

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS
DE *Cladosporium cladosporioides* (Fres) de Vries**

LUCIANA PEREIRA DE SOUZA

2010

LUCIANA PEREIRA DE SOUZA

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE EXTRATOS DE *Cladosporium*
cladosporioides (Fres) de Vries**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Dra. Sara Maria Chalfoun

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Souza, Luciana Pereira de.

Potencial antifúngico de extratos de *Cladosporium
cladosporioides* (Fres.) de Vries / Luciana Pereira de Souza. –
Lavras : UFLA, 2010.

110 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Sara Maria Chalfoun.

Bibliografia.

1. Metabólitos. 2. Fungos. 3. Café. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CDD – 632.4

A Deus, pela presença constante e pelas bênçãos derramadas em minha vida.

A minha mãe, Siomara, pelo amor incondicional, dedicação e incentivo.

Ao meu pai, Márcio, pelo apoio e motivação

A minha irmã Érica, meu irmão Gabriel e sobrinha Geovanna, pelo carinho e compreensão

As minhas avós, Enir e Manoela e meus avôs, Chicão e vô Nego (*in memoriam*), pelas experiências de vida e ensinamentos

Ao meu amor, Paulo Henrique, pelo imenso carinho, companheirismo esforço e dedicação.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho e a concretização deste sonho, em especial:

À pesquisadora Dra. Sara Maria Chalfoun, pela oportunidade, incentivo, orientação e amizade,

À Dra. Deila Magna dos Santos Botelho, pela amizade, pelos conselhos e pelo apoio nas análises estatísticas.

Ao Dr. Marcelo Cláudio Pereira e ao Dr. Carlos José Pimenta, pelo apoio e incentivo,

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela cooperação e ensinamentos.

À Epamig, por permitir a realização do experimento *in vitro*.

Aos funcionários e técnicos dos Laboratórios de Microbiologia Agrícola e da Epamig, em especial à Vicentina, pela paciência e sugestões.

Aos colegas de Laboratório e de mestrado, Carol, Fernanda, Livia, Carlos; Ana Paula, Lucas, Aline, Juciara, Tamara e Pedro Paulo, pela ajuda e amizade.

Ao professor Denilson e à equipe do Laboratório de Produtos Naturais, pelo apoio e incentivo

Aos amigos distantes, mas que, de alguma forma, estão sempre presentes em minha vida.

Aos meus queridos sogros Antônio Carlos Bermejo e Margareth Bermejo, pela confiança e pelo carinho

Aos demais familiares, pelos conselhos, apoio e amor.

À Capes, pela concessão da bolsa de mestrado.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
CAPITULO 1.....	
1 Introdução geral.....	1
2 Referencial teórico.....	3
2.1 Fungos Associados aos frutos e grãos do café.....	3
2.2 O gênero <i>Cladosporium</i>	6
2.3 Dinâmica de colonização de <i>Cladosporium cladosporioides</i> em frutos de café.....	8
2.4 Agentes de controle biológico.....	10
2.5 Produtos Naturais e Biodiversidade.....	15
2.6 Antimicrobianos produzidos por fungos.....	18
2.7 Produção de metabólitos por espécies do fungo <i>Cladosporium</i>	24
2.8 Teste de susceptibilidade antimicrobiana.....	27
2.9 Diluentes utilizados na extração de metabólitos.....	28
2.9.1 Solventes orgânicos.....	28
2.9.2 Toxicidade do solvente orgânico.....	30
2.9.3 Alguns solventes utilizados para reações orgânicas.....	30
3 Referências Bibliográficas.....	34
CAPITULO 2: Atividade de extratos de <i>Cladosporium cladosporioides</i> na esporulação e germinação dos fungos <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Fusarium sp.</i> e <i>Penicillium sp.</i>	49
1 Resumo.....	50
2 Abstract.....	51

3	Introdução.....	52
4	Materiais e Métodos.....	54
4.1	Área Experimental.....	54
4.2	Meios de cultura.....	54
4.2.1	Ágar de Batata e Dextrose (BDA).....	54
4.2.2	Meio Líquido de Batata e Dextrose (BDL).....	54
4.2.3	Solução de Tween 80 a 0,1% (v/v).....	55
4.3	Preparo e inoculação dos fungos.....	55
4.4	Cultivo do microrganismo.....	55
4.5	Preparo de extrato.....	55
4.6	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	56
4.6.1	Teste <i>in vitro</i> de esporulação dos fungos.....	56
4.6.2	Teste <i>in vitro</i> de germinação de esporos.....	57
4.7	Delineamento experimental e análise estatística.....	58
5	Resultados e Discussão.....	60
5.1	Ação de metabólitos secundários do filtrado de <i>C. cladosporioides</i> obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a esporulação de <i>Aspergillus ochraceus</i>	60
5.2	Ação de metabólitos secundários do filtrado de <i>C. cladosporioides</i> obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a esporulação de <i>Aspergillus Níger</i>	63
5.3	Ação de metabólitos secundários do filtrado de <i>C. cladosporioides</i> , obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a esporulação de <i>Fusarium</i> sp.....	67
5.4	Ação de metabólitos secundários do filtrado de <i>C. cladosporioides</i> obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a esporulação de <i>Penicillium</i> sp.....	70
5.5	Ação de metabólitos secundários do filtrado de <i>C. cladosporioides</i>	

obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a germinação de <i>Aspergillus ochraceus</i>	73
5.6 Ação de metabólitos secundários do filtrado de <i>C. cladosporioides</i> obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a germinação de <i>Aspergillus niger</i>	75
5.7 Ação de metabólitos secundários do filtrado de <i>C. cladosporioides</i> obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a germinação de <i>Fusarium</i> sp.....	77
5.8 Ação de metabólitos secundários do filtrado de <i>C. cladosporioides</i> obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a germinação de <i>Penicillium</i> sp.....	79
5.9 Análise comparativa dos resultados para teste de esporulação e germinação.....	80
6 Conclusões.....	85
7 Referências Bibliográficas.....	86
CAPITULO 3: Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de frações do extrato de <i>C. cladosporioides</i> contra os fungos <i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Fusarium</i> sp. e <i>Penicillium</i> sp.....	
1 Resumo.....	90
2 Abstract.....	91
3 Introdução.....	92
4 Material e Métodos.....	94
4.1 Determinação da Concentração inibitória mínima do extrato de <i>C. cladosporioides</i> com os extratores AcOEt, Et(OH), DMSO e Me(OH) contra os fungos <i>A. ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Fusarium</i> sp. e <i>Penicillium</i> SP...	94
4.1.1 Ensaio de diluição.....	94
4.1.2 Testemunhas do teste para <i>Aspergillus ochraceus</i>	95
4.1.3 Testemunhas do teste para <i>Aspergillus Níger</i>	96

4. 1.4 Testemunhas do teste para <i>Fusarium sp.</i>	97
4. 1.5 Testemunhas do teste para <i>Penicillium sp.</i>	97
5 Resultados e Discussão.....	99
5. 1 Determinação da Concentração inibitória mínima do extrato de C.cladosporioides com os extratores AcOEt, Et(OH), DMSO e Me(OH) contra <i>A.ochraceus</i>	99
5.2 Determinação da Concentração inibitória mínima do extrato de C.cladosporioides com os extratores AcOEt, Et(OH), DMSO e Me(OH) contra <i>A.niger</i>	102
5.3 Determinação da Concentração inibitória mínima do extrato de C.cladosporioides com os extratores AcOEt, Et(OH), DMSO e Me(OH) contra <i>Fusarium sp.</i>	104
5. 4 Determinação da Concentração inibitória mínima do extrato de C.cladosporioides com os extratores AcOEt, Et(OH), DMSO e Me(OH) contra <i>Penicillium sp.</i>	105
6 Conclusões.....	108
7 Referências Bibliográficas.....	109

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Tratamentos e descrição dos testes para análises estatísticas.....	59
TABELA 2 Efeito de metabólitos do fungo <i>C.cladosporioides</i> sobre a esporulação de esporos do fungo <i>Aspergillus ochraceus</i>	60
TABELA 3 Efeito de metabólitos extraídos de <i>C.cladosporioides</i> sobre a esporulação de esporos do fungo <i>Aspergillus niger</i>	64
TABELA 4 Efeito de metabólitos do fungo <i>C.cladosporioides</i> sobre a esporulação de esporos do fungo <i>Fusarium sp.</i>	67
TABELA 5 Efeito de metabólitos do fungo <i>C.cladosporioides</i> sobre a esporulação de esporos do fungo <i>Penicillium sp.</i>	70
TABELA 6 Efeito de metabólitos do fungo <i>C.cladosporioides</i> sobre a germinação de esporos do fungo <i>A.ochraceus</i>	73
TABELA 7 Efeito de metabólitos do fungo <i>C.cladosporioides</i> sobre a germinação de esporos do fungo <i>A. Níger</i>	75
TABELA 8 Efeito de metabólitos do fungo <i>C. cladosporioides</i> sobre a germinação de esporos do fungo <i>Fusarium sp.</i>	77
TABELA 9 Efeito de metabólitos do fungo <i>C.cladosporioides</i> sobre a germinação de esporos do fungo <i>Penicillium sp.</i>	79
TABELA 10 Porcentagens expressas das atividades dos metabólitos extraídos de <i>C.cladosporioides</i> nas reduções das esporulações dos fungos.....	83
TABELA 11 Porcentagens expressas das atividades dos metabólitos extraídos de <i>C.cladosporioides</i> nas reduções das germinações dos fungos.....	84
TABELA 12 Determinação da mínima concentração inibitória das frações obtidas do filtrado fúngico para <i>A.ochraceus</i>	101

TABELA 13 Mínima concentração inibitória dos metabólitos extraídos de extratos de <i>C.cladosporioides</i> .Metabólito A-Extração com AcOEt; Metabólito C-Extração com DMSO; Metabólito B-Extração com Et(OH) e Metabólito A-Extração com Me(OH).	102
TABELA 14 Determinação da mínima concentração inibitória das frações obtidas do filtrado fúngico para <i>Fusarium SP</i>	104
TABELA 15 Determinação da mínima concentração inibitória das frações obtidas do filtrado fúngico para <i>Penicillium sp</i>	105
TABELA 16 Determinação da mínima concentração inibitória das frações obtidas dos filtrados de <i>C.cladosporioides</i> para os fungos <i>A.niger</i> , <i>A.ochraceus</i> , <i>Fusarium sp.</i> e <i>Penicillium sp</i>	107

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>A. ochraceus</i> . a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com Me(OH).....	62
FIGURA 2 Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>A. ochraceus</i> . a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com dimetil sulfóxido.....	62
FIGURA 3 Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>A. ochraceus</i> . a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com acetato de etila.....	63
FIGURA 4 Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>A. ochraceus</i> . a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com etanol.....	63
FIGURA 5 Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>A. niger</i> . