhos relacionaram a capacidade de linhagens do gênero *Epicoccum* no controle de fitopatógenos: Larena *et al.* (2005) evidenciaram a capacidade desse fungo em combater o fungo fitopatogênico *Monilinia laxa*. Huang *et al.* (2000) e Zhou, Reelender e Sparace (1991) demonstraram o efeito antagônico de *Epicoccum purpurascens* contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Brown, Finlay e Ward (1987) avaliaram o potencial antifúngico de *Epicoccum purpurascens* contra os fitopatogênicos *Phytophthora* sp., *Pythium* sp. e *Fusarium oxysporum*.

Bamford, Norris e Ward (1961) evidenciaram a produção do composto antifúngico flavipina por linhagens de *Epicoccum* sp. Ikawa *et al.* (1978) revelaram a atividade antifúngica de um polieno, epirodin, produzido por *Epicoccum nigrum*.

Nenhum dos extratos de endofíticos testados neste trabalho evidenciou atividade significativa contra o crescimento do fungo patogênico *F. monophora* apesar de os fungos a partir dos quais foram elaborados os extratos terem demonstrado atividade inibitória no teste de cultura pareada descrito anteriormente (ANEXO 13). Um dos motivos desse resultado pode ser devido à pouca solubilidade da substância antimicrobiana no meio de cultura utilizado, como afirmado por Marasciulo *et al.* (2006). Portanto, os extratos precisam futuramente ser avaliados por outras metodologias para determinar o potencial antifúngico contra *F. monophora*.

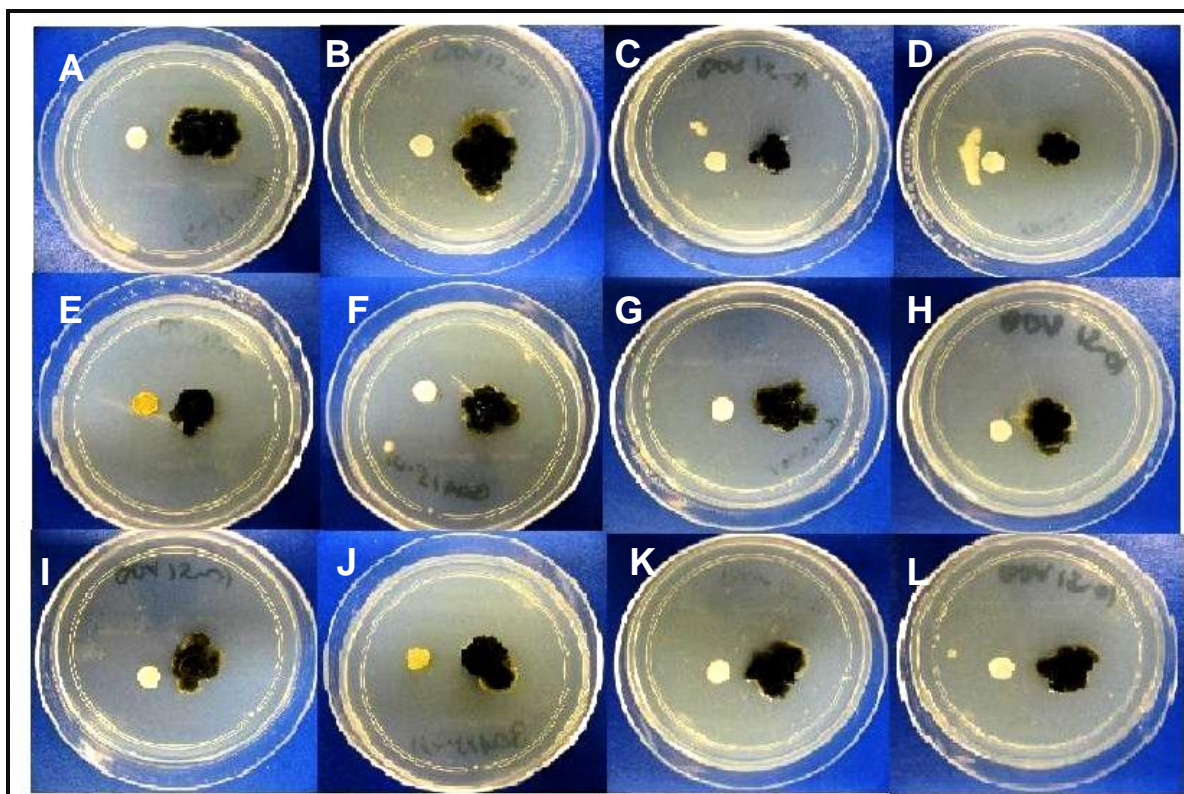


FIGURA 15 – ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE ENDOFÍTICOS CONTRA O CRESCIMENTO DE *Guignardia citricarpa*

Notas: A) Placa com disco de papel de filtro com água destilada autoclavada; B) disco com metanol (controle da ação do solvente); C) Disco com controle positivo glifosinato; D) Disco com controle positivo derosal; E) Disco com extrato do isolado FCU 055 cultivado em meio milho sólido, extraído com metanol, F) Disco com extrato metanólico FCU 042, arroz sólido; G) Disco com extrato metanólico do isolado FCU 028 cultivado em meio arroz sólido; H) Disco com extrato metanólico do isolado FCU 060 cultivado em milho sólido; I) Disco com extrato metanólico do isolado FCU 055 cultivado em meio milho líquido; J) Disco com extrato de acetato de etila do isolado FCU 042 cultivado em meio milho líquido; K) Disco com extrato metanólico de do isolado FCU 028 cultivado em meio malte líquido; L) Disco com extrato de acetato de etila do isolado FCU 060 cultivado em meio malte líquido.

5.2.4.2 Atividade dos extratos frente a bactérias e levedura

Os resultados da ação dos extratos de endofíticos contra duas bactérias e uma levedura estão apresentados no quadro 7.

Código do extrato	Extrato de endofítico	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Controle gentamicina		30 mm	26 mm	
Controle nistatina				25 mm
Controle negativo		-	-	-
Controle de solvente		-	-	-
1 028 1	FCU 028 MILHO ACETATO	-	13 m	-
2 028 2	FCU 028 MAIZ liq METANOL	-	-	-
3 028 3	FCU 028 MALTE ACETATO	-	12 mm	-
4 028 4	FCU 028 MALTE METANOL	-	-	-
5 028 5	FCU 028 ARROZ SOLIDO METANOL	-	-	-
6 028 6	FCU 028 MILHO SOLIDO METANOL	-	-	11 mm
7 042 1	FCU 042 MILHO liq ACETATO	13 mm	-	-
8 042 2	FCU 042 MILHO liq METANOL	-	-	-
9 042 4	FCU 042 MALTE METANOL	18 mm	-	15 mm
10 042 5	FCU 042 ARROZ sólido METANOL	-	-	13 mm
11 042 6	FCU 042 MILHO sólido METANOL	11 mm	11 mm	-
12 055 1	FCU 055 MILHO liq ACETATO	-	-	-
13 055 2	FCU 055 MILHO liq METANOL	13 mm	14 mm	-
14 055 4	FCU 055 MALTE METANOL	-	-	-
15 055 5	FCU 055 ARROZ sólido METANOL	-	10 mm	-
16 055 6	FCU 055 MAIZ sólido METANOL	-	15 mm	-
17 060 1	FCU 060 MILHO liq ACETATO	-	-	-
18 060 2	FCU 060 MILHO liq METANOL	-	-	-
19 060 3	FCU 060 MALTE ACETATO	-	-	-
20 060 4	FCU 060 MALTE METANOL	-	-	-
21 060 5	FCU 060 ARROZ sólido METANOL	-	-	-
22 060 6	FCU 060 MAIZ sólido METANOL	-	-	10 mm
23 077 1	FCU 077 MILHO liq ACETATO	-	-	-
24 077 2	FCU 077 MILHO liq METANOL	-	15 mm	-
25 077 3	FCU 077 MALTE liq ACETATO	-	-	-
26 077 4	FCU 077 MALTE liq METANOL	-	-	-
27 077 5	FCU 077 ARROZ sólido METANOL	-	-	12 mm
28 077 6	FCU 077 MAIZ sólido METANOL	13 mm	15 mm	-
29 054 1	FCU 054 MILHO liq ACETATO	-	-	-
30 054 2	FCU 054 MAILHOliq METANOL	-	-	11 mm
31 054 3	FCU 054 MALTE liq ACETATO	-	-	-
32 054 4	FCU 054 MALTE liq METANOL	-	-	-

QUADRO 7 – ATIVIDADE DOS EXTRATOS DE ENDOFÍTICOS FRENTE A BACTÉRIAS E LEVEDURA DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Notas: Código dos extratos (primeira coluna a esquerda) **1-32** números dos extratos; 028, 042, 054, 055, 060 e 077 números de endofíticos; 1-6 tipo de solvente e meio de cultivo: 1, meio milho líquido solvente de extração acetato, 2 meio milho líquido solvente de extração metanol, 3 meio malte líquido solvente de extração acetato, 4 meio malte líquido solvente de extração metanol, 5 meio arroz sólido solvente de extração metanol, 6 meio milho sólido solvente de extração metanol.

Conforme a tabela 10, 15,2% dos extratos de endofíticos produziram halos de inibição contra *S. aureus*, 25% foram ativos contra *P. aeruginosa* e 18,8% tiveram atividade contra *C. albicans*. No teste de triagem, só o isolado FCU 055 apresentou atividade contra *P. aeruginosa* (ANEXO 12). Os demais isolados endofíticos não tinham apresentado atividade antimicrobiana na triagem, porém alguns extratos demonstraram atividade, provavelmente pelo fato de que com a prolongamento do tempo de incubação, foi favorecida a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana. Estudos posteriores de determinação de concentração inibitória mínima, elucidação estrutural e toxicidade são necessários para melhor avaliação do potencial desses fungos como fontes de novos antibióticos.

5.2.5 Variação da Produção de Compostos Antimicrobianos nos Diferentes Meios de Cultura

Na análise comparativa dos dados obtidos nos quadros 7, 8 e 10 e no anexo 13 entre a atividade antifúngica e antimicrobiana e meio de cultura utilizado, pode-se notar uma ampla variação na produção de compostos bioativos de acordo com o isolado fúngico e meio de cultura utilizados. Estes resultados estão em concordância ao afirmado por Frisvald e Filtenborg (1983); Thrane (1993); Demain (1998); Andersen *et al.* (2001); Demain (2006) e Frisvald *et al.* (2008), que sugerem que uma produção satisfatória de metabólitos secundários bioativos depende muito do meio de cultura onde o fungo é cultivado. Por exemplo, no quadro 8 estão apresentados os diferentes graus de inibição dos extratos obtidos de diferentes meios de cultura do isolado endofítico FCU 055 contra o crescimento micelial de *G. citricarpa*. O melhor resultado foi observado com o extrato cultivado em meio milho sólido (grãos), que tem a vantagem de ser um meio econômico. A menor porcentagem de inibição foi obtida com o extrato cultivado em meio Malte líquido.

Também com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar a importância da pesquisa de produção de substâncias antimicrobianas não somente no caldo de cultura, como também realizar a extração do micélio. Stone, Polishook, e White, (2004) afirmaram que muitos dos compostos antifúngicos e antibacterianos obtidos de fungos endofíticos de plantas não gramíneas são intracelulares, motivo pelo qual há necessidade de extrair tanto o meio líquido como o micélio na procura de princípios

potencialmente bioativos. Esse fato pode ser evidenciado nos resultados expostos no quadro 9, por exemplo, o extrato do caldo malte do fungo endofítico FCU 028 produziu inibição de 6,2% contra o fungo *G. citricarpa*, porém o extrato obtido do micélio crescido no caldo produziu inibição de 24,8% (4 vezes mais ativo em relação ao extrato do caldo). Em relação ao fungo FCU 060, tanto do caldo malte como do micélio crescido nesse meio foram extraídos compostos com semelhante poder de inibição contra *G. citricarpa* (23% e 23,6% respectivamente).

Borges (2008) demonstrou que para o mesmo fungo os metabólitos variaram em funções das condições de cultivo. Genes que estão silenciados para a produção de um determinado metabólito podem se manifestar apenas pela simples variação de temperatura, fonte de carbono do meio ou aeração.

Código do extrato	Meio e solvente	% de inibição
CP D	Controle positivo Derosal	47,2
CP G	Controle positivo Glifosinato	44,1
12 055 1	Milho líquido acetato (caldo)	21,1
13 055 2	Milho líquido metanol (micélio)	21,1
14 055 4	Malte líquido metanol (micélio)	13,0
15 055 5	Arroz sólido metanol	33,5
16 055 6	Milho sólido metanol	41,0

QUADRO 8 – PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO *Guignardia citricarpa* NA PRESENÇA DE DIFERENTES EXTRATOS DO FUNGO ENDOFÍTICO FCU 055

Código do extrato	Meio e solvente	% de inibição
CP D	Controle positivo Derosal	47,2
CP G	Controle positivo Glifosinato	44,1
1 028 1	Milho líquido acetato (caldo)	25,5
2 028 2	Milho líquido metanol (micélio)	27,3
3 028 3	Malte líquido acetato	6,2
4 028 4	Malte líquido metanol	24,8
5 028 5	Arroz sólido metanol	19,9
6 028 6	Milho sólido metanol	23,6

QUADRO 9 – PERCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL DO FUNGO *Guignardia citricarpa* NA PRESENÇA DE DIFERENTES EXTRATOS DO FUNGO ENDOFÍTICO FCU 028

5.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada dos Extratos Vegetais

Para a verificação da presença de classes de metabólitos secundários por meio de CCD foram selecionados 5 extratos de *Croton urucurana*.

Reveladores e compostos detectados	Uv curta	Uv comprida	Anisaldeído, açúcares, esteróides e terpenos	Cloreto férrico, compostos fenólicos e ácidos hidroxâmicos	Dragendorff alcalóides	Ninhidrina, compostos nitrogenados	Hidróxido de potássio cumarinas e antraquinonas	Vanilina ácido sulfúrico – VAS, fenóis, esteróides e óleos essenciais
1 Extrato bruto do caule <i>C. urucurana</i>	N Abs	Abs	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
2 Fração 5 Acetato de etila	N Abs	Abs	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
3 Fração 6 Acetato de etila metanol	N Abs	Abs	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
4 Fração Metanol	N Abs	Abs	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
5 Extrato metanólico bruto folhas <i>C. urucurana</i>	Abs	Abs	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)

QUADRO 10 – DETECÇÃO DE CLASSES DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES EM EXTRATOS DE *Croton urucurana*

Notas: Abs: absorve; N Abs: não absorve; (+) presença; (-) ausência.

Os resultados obtidos no quadro 10 evidenciam a presença de vários metabólitos secundários nos extratos vegetais. As cromatofolhas reveladas com 4 reveladores diferentes podem ser observadas na figura 16.

O único revelador que apresentou um resultado negativo para todos os extratos vegetais foi a solução metanólica de Hidróxido de potássio, o que sugere ausência de cumarinas e antraquinonas nas amostras.

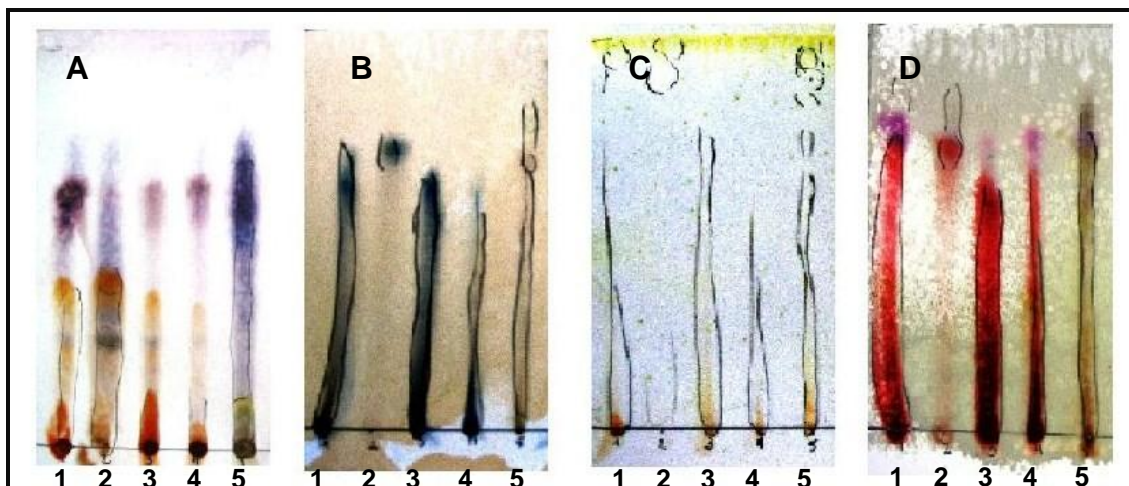


FIGURA16 – CROMATOGRAFIAS EM CAMADA DELGADA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE *Croton urucurana*

A) CCD revelada com anisaldeído, B) CCD revelada com cloreto férrico, C) CCD revelada com Dragendorff, D) CCD revelada com Vanillina-ácido sulfúrico, 1) Extrato bruto metanólico de casca do caule de *Croton urucurana*, 2) Fração acetato de etila do extrato bruto do caule, 3) Fração acetato de etila: metanol do extrato bruto do caule, 4) Fração metanólica do extrato bruto do caule, 5) Extrato bruto metanólico de folhas de *C. urucurana*.

O extrato bruto metanólico de casca do caule que demonstrou ser o extrato vegetal mais ativo contra todas as bactérias testadas, particularmente ativo contra *Pseudomonas aeruginosa* (CIM: 0,1mg/mL), analisado através de cromatografia em camada delgada, acusou a presença de compostos fenólicos evidenciados com os reveladores cloreto férrico (manchas azuis) e vanillina ácido sulfúrico (manchas vermelhas), de acordo com Wagner e Bladt (1996) e Costa (2000). Também foi detectada a presença de compostos nitrogenados através dos reagentes Dragendorff e Ninhidrina. Entre as frações ativas (acetato de etila, acetato de etila metanol e metanólica), a que teve um perfil cromatográfico mais semelhante ao extrato bruto foi a fração acetato de etila metanol, que coincidentemente, foi, entre as frações, a que se demonstrou mais ativa entre os microrganismos testados, porém com menos eficácia que o extrato bruto metanólico. Estes resultados estão em concordância ao estudo realizado por Rios e Recio (2005), que realizaram uma ampla revisão de artigos sobre a atividade antimicrobiana de plantas medicinais. Eles afirmaram que, na maioria dos casos, os compostos químicos de natureza fenólica estão envolvidos na atividade antimicrobiana.

5.3.2 Cromatografia em Camada Delgada dos Extratos de Endofíticos

Os resultados da CCD de 16 extratos de endofíticos ativos estão apresentados no quadro 11. Através deste estudo em CCD demonstrou-se a presença de vários tipos de metabólitos nos extratos de fungos endofíticos de *Croton urucurana*. Foram feitas corridas cromatográficas de extratos ativos dos isolados endofíticos FCU 028, FCU 042, FCU 054 FCU 055, FCU 060 e FCU 077. Com os reagentes reveladores utilizados na CCD foi detectada a presença de esteroides e terpenos, compostos fenólicos, alcaloides e outros compostos nitrogenados, cumarinas e ou antraquinonas.

A positividade nos resultados dos reveladores de Dragendorf e Ninhidrina poderia indicar a presença de compostos de natureza dicetoperazínica (pois são compostos que contêm nitrogênio na estrutura) que são frequentemente isolados de fontes fúngicas. Várias atividades biológicas são atribuídas a este tipo de compostos: atividade antiproliferativa, citotóxica, antitumoral, imunomoduladora, antinematocida, e antibacteriana (ZHANG *et al.*, 2007).

	Uv corta	Uv comprida	Anisaldehido acucares, esteróides e terpenos)	Cloreto ferricocompostos fenolicos e ácidos hidroxâmico)	Dragenddorf alcalóides	Ninh compostos nitrogenados idrina	Hidroxido de potássio, cumarinas e antraquinonas a	Vanillina acido sulfúrico- VAS, fenóis, esteróides e óleos essenciais
FCU 028 Milho liquido acetato	N Abs	Abs	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
FCU 028 Malte liquido acetato	Abs	Abs	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
FCU 042 Malte liquido metanol	Abs	Abs	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
FCU 042 Arroz sólido metanol	Abs	Abs	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
FCU 042 Milho sólido metanol	Abs	Abs	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
FCU 055 Milho liquido acetato	N Abs	N Abs	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
FCU 055 Milho liquido metanol	N Abs	N Abs	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
FCU 055 Malte liquido metanol	N Abs	N Abs	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
FCU 055 Arroz sólido metanol	N Abs	Abs	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
FCU 055 Milho sólido metanol	N Abs	Abs	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)
FCU 060 Arroz solido metanol	Abs	Abs	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
FCU 060 Milho sólido metanol	N Abs	N Abs	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
FCU 077 Arroz sólido metanol	Abs	Abs	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)
FCU 077 Milho liquido metanol	N Abs	N Abs	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
FCU 077 Milho sólido metanol	N Abs	N Abs	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
FCU 054 Milho liquido metanol	N Abs	N Abs	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)

QUADRO 11 – DETECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM EXTRATOS DE FUNGOS
ENDOFITICOS DE *Croton urucurana*

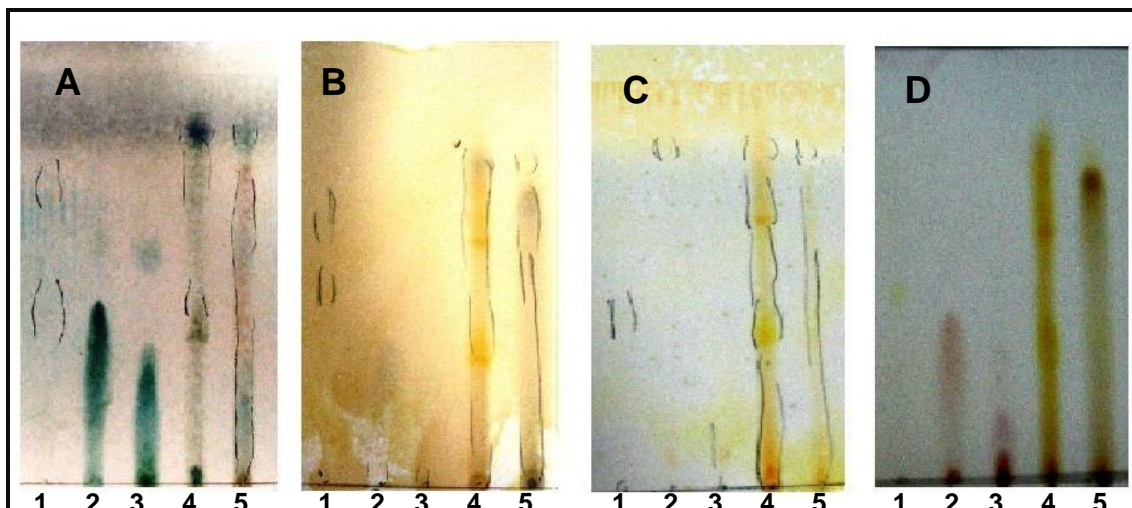


FIGURA 17 – EXTRATOS DO FUNGO ENDOFÍTICO FCU 055 CULTIVADOS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA E ANALISADOS POR CCD

A) Cromatofolha revelada com Anisaldeído, B) Cloreto férrico, C) Dragendorff, D) Ninhidrina, 1) Extrato de acetato de etila, meio milho líquido, 2) Extrato metanólico, meio milho líquido, 3) Extrato metanólico meio malte líquido, 4) Extrato metanólico meio arroz sólido, 5) Extrato metanólico meio milho sólido.

Evidenciou-se também a variação do perfil cromatográfico de acordo com o meio de cultura utilizado, como observado na figura 16, comparando os extratos em diferentes meios de cultura do isolado endofítico FCU 055 *Epicoccum* sp.. Esse resultado está de acordo ao afirmado por Favaro (2009) e Wright, Osterhage e König (2003), que atribuem a esse fungo um metabolismo secundário altamente desenvolvido e diverso, o que o faz capaz de produzir vários tipos de metabólitos bioativos, como os descritos por Baute *et al.* (1978); Ikawa *et al.* (1978); Wright, Osterhage e König (2003) e Zhang *et al.* (2007).

A produção de alcaloides por parte desse fungo foi só detectada em meio de cultura sólido. Um resultado semelhante foi o descrito por NIELSEN *et al.* (2004) em relação à produção de alcalóides por *Penicillium solitum*.

Também se pode ter uma diferença na produção de compostos entre linhagens diferentes de uma mesma espécie de fungo, como observado por Mallea *et al.* (1993), que realizaram um estudo comparativo por cromatografia em camada delgada de extratos de diferentes isolados de *Epicoccum purpurascens*, com atividade antimicrobiana, isolados de folhas de *Quercus ilex* e da atmosfera. A CCD

detectou a presença de flavipina como um dos compostos presentes em todas as linhagens do *Epicoccum* analisadas, porém a substância Epicorazone B foi detectada somente nas duas linhagens mais ativas.

Os resultados obtidos nos perfis cromatográficos em camada delgada evidenciam a importante influência das condições do meio de cultura e método de extração para a obtenção de metabólitos bioativos. Futuros trabalhos são necessários para a otimização de condições de cultura e extração, a fim de melhorar a produção dos compostos ativos.

Comparando os metabólitos secundários detectados por CCD de extratos vegetais e fúngicos, pode-se afirmar que ambos organismos apresentam uma alta capacidade biossintética de produção de estruturas químicas pertencentes a diferentes grupos. Para se avaliar de maneira mais fidedigna a influência dos endofíticos no extrato bruto vegetal, devem ser realizados estudos químicos mais aprofundados como os realizados por Redko *et al.* (2006), que, através de um estudo comparativo de perfis de HPLC de extratos vegetais de *Erythrina crista galli* e do extrato de um fungo endofítico encontraram dois flavonoides presentes em ambos os extratos. Onocha *et al.* (1995) e Yin *et al.* (2004) detectaram por meio de HPLC a presença de típicos metabólitos fúngicos em extratos das plantas *Anthocleista djalonensis* e *Helichrisum aureo-nitens*, respectivamente.

CONCLUSÕES

O extrato de casca do caule de *Croton urucurana* mostrou-se maior atividade antimicrobiana que o extrato de folhas.

A presença de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana em extratos de casca de *C. urucurana* foi comprovada. Os microrganismos mais sensíveis aos extratos vegetais testados foram as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e os fungos *Microsporium gypseum* e *Fonsecaea monophora*.

O extrato bruto de casca do caule mostrou-se mais ativo que as frações, devido a um provável efeito sinérgico entre os princípios ativos produzidos pela planta.

Microrganismos endofíticos de *Croton urucurana* com capacidade de produzir diferentes graus de inibição em bactérias e nos fungos patogênicos *Fonsecaea monophora* e *Guignardia citricarpa* foram isolados.

O meio de cultivo e o modo de extração para produção de metabólitos secundários influenciam na obtenção de compostos bioativos.

Os extratos bioativos da planta e dos fungos endofíticos contêm compostos pertencentes a vários grupos de metabólitos secundários como polifenóis, alcaloides, terpenos e cumarinas e ou antraquinonas.

Futuros trabalhos devem ser realizados para melhor caracterização química dos compostos ativos, como também a otimização das condições de cultivo para a produção de compostos bioativos.

Os compostos bioativos produzidos pelos fungos endofíticos possuem um importante potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS

- ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Fungal biotechnology. **International Microbiology**, v. 6, n. 3, p.191-199, 2003.
- AGARWAL, S.K.; SINGH, S.S.; VERMA, S.; KUMAR, S. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 2, p.43-46, 2000.
- AGRIOS, G. H. **Plant pathology**. Academy Press, London, 1997
- AHIMSA-MULLER, M. A.; MARKERT, A.; HELLWIG. Clavicipitaceous fungi associated with ergoline alkaloids containing Convolvulaceae. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. , p. 1955-1960, 2007.
- AKIYAMA, H.; KAZUYASU, F.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.48, p.487-491, 2001.
- ALY, A.; EDRADA-EBEL, R.; INDRIANI, I.; WRAY, V.; MULLER, W.; TOTZKE, F.; ZIRRGIEBEL, U.; SCHACHTELE, C.; KUBBUTAT, M.; LIN, W. H.; PROKSCH, P.; EBEL, R. Cytotoxic metabolites from Fungal Endophyte *Alternaria* sp. and Their Subsequent Detection in Its Host Plant *Polygonum senegalense*. **Journal of Natural Products**, v.71, n.6, p.972-980, 2008
- ALONSO, J., Curso de Fitomedicina a Distancia. Asociación Argentina de Fitomedicina, 2008.
- ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos e Nutraceúticos**. Editora Corpus, Rosario-Argentina, 2007
- ALVES, E.O.; MOTA, J. H.; SOARES, T. S.; VIEIRA M. C. Crescimento e distribuição espacial de *Croton urucurana* Baill em Dourados. **Revista Caatinga**, v.21, n. 1 p.83-88, 2008.
- AMOROS, M.; FAUCONNIER, B.; GIRRE, R.L. Effect of saponins from *Anagallis arvensis* on experimental herpes simplex keratitis in rabbits. **Planta Medica**, v. 54, n.2, p.128-131, 1988.
- ANGELL, S.; BENCH, B. J.; WILLIAMS, H.; WATANABE, C.H.M. Pyocyanin isolated from a Marina Microbial Population: Synergistic Production between two distinct bacterial species and modes of action. **Chemistry & Biology**, v.13, n.1, p.1349-1359, 2006.
- ANTONIO, F. I. **Aspectos macroscópicos e microscópicos da reparação de feridas cutâneas de camundongos (Swiss-Vallée) tratadas com o creme de *Hyptis suaveolens* e *Croton urucurana***. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias- Clínica e Cirurgia), Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

ARAUJO, P.; GONZÁLEZ, Y. DEGEN, R. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas empleadas en la medicina tradicional. **Revista Rojasiana**, v.8, n.1, 2008.

ARAÚJO, W. L., LIMA, A. O. S., AZEVEDO, J. L., KUKLINSKY, S. LACAVA, P. T. **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Departamento de Genética. Escola superior de Agricultura "Luis Queiroz" Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ARENAS, R. **Micología Médica Ilustrada**. Segunda edição Mc Graw Hill, 2003.

ATA-UR, R.; CHOUDHARY. Diterpenoid and steroidal alkaloids. **Natural products report**, v.12, n. 4 p.361-379, 1995.

AVATO, P.; BUCCI, R.; TAVA, A.; VITALI, C.; ROSATO, A.; BIALY, Z.; JURZYSTA, M. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: structure activity relationship. **Phytotherapy research**, v.20, n.6, p.454-457, 2006.

AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In GANGULLI, B.N; DESHMUKH, S.K. (Ed). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton CRC Press, p.189-207, 2007.

AZEVEDO, J.L.; JUNIOR, W.M.; PEREIRA, J.O. ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Environmental Biotechnology**, v.3, n.1, p.40-64, 2000.

BACON, C.W.; WHITE, J.F. Stains, media and procedures for analyzing endophytes, p.47-56. In BACON, C.W. AND WHITE, J.F (eds.). **Biotechnology of endophytic fungi grasses**. CRC Press, Boca Raton, 1994.

BAE, E.; HAN, M.J.; LEE, M.; KIM, D. In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.23, n.9, p.1122-1124, 2000.

BAMFORD, P.C.; NORRIS, G.L.F.; WARD, G. Flavipin production by *Epicoccum* spp. **Transactions of the British Mycological Society**, v.44, n.3, p. 354-356, 1961.

BARBOSA, M.A.G.; REHN, K.G. MENEZEZ, M.; MARIANO, R.L.R. Antagonism of *Trichoderma* species on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.98-104, 2001.

BASUALDO, I., SORIA, N., ORTIZ, M. e R. DEGEN. Plantas medicinales comercializadas en los mercados de Asunción y Gran Asunción. **Rojasiana**, Paraguay, v. 6, n.1, p. 95-114.2003.

BAUTE, M.A.; DEFFIEUX, G.; BAUTE, R.; NEVEU, A. New antibiotics from fungus *Epicoccum nigrum*. **The Journal of Antibiotics**, v.31, n.11, p.1099-1101, 1978.

BEGONA, M., RISCO, E., VILA R., IGLESIAS, J., CANIGUERAL S. Characterization of a fuconarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exudates of *Croton urucurana*. A. **Journal of Natural Products**, v. 65, p.1143-1146, 2002.

BENAVENTE, C.; SANZ, M.; LUGO, M. Micofilas, Endófitos fúngicos y alcaloides en poblaciones de *Melica stukertii* (Poaceae) del centro de Argentina. **Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica**, v.43, p.189-195, 2008.

BENEDEK, T. Crystal formation in cultures of fungi: Dermatophytes and other Hyphomycetes. **Mycopathologia**, v. 14, n. 4, p. 277-283, 1961.

BENEDEK, T. Crystal formation in cultures of fungi II. **Mycopathologia**, v. 18, n. 4, p. 264-266, 1962.

BERDY, J. Bioactive Microbial Metabolites. **The Journal of antibiotics**, v.58, n.1, p.1-26, 2005.

BERNARDI, L. Contribucìon a la Dendrologia Paraguaya. Editions des Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville Geneve. **Boissiera** v.37, 1984.

BETTUCCI, L.; SARAVAY, M. Endophytic fungi in *Eucalyptus globulus*: a preliminary study. **Mycological Research**, v.97, n.6, p.679-682, 1993.

BILLS, G.; PELAEZ, F. Endophytic isolates of *Creosphaeria sassafras*. **Micotaxon**, 57, 471-477, 1996.

BINUTU, O.A.; ADESOGAN, K.E.; OKOGUN, J.I. Antibacterial and antifungal activity compounds from *Kigelia pinnata*. **Planta Medica**, v.62, p.352-353, 1996.

BLEOJU, M.M.; GONZALEZ SANJOSE, M.L. Study about the stability and some technological properties of the pigments synthesized by *Epicoccum nigrum*. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.1, 2007.

BODE, H. No need to be pure: Mix de Cultures. **Chemistry & Biology**, v.13, n.1, p1245-1246, 2006.

BODE, H.; BETHE, B.; HOFES, R.; ZEECK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology**, v.3 n. 7, 619-627, 2002.

BOHLMANN, F.; ZIESCHE, J. New Germacren- Derivate from *Senecio*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 664-665, 1979.

BORGES, W.S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de bio transformações**. 350f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BRANDELLI, A.; BIZANI, D.; MARTINELLI, M.; STEFANI, V.; GERBASSE, A. Antimicrobial activity of 1,4 Naphthoquinones by metal complexation. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, n.2, p.247-252, 2004.

BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências Farmacêuticas. Contribuição ao desenvolvimento de Novos fármacos e Medicamento**. Primeira edição. Editora Univali, Santa Catarina, 2003.

BROWN, J.; FREEMAN. Combining quinupristin/dalfopristin with other agents for resistant infections. **The Annals of Pharmacotherapy**, v.38, n.4, p.677-685, 2004.

BROWN, A.E.; FINLAY, R.; WARD, J.S. Antifungal compounds produced by *Epicoccum purpurascens* against soil-borne plant pathogenic fungi. **Soil biology&Chemistry**, v.19, n.6, p.657-664, 1987.

BULGHERONI, E.; CITTERIO, P.; CROCE, F.; CICERO, L.; VIGANO, O.; SOSTER, F.; CHOU, T.C.; GALLI, M.; RUSCONI, S. Analysis of protease inhibitor combinations in vitro: activity of lopinavir, amprenavir, and tipranavir against HIV type 1 wild type and drug resistant isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53 p.464-468, 2004.

BURGESS, J.G.; JORDAN, E. M.; BREGU, M.; MEARNS-SRAGG, A.; BOYD, K.G. Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. **Journal of Biotechnology**, v.7, p.27-32, 1999.

BRAUN, G.H. **Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Papulospora immersa* para a produção de substâncias bioativas.**60.f Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 2009.

BRUNETON, J. **Farmacognosia. Fitoquímica de Plantas Medicinales.** 2º edição. Editora Acribia-2001.

BUSH, K. Why it is important to continue Antibacterial Drug Discovery?. **ASM News**, v.70, n.6, 2004.

CAFEU, M.C.; SILVA, G.H.; TELES, H.L.; BOLZANI, V.S.; ARAUJO, A. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp.; um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii*(Rubiaceae). **Química Nova**, v.28, n.6, p.991-995, 2005.

CAMILLO, A.S.C. **Otimização das condições de cultivo de *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* para a produção, isolamento e identificação de metabolitos com atividade antimicrobiana.** Dissertação.126 f. (Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Produtos Naturais e Sintéticos) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

CAMPELO, P. M. S. Medicinal plants and its extracts: the necessity of continuous studies. **Estudos de Biologia**, Brasil, v.28 n.62, 2006.

CANNON, P.; SIMMONS, C. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v.94, n.2, p.210-220, 2002.

CARLILE, M.; WATKINSON, S.; GOODAY, G. **The Fungi**, 2.ed. Hungary, Elsevier, 2001.

CARROL, G.C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. and VAN DEN HEUVAL (eds.) **Microbiology of the Phyllosphere**, Cambridge University Press, Cambridge, 392 p, 1986.

CASADY, J. M.; CHAN, K.K.; FLOSS, H.; LEISTNER, E. Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** v. 52, p.1-26, 2004.

CECHINEL FILHO, V., YUNES, R. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos de modificação estrutural para otimização da atividade. **Quimica Nova**, v.21, n.1 p. 96-105, 1998.

CHANDRA PAUL, N.; KI KIM, W.; KYOON WOO, S.; SOO PARK, M.; HUN YU, S. Fungal endophytes in roots of *Aralia* species and Their Antifungal Activity. **The Plant Pathology Journal** v.24, n.4, p.287-294, 2007.

CHUNG, K.; WONG, T.Y.; WEI, C.; HUANG, Y.; LIN, Y. Tannins and Human Health: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.38, n.6, 1998

CORDELL, G. A. Biodiversity and drug Discovery: a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, v.55 n. 6, p.463-480, 2000.

CORTEZ, D.A.G.; CORTEZ, L.E.R.; NAKAMURA, T.U.; NAKAMURA, C.V. Atividade antibacteriana de extratos do caule de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). **Acta Scientiarum**, v.20, n.2, p.243-245, 1998.

COSTA, E.; TEIXEIRA, S.; MARQUES, F.; DUARTE, M.C.T.; DELARMELINA, C.; PINHEIRO, M.L.B.; TRIGO, J.R., SALES MAIA, B.H.L.N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Gutteropsis* species. **Phytochemistry**, v.69, p.1895-1899, 2008.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**, volumes I, II y III. 3^o edição, 2005.

COWAN, M., 1999. Plant products as Antimicrobial Agents. **Clin. Microbiol. Rev.** 12, 564-582.

CARUZO, M.B.R.; CORDEIRO, I. Sinopse da tribu Crotonae Dumort (Euphorbiaceae), no estado de São Paulo, Brasil. **Hoehnea**, v.34, n.4, p.571, 585, 2007.

CRAIGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural products**, v.60, p.52-60, 1997.

CSEKE, L.; KIRAKOSIAN, A.; KAUFMAN, P.; WARBER, S.; DUKE, J.; BRIELMANN, H.L. **Natural products from plants**. Second edition. CRS Press, 2006.

DE BRUYNE T., PIETERS, L., 1999. Biological evaluation of proanthocyanidins and related polyphenols. **J. Nat. Prod.** 62, 954-958.

DECOSTERD, L.A.; PARSONS, I.C.; GUSTAFSON, K.R.; CARDELINA, J.H.; MCMAHON, J.B.; CRAGG, G.M.; MURATA, Y.; PANNELL, L.K.; STEINER, J.R.; CLARDY, J.; BOYD, M.R. Structure, absolute stereochemistry and synthesis of conocurvone, a potent, novel, HIV-inhibitory naphthoquinone trimer from a *Conospermum* sp. **Journal of American Chemistry Society**, v.115, p.6673-6679, 1993

DELAQUIS, P.J.; STANICH, K.; GIRALD, B. MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and Eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p.101-109.

DELUCCA, A.J.; BLAND, J.M.; BOUE, S.; VIGO, C.B.; CLEVELAND, T.; WAISH, T.J. Synergism of CAY-1 with amphotericin B and itraconazole. **Chemotherapy**, v.52, n.6, p.285-287, 2006.

DEMAIN, A. From natural products discovery to commercialization: a success history. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.486-495, 2006.

DEMAIN, A. Idiolites from microorganisms: a brilliant past, a bright future. In 2000 Years of Natural Products Research, Past, Present and Future. **Proceedings of the congress held July 26030, 1999 Amsterdam, The Netherlands** Edited by Luijendijk, T.

DEMAIN, A. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v.1, p. 259-264, 1998.

DETOMMASI, N.; CONTI, C.; STEIN, M.L.; PIZZA, C. Structure and in vitro antiviral activity of triterpenoid saponins from *Calendula arvensis*. **Planta Medica**, v.57, p.250-253, 1991.

DIAS, J.F.G.; VIRTUOSO, S.; DAVET, A.; CUNICO, M.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.; AUER, C.; GRIGORETTI JUNIOR, A.; OLIVEIRA, A.; FERRONATO, M. Atividade antimicrobiana e antifúngica de extratos etanólicos de *Aster lanceolatus* Willd.; Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.1, p.83-87, 2006.

DI STASI, Luis Claudio; HIRUMA LIMA, Clelia Akiko, 2003. **Plantas medicinais na Amazonia e na Mata Atlantica**. Editora UNESP.

DIXON, R. A.; DEY, P.M.; LAMB, C.J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advances in Enzymology and related areas of Molecular Biology**, v.55, p.1-69, 1983.

DJIPA, C.D.; DELMÉE, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.307-313, 2000.

DONADIO, S.; MONCIARDINI, P.; ALDUINA, R.; MAZZA, P.; CHIOCCHINI, C.; CAVALETTI, L.; SOSIO, M.; PUGLIA, A. Microbial biotechnologies for the Discovery of novel bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, 99, p.187-198, 2002

DONG, H.D.; ZHONG, J.J. Significant improvement of taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* by combining elicitation with sucrose feed. **Biochemical Engineering**, v.8, n.2, 2001.

DOS SANTOS, R. M.; RODRIGUEZ, E. Further meroterpenes produced by *Penicillium* sp., an Endophyte obtained from *Melia azedarach*. **Z Naturforsch**, 58c, 663-669 2003.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K.L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds, **Phytopatology**, v.62, n.7, p.42-44, 1971.

ESMERALDINO, L. E., SOUZA, A. M., SAMPAIO, S. V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jacaraca*, using techniques to quantify hemorrhagic activity. **Phytomedicine** v.12, p570-576 , 2005.

EVANS, W.C. **Trease and Evan's pharmacognosy**. 14.ed. London, WB Saunder, 1996.

EYBERGER, A. L.; DONDAPATI, R.; PORTER, J.R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 1121-1124, 2006.

EZRA, David; Hess, W. M.; STROBEL, GARY A. New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing-fungus. **Microbiology** v.150, p. 4024-4031, 2004.

FAVARO, L.C.L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. em cana de açúcar** (*Saccharum officinarum*, L.) Tese. 291 f. (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2009.

FERRARO, M. J.; WIKLER, M.; CRAIG, W.; DUDLEY, M.; ELIOPOULOS, G.; HECHT, D.; HINDLER, J.; RELLER, L. B.; SHELDON, A.T.; SWENSON, J.; TENOVER, F.C.; TESTA, R.T.; WEINSTEIN, M.P. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão; **NCCLS Norma aprovada-Oitava edição**, v.23, n.1, 2003.

FIGUEIREDO, J. G. **Bioprospecção, Caracterização Morfológica e Molecular de Endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com Ênfase em *Pestalotiopsis* spp.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

FILTENBORG, O.; FRISVALD, J.; SVENDSEN, J. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n.2, 1983.

FIRN, R.D.; JONES, C.G. The evolution of secondary metabolism, a unifying model. **Molecular Microbiology**, v.37, p.989-994, 2000.

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v.88, p.587-605, 2002.

FRISVALD, J.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolites profiling in the chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research** 231-240, 2008.

FONTENELLE, R. O. S., MORAIS, S. M., BRITO, E. H. S, BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A., NASCIMENTO, M. R. Antifungal activity of essential oils of Croton species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology** v.104, 1383-1390, 2008.

FUMAGALI, E.; GONCALVES, R.A.C.; MACHADO, M.F.P.S.; VIDOTI, G.J.; OLIVEIRA, A.J.B. Producao de metabolites secundarios em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.4, p.627-641, 2008.

FURTADO, N. A.; SAID, S.; ITO, I.; BASTOS, J. The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. **Microbiological Research**, v.157, p.207-211, 2002.

GALINDO- CUSPINERA, V.; RANKIN, S.A. Bioautography and Chemical Characterization of Antimicrobial compounds in Commercial Water-Soluble Anatto Extracts. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, n.7, p.2524-2529, 2005.

GLOER, J. B. (1997) Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. In *The Mycota Vol IV. Environmental and Microbial Relationships* (D.T. Wicklow e B.E. Soderstron eds) 249-268. Springer-Verlag, New York.

GLOER, J. B. The chemistry of fungal antagonism and defense. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, p. 1265-1274, 1995.

GOMES, R. R. ***Phomopsis* spp. Endofitos de plantas medicinais: diversidade genética e antagonismo ao fungo *Guignardia citricarpa***. Dissertacao. 149 f. (Programa de Pos- graduação em Genetica) – Setor de Ciencias Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

GONZALEZ TORRES, **Catálogo de plantas medicinales (y alimenticias) usadas en Paraguay**. Editora Modelo, 1992.

GRUJIC-VASIC, J.; PILIPOVIC, S.; BOSNIC, T.; REDZIC, S. Antimicrobial activity of different extracts from Rhizome and Root of *Potentilla erecta* L. Raesuchel and *Potentilla alba* L. Rosaceae. **Acta medica academica**, v. 35, n.1, p.9-14, 2006.

GU, W. Bioactive metabolites from *Alternaria brassicicola* ML-P08, an endophytic fungus residing in *Malus halliana*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, n.9, p.1677-1683, 2009.

GUERRA ORDONEZ, M.; RODRIGUEZ JORGE, M.; GARCIA SIMÓN, G.; LLERENA RANGEL, C. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.9, n.2, 2004.

GUERRA ORDONEZ, M.; VEGA MONTALVO, R.; RIVERO MARTINEZ, R.; MENENDEZ CASTILLO, R.; GUTIERREZ PULIDO, A.; GUERRA SARDINAS, I. Actividad antimicrobiana y toxicidad de um extracto acuoso de *Boerhaavia erecta* L. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.9, n.1, 2004.

GULERIA, S.; KUMAR, A. Antifungal activity of some Himalayan medicinal plants using direct bioautography. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v.5, p.95-98, 2006.

GUNATILAKA, A.A. L. Natural products form Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Ocurrance. **Journal of Natural products**, v.69, n.3, p.509-526, 2006.

GUPTA, D., BLEALEY B., GUPTA, R.,. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**. V.115, p.361-38,. 2008.

GUPTA, P.C.; DUTTA, B.; PANT, D.; JOSHI, P.; LOHAR, D.R. In vitro antibacterial activity of *Artemisia annua* Linn. Growing in India. **International Journal of Green Pharmacy**, v.3, n.3, p.255-258, 2009.

GURGEL, L. A., SIDRIM, J.J.C., MARTINS, D., CECHINEL FILHO., RAO, V. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology** v. 97, 409-412, 2005.

GURGEL, Luilma, TABAJARA, D.; ORLANDI, P., SATYANARAYANA, R., 2002 Estudo da atividade antidiarreica e antisecretoria intestinal do latex de *Croton urucurana* Baill. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 12, 39-42.

HADECEK, FRANZ e GREGER HARALD;2000. Testing of Antifungal Natural Product: Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice. **Phytochemical Analysis**, 11,137-147.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.853-860, 2003.

HARBONE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**, 4th edition. London: Academic Press.

HASLAM, Edwim, 1996. Natural Polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of Action. **Journal of Natural Products**, 59, 205-215.

HAWKSWORTH, D. L.The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species stimated revisted, **Mycological Research** v.105, p.1422-1431,2001.

HAWKSWORTH, D. L.; ROSSMAN, A.Y. Where are all the undescribed fungi? **Phytopathology**, v.87, p.888-891, 1997.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research** v.95 p. 641-655, 1991.

HAWKSWORTH, D. L. Fungal diversity and its implications for genetic resource collection. **Studies in Mycology** v.50 p.9-18, 2004.

HE, H.; YANG, H.Y.; BIGELIS, R.; SOLUM, E.; GREENSTEIN, M.; CARTER, G. Pyrrocidines A and B, new antibiotics produced by a filamentous fungi. **Tetrahedron Letters**, v.43, n.9, p.1633-1636, 2002.

HELLWIG, V.; GROTHE, T.; MAYER-BARTSCHMID, A.; ENDERMANN, R.; GESCHKE, F.; HENKEL, T.; STADLER, M. Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. **Journal of antibiotics**, v.55, n.10, p.881-892m 2002.

HENEINE, I. F. **Biofisica básica**, Atheneo Sao Paulo, 2000.

HERNANDEZ DIAZ, L.; RODRIGUEZ JORGE, M. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.2001, n.2, 2001.

HORMAZABAL, E.; PIONTELLI, E. Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p. 813-819, 2009.

HUANG, H.C.; BREMER, E.; HYNES, R.K.; ERICKSON, R.S. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v.18, p.270-276, 2000.

HUDSON, J.B. **Antiviral compounds from plants**. Boca Raton: CRC, 1990.

ICHICAWA, T.; DATE, M.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin-producing Strain by the Agar Piece Method and the Prototroph Method. **Folia Microbiologica**, v.16, n.3, p.218-224, 1971.

IGARASHI, Y.; IIDA T.; SASAKI, T.; SAITO, N.; YOSHIDA, R.; FURUMAI, T. Isolation of Actinomycetes from Live Plants and Evaluation of Antiphytopathogenic Activity of Their Metabolites. **Actinomycetologica**, v.16, n.1 p.9-13, 2002.

IKAWA, M.; MCGRATTAM, C.J.; BURGE, W.R.; IANNITELLI, R.C. Epirocin, a polyene antibiotic from the mold *Epicoccum nigrum*. **Journal of antibiotics**, v.31, n.2, p.159-161, 1978.

JENNESSEN, J.; NIELSEN, K.; HOUBRAKEN, J.; LYHNE, E.; SCHNURER, J.; FRISVALD, J.; SAMSON, R. Secondary metabolite and mycotoxin production by the *Rhizopus microsporus* group. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.53, n.5, p.1833-1840, 2005.

JENNEWEIN, S.; RITHNER, C.; WILLIAMS, R.; CROETAU, R. Taxol biosynthesis: Taxane 13 α -hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase. **PNAS**, vol.98 n.24, 135950-13600, 2001.

KAROU, D.; SAVADOGO, A.; CANINI, A.; YAMEOGO, S.; MONTESANO, C.; SIMPORE, J.; COLIZZI, V.; TRAORE, A. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. **African Journal of biotechnology**, v.5, n.2, p.195-200, 2006.

KASHIWADA, Y.; WANG, H.; NAGAO, T. KITANAKA, S.; YASUDA, I.; FUJIOKA, T.; YAMAGISHI, T.; CONSENTINO, L.M. KOZUKA, M.; OKABE, H.; IKESHIRO, Y.; HU, C.; YEH, E. LEE, K. Anti-aids agents, 30 Anti HIV activity of oleanic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. **Journal of Natural products**, v.61, n. 9, p.1090-1095, 1998.

KIMURA, Y.; KOZAWA, M.; BABA, K.; HATA. New Constituents of Roots of *Polygonum cuspidatum*. **Planta Medica**, v. 48, n.7, p.164-168, 1983.

KJER, J.; WRAY, V.; EDRADA-EBEL, R.; EBEL, R.; PRETSCH, A.; LIN, W.; PROKSCH, P. Xanalteric acids I and II and related Phenolic Compounds from an Endophytic *Alternaria* sp. Isolated from the mangrove Plant *Sonneratia alba*. **Journal of Natural products**, v.30, n.20,2009.

KLINGSTRÖM, A. E.; JOHANSSON, S. M. Antagonism of *Scytalidium* isolates against Decay Fungi. *Phytopathology*, v. 63, p. 473-479, 1972.

KLIGER, B.; MAIZES, V.; SCHACHTER, S.; PARK, C.M GAUDET, T.; BENN, R.; LEE, R.; REMEN, R.N. Core competencies in integrative medicines for medical school curricula: a proposal. *Acad. Med*, v.79, p.521-531, 2004.

KRISHNAN, K.; GOPIESH, V.; HAMEED, S. Antiviral activity of Dasyscyphin C. extracted from *Eclipta prostrata* Against Fish Nodavirus. *Journal of Antiviral e Antiretroviral*, v.2, n.1, p.29-32, 2010.

KUSARI, S.; LAMSHOFT, M.; ZUHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, v. 71., n. 2008.

KUTCHAN, T. Alkaloids biosynthesis- the basis for metabolic engineering of medicinal plants. **Plant Cell**, v.7, p.1059-1070, 1995.

LARENA, I.; TORRES, R.; DECAL, A.; LINAN, M.; MELGAREJO, P.; DOMENICHINI, P.; BELLINI, A.; MANDRIN, J.F.; LICHOU, J.; OCHOA DE ERIBE, X.; USALL, J. Biological control of postharvest brown rot (*Monilia* spp.) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*. **Biological control**, v.32, p.305-310, 2005.

LARENA, I.; DECAL, A.; MELGAREJO, P. Solid substrate production of *Epicoccum nigrum* conidia for biological control of brown rot on stone fruits. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.2, p.161-167, 2004.

LARSEN, T.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, K.; HANSEN, M.; FRISVALD, J. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. **Natural Product Report**, 22, p. 675-695, 2005.

LARONE, D. Medically important Fungi, A guide to Identification, **American Society of Microbiology**, 1995.

LAUREN, D.; ASHLEY, A.; BLACKWELL, B.; GREENHALGH, R.; MILLER, D. NEISH, G. Trichothecenes produced by *Fusarium crookwellense* DAOM 193611. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.35, n.6 p. 884-889, 1987.

LEDERMAN, M.; CONNICK, E.; LANDAY, A.; KURITZKES, D.R.; SPRITZLER, J.; CLAIR, M. S.; KOTZIN, B.L.; FOX, L.; CHIOZZI, M.H.; LEONARD, J.M.; ROUSEEAU, F.; WADE, M.; ROE, J.D; MARTINEZ, A.; KESSLER, H. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. **Journal of Infection Disease**, v. 178, p.70-78, 1998.

LEE, N.H.; GLOER, J.B.; WICKLOW. Isolation of Chromanone and Isobenzofuran Derivatites from a Fungicolous Isolate of *Epicoccum purpurascens*. **Bulletin of Korean Chemistry Society**, v.28, n.5, p.877-879, 2007.

LEE, C.W.T.; SHULER, M.L. The effect of inoculums density and conditioned medium on the production of ajmalicine and catharantine form immobilized *Catharanthus roseus* cells. **Biotechnology Engeenering**, v.67, n.1, p.61-71, 2000.

LEIVA, S.; YANEZ, M.; ZAROR, L.; RODRIGUEZ, H.; GARCIA-QUINTANA, H. Actividad antimicrobiana de actinomicetes aislados desde ambientes acuaticos del sur de Chile. **Revista Médica Chilena**, v.132, p.151-159, 2004.

LIMA, M.R.F., AZEVEDO XIMENES, E.C.P.; LUNA, J.S.; GOULART SANT'ANA, A.E. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, n.3, p.300-306, 2006.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; CASTAGNA DE VARGAS, A.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoolico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* Skells). **Ciencia Rural**, Brasil, v.35, n.2 p.371-376, 2005.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação em cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2002.

LU, H., ZOU, J. C., MENG, J., TAN, X., 2000. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp. an endophytic fungus in *Artemisia anua*. **Plant Science** v.151, 67-73.

MADRIGAL, C.; TADEO, J.L.; MELGAREJO, P. Relation between flavipin production by *Epicoccum nigrum* and antagonism against *Monilinia laxa*. **Mycological research**, v.95, n.12, p.1375-1981, 1991.

MALLEA, M.; PESANDO, D.; BERNARD, P.; KHOULALENE, B. Comparison between antifungal and antibacterial activities of several strains of *Epicoccum purpurascens* from Mediterranean area. **Mycopathologia**, v.115, p.83-88, 1991.

MANDAL P.; BABU, S.; MANDAL N. C. Antimicrobial activity of saponins from *Acacia auriculiformis*. **Fitoterapia**, v.76, n.5, p.462-465, 2005.

MARASCIULO, C.; CAVINATTO, S.; STUKER, C.; MALDANER, G.; DALCOL, I.; MOREL, A. Isolamento, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana de um flavonóide glicosilado de *Pavonia distinguenda* St. Hill eNaud. 29^a **Reunião Anual de Química**, 2006.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p.369-409, 1993.

MELO, F.M.P. **Atividade anfifúngica de metabolitos secundários produzidos pelo endófito da mandioca *Bacillus pumilis* MAIIM4a.84f.**Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de concentração Microbiologia Agrícola) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.

MEZENECV, R.; MOJZIS, J.; PILATOVA, M.; KUTSCHY, P. Antiproliferative and câncer chemopreventive activity of phytoalexins: focus on índole phytoalexins from crucifers. **Neoplasma**, v.50, n.4, p.239-245, 2003.

MENDOZA, L.; WILKENS, M.; URZUA, A. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from some Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, 85-88.

MISAGUI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v.80, p.8080-811.

MIN, B. R.; PINCHAK, W.E.; MERKEL, R.; WAKER, S.; TOMITA, G.; ANDERSON, R.C. Comparative antimicrobial activity of tannins extracts from perennial plants on mastitis pathogens. **Scientific Research and Essay**, v.3, n.2, p.6673, 2008.

MISSAU, F.C.; GILIOLI, A.; JOHANN, S.; RESENDE, M.A.; PIZZOLATTI, M.G. Atividade antifúngica dos extratos e compostos isolados de *Polygala paniculata*. In 29^a **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006.

MIYAKOSHI, M.; TAMURA, Y.; MASUDA, H.; MIZUTANI, K.; TANAKA, O.; IKEDA, T.; OHTANI, K.; KASAI, R. YAMASAKI, K. Antiyeast steroidal saponins from *Yucca schidigera* (Mohave Yucca), a New anti-Food-Deteriorating Agent. **Journal of Natural products**, v.63, n.3, p.332-338, 2000.

MIZUNO, C. M.; REGALI-SELEGHIM, M.H. Estabelecimento de condições para crescimento de linhagens de fungos isoladas da esponja marinha *Drumacidon reticulata* para a produção de metabolitos secundários. **Jornada de Jovens Pesquisadores da AUGM**, 2007.

MOMESSO, L.S. **Estudo químico-biológico dos fungos endofíticos *Cladosporium sphaerospermum*, *Pestalotiopsis guepinii* e *Chaetomium globosum*.**24f. Tesse (Doutorado em Ciências Farmacéuticas) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

MONAGHAN, R.; POLISHOOK, J.; PECORE, V.; BILLS, M.; NALLIN-OMLSTEAD; STREICHER, L.; Discovery of novel secondary metabolites from fungi it is really a random walk through a random forest? **Canadian Journal of Botany** v. 73 p.925-931, 1995.

MUELLER, G.M.; SCHIMT, J.P. Fungal Biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity conservation**, v.16, p.1-5, 2007.

MUROI, H.; KUBO, I. Combination effects of antibacterial compounds in green tea flavor against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, n.7, p.1102-1105, 1993.

NAKAJARA, K.; KAWABATA, S.; ONO, H.; OGURA, K.; TANAKA, T.; OOSHIMA, T.; HAMADA, S. Inhibitory effect of oolong tea polyphenols on glucosyltransferases of mutans streptococci. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n.4, p.968-973, 1993.

NASCIMENTO, P. RODRIGUES, C. ANTONIOLLI A., SANTOS, P. BARBOZA JUNIOR, A., TRINDADE, R. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.17, n.1, 108-113, 2007.

NAVARRO, V. DELGADO, G. Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p.223-226, 1999.

NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos: Interação com Plantas e Potencial Biotecnológico. **Revista Biotecnologia**, v.5, n.29, 2002.

NIELSEN, K.; LARSEN, T.; FRISVALD, J. Lightweight expanden clay aggregates (LECA), a new up-scaleable matrix for production of microfungus metabolites. **The Journal of antibiotics**, v.57, n.1, p. 29-36, 2004.

NOSTRO, A.; GERMANO, N.P.; D'ANGELO, V.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. **Letters applied Microbiology**, v.30, p. 379-384, 2000.

OLIVEIRA, I.; LIMA, J.; SILVA, R.; MARTINS, D. Triagem da atividade antibacteriana in vitro do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18(4): 587-593 2008.

OLIVEIRA, M.C.; SIMOES, K.; BRAGA, M.R. Substancias antifúngicas constitutivas e induzidas em folhas e suspensões celulares de *Rudgea jasminoides* (Cham) Mull. Arg. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Botanica**, v.32, n.3, p.509-519, 2009.

OLIVEIRA, C., SCHENKEL, E.M GOSMANN, G., PALAZZZO, J. AULER, L., ROS, P. 2007. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Editora UFRGS.

OMULOKOLI, E. KHAN, B.; CHHABRA, S.C. Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.56, p. 133-157.

ONIFADE, A. K. Preliminary studies on the Bioactivity of Secondary metabolites from *Aureobasidium pullulans* and *Emericella rugulosa*. **Research Journal of Microbiology**, v.2 n.2 p.156-162, 2007.

ONOCHA, P.; OKORIE, D.; CONNOLLY, J.; ROYCROFT, D. Monoterpene diol, iridoid glucoside and dibenzo- α -pyrone from *Anthocleista djalonensis*. **Phytochemistry**, v.40, n.4, p. 1183-1189, 1995.

OOSHIMA T., MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATAMI, A.; SOBUE, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SFP rats infected with *Streptococcus mutans*. **Caries Research** v.27, p.124-129, 1993.

OVERY, D. P.; and BLUNT, J. W. Corymbiferan lactones from *Penicillium hordei*: stimulation of novel phenolic metabolites using plant tissue media. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1850-1853, 2004.

OVERY, D. P.; ZIDORN, C. H.; PETERSEN, B. O.; DUUS, J. O.; DALSGAARD, P. W., LARSEN, T. O.; PHIPPS, R. K. Medium dependant production of corymbiferone a novel product from *Penicillium hordei* cultured on plant tissue Agar. **Tetrahedron letters**, v. 46 n.18, 2005.

PACKER, J., LUZ, M. Metodo para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem vegetal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.102-107, 2007.

PAOLI, A. A. S. FREITAS, L.; BARBOSA, J. M. A. Caracterização morfológica dos fruto, sementes, e plântulas de *Croton floribundus* Spreng, e de *Croton urucurana* Baill (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.17, n.1, p.57-68, 1995.

PAPADOPOULOU, K.; MELTON, R.E; LEGGETT, M.; DANIELS, M.J.; OSBOURN. Compromised disease resistance in saponin deficient plants. **PNAS**, v.96, n.22, p.12923-12928, 1999.

PELAEZ, F.; CABELLO, A.; PLATAS, G.; DIEZ, M.; GONZALEZ DEL VAL, A.; BASILIO, A.; MARTAN, I.; VICENTE, F.; BILLS, G.; GIACOBBE, R.; SCHAWRTZ, R.; ONISHI, J.; MEINZ, M.; ABRUZZO, G.; FLATTERY, A.; LI, K.; KURTZ, M. The Discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms. **Systematic and applied Microbiology**, v. 23, n. 3 p 333-343, 2000.

PELAEZ, F.; COLLADO, J.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; DIEZ MATAS, M.T.; GARCIA, J.B.; GONZALEZ DE VAL, A.; GONZALEZ, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNANDEZ, P.; MARTIN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycological Research**, v.102, n.6, p.755-761, 1998.

PERES, M. MONACHE, F., BELLA CRUZ, A., PIZZOLATTI M., YUNES, R.,. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56 p. 223-226., 1997.

PERES, M.; MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M.; SANTOS, A.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J.; YUNES, R. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmaco-chemical Criteria Used in their Isolation. *Phytotherapy Research*, v.12, p.209-211, 1998.

PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliacao da atividade antibacteriana e antifúngica de plantas utilizadas na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p,21-24, 2003.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of arial plant tissues. In FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. (Eds.) **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambrige University Press, p.175-187, 1986.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, London, v.56, n.3, 237-243, 2001.

PIECKOVA, E.; ROEIJMANS, H. Antibiotic secondary metabolites of *Dichotomyces cejpii*. **Mycopathologia**, v.146, p.121-126, 1999.

PILEGGI, S. A. V. **Isolamento e caracterizacao de Microrganismos endofiticos de Maytenus ilicifolia ex Reiss por meio de Marcadores RAPD e seu potencial farmacológico**. 125f. Tese (Programa de Pós-graduação em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PINTO LOGUERCIO. A., BATTISTIN, A., CASTAGNA, A., HENZEL, A., NIURA, M., 2005. Atividade antimicrobiana de extrato hidro-alcólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini*). **Ciencia Rural** v35, 371-376.

PIRES, M.M.Y.; SOUZA, L. A.; TERADA, Y. Biologia Floral de *Croton urucurana* Baill (Euphorbiaceae) ocorrente em vegetação riparia da Ilha Porto Rico, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 26, n.2, p.209-215, 2004.

PORTILLO, A.; VILA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CANIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.93-98, 2001.

PURI, S. C.; VERNA, V.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 1717.1719, 2005.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. Screening antifungal activities of select medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n

RAMOS, H. **Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. para a produção de metabolitos secundários com atividades biológicas**. Dissertação. Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

RADU, SON; YOKE, CHEAK. Preliminary screening of Endophytic Fungi from Medicinal Plants in Malaysia for Antimicrobial and Antitumor Activity. **Malaysian Journal of Medical Sciences**. v. 9, n. 2, p. 23-33, 2002.

RALPHS, M. H.; CREAMER, R. e BAUCOM,. Relationship between the endophyte *Embellisia spp.* And the toxic alkaloid swainsonine in major locoweed species (*Astragalus* and *Oxytropis*). **Journal of Natural Products**, v. 34, n. p.32-38, 2008.

RAMASAMY, K.; LIM, S. M.; BAKAR, H. A.; ISMAIL, N.; ISMAIL, M. S.; ALI, M. F.; WEBER, J.F.F.; COLE, A.L.J. Antimicrobial and Cytotoxic activities of Malaysia Endophytes. *Phytoteraphy research*, Disponivel em: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/122401164/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0> . Acesso em 6 de mar. 2010.

RAMIREZ, L.S.; DIAZ, H.E. Actividad antimicrobiana de extractos y fracciones del Ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). **Scientia et Technica**, v.4, n.33, p.397-400, 2007.

RAVIRAJA, N.S.; MARIA, G.L.; SRIDHAR, K.R. Antimicrobial evaluation of Endophytic Fungi Inhabiting Medicinal Plants of the Western Ghats of India. **Engeneering in Life Science**, v.6, n.5 p.515-520, 2006

REDKO, F., CLAVIN, M., WEBER, D., ANKE, T., MARTINO, V. Search for active metabolites of *Erytrina crista-galli* and its endophyte *Phomopsis sp.* **Molecular Medicinal Chemistry**, v. 10 May- August 24-26, 2006.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1, p.80-84, 2005.

RODRIGUES, K.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology** v.40, n.4, p.262-267, 2000.

ROJAS, J.J.; OCHOA, V.J.; OCAMPO, S.A.; MUNOZ, J. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative medicine**,

ROSA, L.H; MACHADO, K.G.; JACOB, C.C.; CAPELARI, M.; ROSA, C.A.; ZANI, C.L. Screening of Brazilian Basidiomycetes form antimicrobial activity. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.7, p.967-974, 2003.

ROSENTHAL, G. A. e BERENBAUM, M. R. **Herbivores**: Their interactions with Secondary Plant Metabolites, v. 1. The Chemical participants. San Diego: Academic Press, 1991

ROSENTHAL, G. A. e BERENBAUM, M. R. **Herbivores**: Their interactions with Secondary Plant Metabolites, v. 2. Ecological and Evolutionary Processes. San Diego: Academic Press, 1992.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal Endophytes: A continuum of Interactions with Host Plants. **Annual Reviews of Ecology & Sytematics**, v.29, p.319-343, 1998.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and Pharmacology of *Croton* species. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SANTOS, S.F.M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. Tese.148 f. (Programa de Pós- graduação em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

SARKER, S.; LATIF, Z.; GRAY, A. **Natural products isolation**. 2^a edicao, Human Press, 2005.

SARKER, S., LATIF, Z. GRAY A.. **Methods in Biotechnology Natural products isolation**. Humana Press Inc, 1998

SARTORI, M.R.K. **Atividade antimicrobiana de frações de extratos e compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) Asteraceae**. Dissertação. 81 f. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale de Itajaí, Itajaí, 2005

SCALBERT, A.. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991

SCHMOURLO, G.; MENDOCA-FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S., COSTA, S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.563-568, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v.109, p. 661-687, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; ROMMERT, A.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v.106, n.9 996-1004, 2002.

SCHULZ, B.; ROMMERT, A.; DAMMANN, U.; AUST, H.; STRACK, D. (1999) The endophyte host-interaction: a balanced antagonism. **Mycological research**, v.103, p. 1275-1283, 1999

SCHUMACHER, H.; GUNDLACH, H.; FIEDLER, F.; ZENK, M.H. Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in *Eschscholtzia* cell cultures. **Plants Cells Reports**, v.6, n.6, p.410-413, 1987.

SHAFER, H.; WINK, M. Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganism or plants: Progress in alkaloid biosynthesis. **Biotechnology Journal**, v.4, p.1684-1703, 2009.

SHER, A. Antimicrobial activity of Natural products from Medicinal Plants. **Gomal Journal of Medical Sciencies**, v.7, n.1 p.72-78, 2009.

SIEGEL, M.R.; LATCH, G.C.M; JOHNSON, M.C. *Acremonium* fungal endophytes of tall fescue and perennial ryegrass: significance and control. **Plant Disease**, v.69, p.179-183, 1985.

SILVA, M. T.G; SIMAS, S.M.; BATISTA, T.G.F.M.; CARDARELLI, P.; TOMASSINI, T.C.B. Studies on antimicrobial activity in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n.7, p. 779-782, 2005.

SILVESTRINI, A. PASQUA, G.; BOTTA, B.; MONACELLI, B.; VAN DER HEIJDEN, R., VERPOORTE, R. Effect of alkaloid precursor feeding on a *Camptotheca acuminata* cell line. **Plant Physiology Chemistry**, v.40, n.4, p. 749-753, 2002.

SIMIONATTO, E. BONANI, V., FARIAS, A., POPPI, N., RAPOSO, J. STUKER, C., PERUZZO, M. PERES, M., HESS So. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* B. Stem Bark. **Journa of Brazilian. Chemical. Society**. 18 879-885, 2007.

SIMÕES, C.M.; AMOROS, M.; GIRRE, L. Mechanism of antiviral activity of triterpenoid saponins. **Phytotherapy research**, v.13, n.4, p.323, 328, 1999.

SINGH, S.; JAIN, L.; PANDEY, M.B.; SINGH, U.P. PANNEY, V.B. Antifungal activity of the alkaloids from *Eschscholzia californica*. **Folia Microbiologica**, v.54, n.3, p.204-206.

SIQUEIRA, V.M. **Fungos endofíticos de folhas e caule de *Lippia sidoides* Cham. E avaliação da atividade antimicrobiana**. 93 f. Dissertação (Programa de pós-graduação em Biologia de Fungos) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

SOETAN, O.; OYEKUNLE, M.A; AIYELAAGBE, O.; FAFUNSO, M.A. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L. Moench. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.23, p.2405-2407, 2006.

SOUZA, A.; GALETTI, F.; SILVA, C.; BICALHO, B.; PARMA, M.; FONSECA, S.; MARSAIOLI, A.; TRINDADE, A.; FREITAS, R.; BEZERRA, F.; ANDRADE-NETO, M.; OLIVEIRA, M. Antimycobacterial and cytotoxicity of synthetic and natural compounds. **Quimica Nova**, v.30 n.7, p.1563-1566, 2007.

SOUZA, T.M.; SEVERI, J.A. SILVA, V.Y.A.; SANTOS, E.; PIETRO R.C.L.R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmaceuticas Básica e Aplicada**, v.28, n.2 p.221-226, 2007.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELEM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazonia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos congesta* bentham. **Acta Amazonica**, v.34, n.2, p.185-195,2004.

SOUZA W.M.; STINGHEN, A.E.M.; SANTOS, C.A.M. Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. **Fitoterapia**. Short report, v.75, p.750-753, 2004.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, and endophytic fungus of Pacific Yew. **Science** 260, 214-216, 1993.

STODŮLKOVÁ, E.; ŠULC, M.; CÍSAŘOVÁ, I.; NOVÁK, P.; KOLAŘÍK, M.; FLIEGER, M. Production of (+)-Globulol Needle Crystals on the Surface Mycelium of *Quambalaria cyanescens*. **Folia Microbiologica**, v. 53, n. 1, p.15-22, 2008.

STONE, J.K.; POLISHOOK, J.D.; WHITE JR, Endophytic fungi. In MUELLER, G.; BILLS, G.F.; FOSTER, M.S. eds. Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods, Elsevier, 2004.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO,U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural products**, v67, p.257-268, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n. 4, p. 491-502, 2003.

STROBEL, G.; STIERLE, A.; VAN KUIJIK, F. Factors influencing the in vitro production of radiolabeled taxol by Pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Plant Science**, v. 260, 214-216, 1993.

STROBEL, G., DAISY, B., 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes an their natural products. **Microbiology and molecular Biology reviews** 67, 491-502.

STROBEL, G. Rainforest endophytes and Bioactive Products. **Critical Reviews of Biotechnology**, v.22, n.4, p.315.333, 2002.

SVETAZ, L.; ZULJAN, F.; DERITA, M.; PETENATTI, E.; TAMAYO, G.; CACERES, A.; CECHINEL FILHO, V.; GIMENEZ, A.; ROBERTO, P.; ZACCHINO, S.; GUPTA, M. A. Value of the Ethnomedical information of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American Countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p.137, 158, 2010.

TAN, R e ZOU W. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural products reports**, v18, p448-459,2001.

TANAKA, J.C.A; SILVA C.C; OLIVEIRA, A.J.B; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P. Antibacterial activity of índole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. Braziliam **Journal of Medical and Biological Research.**, v.39, p.387-391, 2006.

TAPIA, CECILIA, 2009. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. **Revista Chilena de Infectología**, 26 (2):144-150.

TAPIERO, A.L. Importancia de los metabolitos secundários de plantas y hongos en las enfermedades de plantas. **Revista Corpoica**, v.3, n.2, p.24-30, 2001.

TONIAL, F. **Atividade antimicrobiana de endófitos e extratos foliares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira)**. 141 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

TREASE, G; Evans,W. **Tratado de Farmaconogia**. 12^o edição Editora Interamericana,1986.

TSUCHIYA, H.; SATO, M.; MIYAZAKI, T.; TANIGAKI, S.; OHYAMA, M.; TANAKA, T.; IINUMA, M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.50, n.1, p.27-34, 1996

THOISON, O.; T. SEVENET, NIEMEYER, H.M.; RUSELL, G.B. Insect antifeedant compounds from *Nothofagus dombeyi* and *N. pumilio*. **Phytochemistry**, v.65, p.2173-2176, 2004.

THOMPSON, J.; GEORGE, E.O.; POQUETTE, C.A; CHESHIRE, J.; RICHMOND, L.B.; GRAFF, S.S.; MA, M.; STEWART, C.F.; HOUGHTON, P,J. Synergy of topotecan in combination with vincristine for treatment of pediatric solid tumor xenografts. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p.3617-3631, 1999.

VALGAS, C., MACHADO DE SOUZA, S., SMANIA, E., SMANIA, A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.38 p. 369-380, 2007.

VANACLOCHA, B. CANIGUERAL, S. **Fitoterapia**. Vademecum de Prescripción. 4^o edição. Editora Masson-2003.

VANETTEN, H.D.; MANSFIELD, J.W.; BAILEY, J.A.; FARMER, E.E. Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus "phytoprecipitins. **The Plant Cell**, v.6, n.9, p.1191-1192, 1994.

VICENTE, M. F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; PELAEZ, F. Microbial natural products as source of antifungals. **Clinical Microbiology and Infection** v.9, p.15-32, 2003.

VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A.M. In vitro evidence of phyto-synergy for plant part combinations of *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae) used in African traditional healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p.700-704, 2008.

VARDAR-UNLU, G.; CANDAN, F.; SOKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, M.; DONMEZ, E.; TEPE, B. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oils and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.1, n.51, p.63-67, 2003.

VOLPATO, A.M.M; RIOS, E.M.; MIGUEL, M.D.; SANDER, P.C.; MIGUEL, O.G. Investigação da atividade antibacteriana de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista Visao Academica**, v.2, n.2, p.7-10, 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. A Thin Layer Chromatography Atlas. Second Edition, Springer, Germany, 1996.

WANG, Z. Y.; ZHONG, J.J. Combination of conditioned medium and elicitation enhances taxoid production in bioreactor cultures of *Taxus chinensis* cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, n.2, p.93-97, 2002.

WANGUN, H. V.; ISHIDA, K.; HERTWECK, C. Epicoccalone, a Coumarin-Type Chymotrypsin Inhibitor, and Isobenzofuran Congeners from an Epicoccum sp. Associated with a Tree Fungus. **European Journal of Organic Chemistry**, n.22, p. 3781-3784, 2008.

WATANABE, T. **Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi**. Second Edition, USA, CRC Press, 2002.

WICKLOW, D.; ROTH, S.; DEYRUP, S.T.; GLOER, J.B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, v.109, n. 5, p.610-618, 2005.

WIJNSMA, R.; VAN WEERDEN, N.I., VERPOORTE, R.; HARKES, P.A.; LUGT, C.B.; SCHEFFER, J.J.; SVENDSEN, A.B. Anthraquinones in Cinchona ledgeriana Bark Infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Planta Medica**, v.52, n.3, p.211-212, 1986.

WILLIAMSOM, E.M. Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, v.8, n.5, p.401-409.

WILD, D.; TOTH, G.; HUMPF, H. New *Monascus* metabolite isolated from Red Yeast Rice (Angkak Red Koji). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.14, p. 3999-4002, 2002.

WINK, M. Plant Secondary Metabolism: Diversity, Function and its Evolution. Germany, **Natural Product Communications**, vol 3 n. 8 1205-1216, 2008a.

WINK, M. Evolutionary advantage and Molecular Modes of Action of Multi-Component Mixtures Used in Phytomedicine. **Current Drug Metabolism**, v.9, n.10, p.996-1009, 2008 b.

WINK, M.. Evolution of Secondary Plant Metabolism. In: **Encyclopedia of Life Sciences (ELS)**. John Wiley eSons. Ltd: Chichester, 2008c.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v.64, n.1, p.3-19, 2003.

WINK, M. Allelochemicals properties or the raison detre of alkaloids. In: BROSSI, A. (ed). **The alkaloids**. San Diego: Academic v.43, p.1-118, 1993

WINK, M. The Role of quinolizidine alkaloids in plant insect interactions, In Bernays EA (ed.) **Insect- Plant Interactions**, Vol. IV, pp. 133-169, Boca Raton: CRC Press, 1992.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M.J.C. (ed). **Secondary products from plant tissue culture**, Oxford, Clarendon, 1990.

WINK, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 75, p.225-233, 1988.

WISBECK, E.; ROBERT, A.P.; FURLAN, S.A. Avaliação da produção de agentes antimicrobianos por fungos do genero *Pleurotus*. **Revista Saúde e Ambiente**, v.3, n.2 p.7-10, 2002.

WRIGHT, A.D.; OSTERHAGE, C.; KONIG, M. Epicoccamide, a novel secondary metabolite from jellyfish-derived culture of *Epicoccum purpurascens*. **Organic Biomolecular Chemistry**, v.1 p.507-510, 2003.

WU, H.; HAIG, T.; PRATLEY, J.; LEMERLE, D.; AN, M. Biochemical basis for Wheat Seedling Allelopathy on the Suppression of Annual Ryegrass (*Lolium rigidum*). **Journal of Agricultural and Food Biochemistry**, v.50, n.16, p.4567-4571, 2002.

YANG, X.; STROBEL, G.; STIERLE, A.; HESS, W.M.; LEE, J.; CLARDY, J. A fungal endophyte-tree relationship: *Phoma* sp. in *Taxus wallachiana*. **Plant Science**, v.102, p.1-9, 1994.

YIN, Z. Q.; WANG, Y.; YE, W. C.; ZHAO, S. X. Chemical constituents of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) growing in China. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 5, p. 521-523, 2004.

YUNES, R.A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos farmacos e a moderna Farmacognosia**. 1ª edição .Editora Univali, Santa Catarina, 2007.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais Sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Editora Argos, Santa Catarina, Brasil, 2001.

ZHANG, Y.; LIU, S.; CHE, Y.; LIU, X. Epicoccins A-D, Epipolythiopiperazines from a Cordyceps- Colonizing Isolate of *Epicoccum nigrum*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 9, p. 1522-1525, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1

**ANOVA E TESTES DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana* CONTRA O FITOPATÓGENO *Guignardia
citricarpa* 3305 (pareamento 1)**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

QUADRO DE ANÁLISE

G.L	S.Q	Q.M	F	F.V
6	107.05783	17.84297	14.4777 **	Tratamentos
20	24.64883	1.23244		Resíduo
26	131.70667			Total

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

MÉDIAS E MEDIDAS

1 <i>Guignardia citricarpa</i> 33/05	13.38 a	nr = 5
2 FCU 027	10.00 bc	nr = 2
3 FCU 042	7.33 c	nr = 3
4 FCU 075	10.57 b	nr = 4
5 FCU 103	9.56 bc	nr = 3
6 FCU 129	8.16 bc	nr = 5
7 FCU 174	8.48 bc	nr = 5

DMS = 3.62669

MG = 9.74444

CV% = 11.39269

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 2

**ANOVA E TESTES DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana* contra o fitopatógeno *Guignardia
citricarpa* 3305 (pareamento 2)**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamentos	4	578.55083	144.63771	93.2592 **
Residuo	19	29.46750	1.55092	
Total	23	608.01833		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

MÉDIAS E MEDIDAS

1 <i>Guignardia citricarpa</i> 33/05	18.84 a	nr = 5
2 FCU 028	8.22 c	nr = 5
3 FCU 048	11.37 b	nr = 4
4 FCU 055	18.46 a	nr = 5
5 FCU 060	7.82 c	nr = 5

DMS = 3.75137

MG = 13.00833

CV% = 9.57355

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 3

**ANOVA E TESTES DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana* contra o fitopatógeno *Guignardia
citricarpa* 3305 (pareamento 3)**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamentos	5	447.93164	89.58633	25.6609 **
Residuo	22	76.80550	3.49116	
Total	27	524.73714		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

MÉDIAS E MEDIDAS

1 <i>Guignardia citricarpa</i> 33/05	18.25 a	nr = 4
2 FCU 054	9.04 b	nr = 5
3 FCU 067	14.47 a	nr = 4
4 FCU 077	9.02 b	nr = 5
5 FCU 088	16.20 a	nr = 5
6 FCU 124	7.720 b	nr = 5

DMS = 5.82170

MG = 12.17143

CV% = 15.35123

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 4

**ANOVA E TESTES DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana* contra o fitopatógeno *Guignardia
citricarpa* 3305 (pareamento 4)**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamentos	10	107.37818	10.73782	7.5199 **
Residuo	38	54.26100	1.42792	
Total	48	161.63918		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

MÉDIAS E MEDIDAS

1 <i>Guignardia citricarpa</i> 33/05	11.70 a	nr = 5
2 FCU 001	7.125 cd	nr = 4
3 FCU 037	7.55 bcd	nr = 4
4 FCU 056	7.50 bcd	nr = 4
5 FCU 081	9.25 abcd	nr = 4
6 FCU 085	7.88 bcd	nr = 5
7 FCU 087	10.27 ab	nr = 4
8 FCU 136	6.45 d	nr = 4
9 FCU 143	7.94 bcd	nr = 5
10 FCU 168	9.62 abc	nr = 5
11 FCU 172	8.58 bcd	nr = 5

DMS = 4.08606

MG = 8.59592

CV% = 13.90144

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 5

**ANOVA E TESTES DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana* contra o fitopatógeno *Guignardia
citricarpa* 3305 (pareamento 5)**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamentos	1	76.17600	76.17600	15.2018 **
Residuo	8	40.08800	5.01100	
Total	9	116.26400		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < .01$)

MÉDIAS E MEDIDAS

1	<i>Guignardia citricarpa</i> 33/05	14.40 a
2	FCU 038	8.88 b

DMS = 3.26358 MG = 11.64000 CV% = 19.23133

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 6

**ANOVA E TESTES DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana* contra o fitopatógeno *Guignardia
citricarpa* 3305 (pareamento 6)**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamentos	1	6.12500	6.12500	12.6289 *
Residuo	6	2.91000	0.48500	
Total	7	9.03500		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

1 *Guignardia citricarpa* 33/05 11.75 b

2 FCU 021 13.50 a

DMS = 1.20481

MG = 12.62500

CV% = 5.51619

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 7

**ANOVA E TESTES DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana* contra o fitopatógeno *Fonsecaea
monophora* (pareamento 1)**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamentos	6	1043.26285	173.87714	25.7584 **
Residuo	19	128.25600	6.75032	
Total	25	1171.51885		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

1 <i>Fonsecaea monophora</i>	31.42000 a	nr = 5
2 FCU 027	18.85 b	nr = 2
3 FCU 042	10.92 c	nr = 4
4 FCU 075	18.97 b	nr = 4
5 FCU 103	17.90 bc	nr = 2
6 FCU 129	22.02 b	nr = 5
7 FCU 174	17.30 bc	nr = 4

DMS = 8.52442

MG = 20.36538

CV% = 12.75761

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 8

**ANOVA E TESTES DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana* contra o fitopatógeno *Fonsecaea
monophora* (pareamento 2)**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamentos	4	2286.16150	571.54038	88.5249 **
Residuo	15	96.84400	6.45627	
Total	19	2383.00550		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

1 <i>Fonsecaea monophora</i>	45.00 a	nr = 2
2 FCU 028	13.44 c	nr = 5
3 FCU 048	14.95 c	nr = 4
4 FCU 055	28.35 b	nr = 4
5 FCU 060	10.46 c	nr = 5

DMS = 7.85158

MG = 19.13500

CV% = 13.27890

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 9

**ANOVA E TESTES DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana* contra o fitopatógeno *Fonsecaea
monophora* (pareamento 3)**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamentos	5	3683.55663	736.71133	48.6886 **
Residuo	21	317.75300	15.13110	
Total	26	4001.30963		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

1 <i>Fonsecaea monophora</i>	45.12 a	nr = 5
2 FCU 054	16.28 c	nr = 5
3 FCU 067	25.85 b	nr = 4
4 FCU 077	13.76 c	nr = 5
5 FCU 088	30.72 b	nr = 4
6 FCU 124	13.52 c	nr = 4

DMS = 12.17710

MG = 24.30370

CV% = 16.00526

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 10

**ANOVA E TESTES DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana* contra o fitopatógeno *Fonsecaea
monophora* (pareamento 4)**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamentos	10	3196.17228	3196.17228	61.1585 **
Residuo	34	177.68550	5.22604	
Total	44	3373.85778		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

1 <i>Fonsecaea monophora</i>	31.40 a	nr = 5
2 FCU 001	10.63 c	nr = 3
3 FCU 037	10.68 c	nr = 5
4 FCU 056	27.24 a	nr = 5
5 FCU 081	26.30 a	nr = 4
6 FCU 085	15.63 bc	nr = 3
7 FCU 087	17.23 b	nr = 3
8 FCU 136	11.80 bc	nr = 4
9 FCU 143	10.28 c	nr = 5
10 FCU 168	29.67 a	nr = 4
11 FCU 172	11.35 bc	nr = 4

DMS = 7.87703

MG = 18.77778

CV% = 12.17425

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 11

**ANOVA E TESTES DE MÉDIAS DAS INTERAÇÕES ENTRE OS ISOLADOS
ENDOFÍTICOS DE *Croton urucurana* contra o fitopatógeno *Fonsecaea
monophora* (pareamento 5)**

EXPERIMENTO INTEIRAMENTE CASUALIZADO

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Tratamentos	1	128.00000	128.00000	8.4526 *
Residuo	6	90.86000	15.14333	
Total	7	218.86000		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($.01 \leq p < .05$)

MÉDIAS E MEDIDAS

1 *Fonsecaea monophora* 29.20 a

2 FCU 038 21.20 b

DMS = 6.73220

MG = 25.20000

CV% = 15.44224

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

ANEXO 12
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
CONTRA BACTÉRIAS E LEVEDURA DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

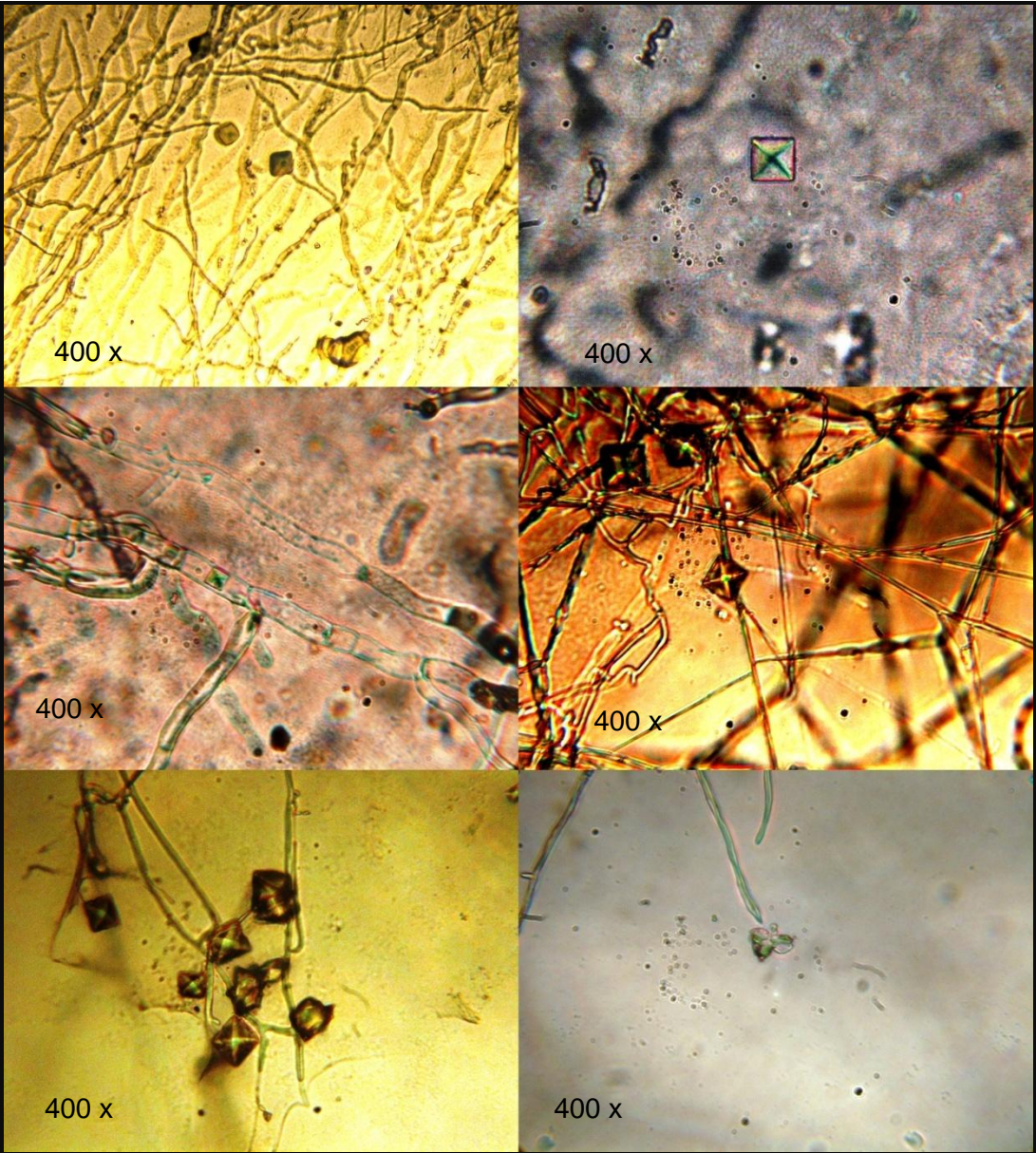
Código do endofítico	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
FCU 001	-	-	-	-	-	-
FCU 021	-	-	-	-	-	-
FCU 027	12 mm	-	-	-	-	9 mm
FCU 028	-	-	-	-	-	-
FCU 037	-	-	-	-	-	-
FCU 038	-	-	-	-	-	-
FCU 042	-	-	-	-	-	-
FCU 048	-	-	-	-	-	-
FCU 054	-	-	-	-	-	-
FCU 055	-	-	-	-	13 mm	-
FCU 056	-	-	-	-	-	-
FCU 060	-	-	-	-	-	-
FCU 067	-	-	-	-	-	-
FCU 075	-	-	-	-	-	-
FCU 077	-	-	-	-	-	-
FCU 081	-	-	-	-	-	-
FCU 085	-	-	-	-	-	-
FCU 087	-	-	-	-	-	-
FCU 088	-	-	-	-	-	-
FCU 103	-	-	-	-	-	-
FCU 124	-	-	-	-	-	-
FCU 129	-	-	-	-	-	-
FCU 136	-	-	-	-	-	-
FCU 143	-	-	-	-	-	-
FCU 168	-	-	-	-	-	-
FCU 172	-	-	-	-	-	-
FCU 174	-	-	-	-	-	-

ANEXO 13
AVALIAÇÃO DA AÇÃO DOS EXTRATOS DE ENDOFÍTICOS SOBRE O
CRESCIMENTO MICELIAL DE *Guignardia citricarpa* E *Fonsecaea monophora*

Código do extracto	EXTRATO / CONTROLES	<i>Guignardia citricarpa</i>		<i>Fonsecaea monophora</i>	
		Diâmetro 7 dias em mm	% de inibição	Diâmetro 7 dias em mm	% de inibição
	Controle de crescimento	16,1	-	20,9	
	Controle solvente MeOH	15,8	1,9%	22,5	
	Control positivo Derosal	8,5	47,2%	19,1	8,6%
	Control positivo Glifosinato	9,0	44,1%	-	
	Controle positivo Fluconazol	-	-	18,1	13,4%
	Controle positivo Nistatina	-	-	17,8	14,4%
1 028 1	FCU 028 MILHO liq. ACETATO	12,0	25,5%	19,1	8,6%
2 028 2	FCU 028 MILHO liq. METANOL	11,7	27,3%	19,7	5,7%
3 028 3	FCU 028 MALTE ACETATO	15,1	6,2%	20,7	0,96%
4 028 4	FCU 028 MALTE METANOL	12,5	24,8%	21,4	-
5 028 5	FCU 028 ARROZ Sol.METANOL	12,9	19,9%	20,8	0,48%
6 028 6	FCU 028 MILHO Sol METANOL	12,3	23,6%	18,7	10,53%
7 042 1	FCU 042 MILHO liq ACETATO	13,1	18,6%	23,2	-
8 042 2	FCU 042 MILHO liq METANOL	14,4	10,6%	25,2	-
9 042 4	FCU 042 MALTE METANOL	11,9	26,1%	25,0	-
10 042 5	FCU 042 ARROZ sol. METANOL	11,4	29,2%	28,7	-
11 042 6	FCU 042 MILHO sol. METANOL	13,7	14,9%	21,0	-
12 055 1	FCU 055 MILHO liq ACETATO	12,7	21,1%	25,2	-
13 055 2	FCU 055 MILHO liq METANOL	12,7	21,1%	20,2	3,3%
14 055 4	FCU 055 MALTE METANOL	14,0	13,0%	26,6	-
15 055 5	FCU 055 ARROZ sol.METANOL	10,7	33,5%	21,0	-
16 055 6	FCU 055 MILHO sol. METANOL	9,5	41,0%	21,5	-
17 060 1	FCU 060 MILHO liq. ACETATO	13,4	16,8%	27,3	
18 060 2	FCU 060 MILHO liq. METANOL	13,2	18,0 %	20,7	0,96%
19 060 3	FCU 060 MALTE liq. ACETATO	12,4	23,0%	23,2	-
20 060 4	FCU 060 MALTE liq. METANOL	12,3	23,6%	27,7	-
21 060 5	FCU060 ARROZ sol. METANOL	11,9	26,1%	22,9	-
22 060 6	FCU 060 MILHO sólido METANOL	10,9	32,3%	25,8	-
23 077 1	FCU 077 MILHO liq ACETATO	11,6	28,0%	21,3	-
24 077 2	FCU 077 MILHO liq METANOL	11,4	29,2%	15,3	26,8%
25 077 3	FCU 077 MALTE liq ACETATO	10,4	35,4%	20,5	1,9%
26 077 4	FCU 077 MALTE liq METANOL	10,4	35,4%		
27 077 5	FCU 077 ARROZ sol. METANOL	13,8	14,3%	25,4	-
28 077 6	FCU 077 MILHO sólido METANOL	14,9	7,5%	23,0	-
29 054 1	FCU 054 MILHO liq ACETATO	11,5	28,6%	19,9	4,8%
30 054 2	FCU 054 MILHO liq METANOL	12,5	22,4%	32,8	-
31 054 3	FCU 054 MALTE liq ACETATO	11,7	27,3%	22,9	-
32 054 4	FCU 054 MALTE liq METANOL	11,3	29,8%	21,0	-

Notas Código dos extratos (primeira coluna a esquerda) **1-32** números dos extratos; 028, 042, 054, 055, 060 e 077 números de endofíticos; 1-6 tipo de solvente e meio de cultivo: 1, meio milho liquido solvente de extração acetato, 2 meio milho liquido solvente de extração metanol, 3 meio malte liquido solvente de extração acetato, 4 meio malte liquido solvente de extração metanol, 5 meio arroz sólido solvente de extração metanol, 6 meio milho sólido solvente de extração metanol.

ANEXO 14
CRISTAIS PRODUZIDOS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PELO
ISOLADO ENDOFITICO FCU 028



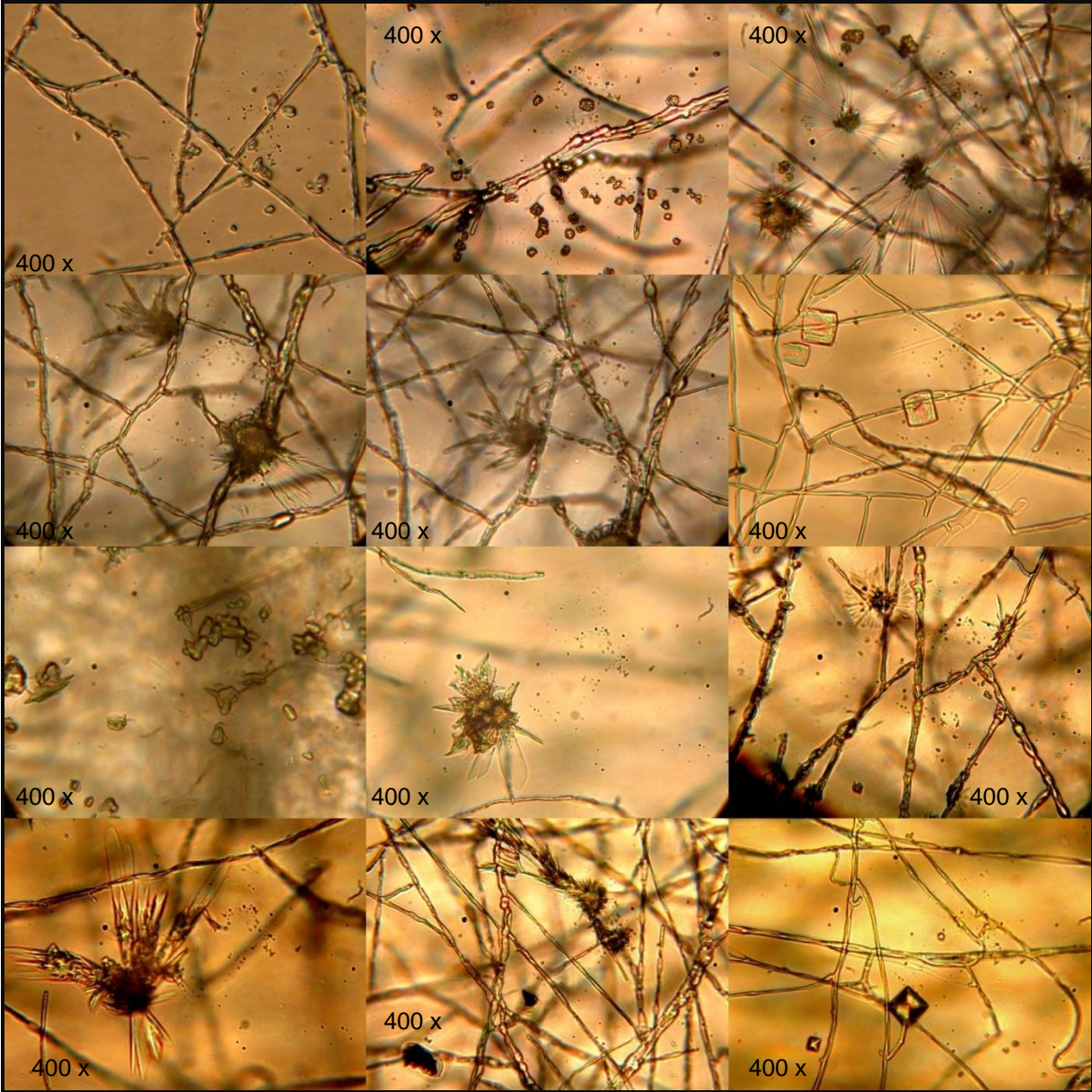
ANEXO 15
CRISTAIS PRODUZIDOS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PELO
ISOLADO ENDOFITICO FCU 054



ANEXO 16
CRISTAIS PRODUZIDOS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PELO
ISOLADO ENDOFITICO FCU 054



ANEXO 17
CRISTAIS PRODUZIDOS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA PELO
ISOLADO ENDOFITICO FCU 077



ANEXO 18

LOCAL DA COLETA DE FOLHAS E CASCA DO CAULE DE *Croton urucurana*,
DEPARTAMENTO DE AMAMBAY – PARAGUAI

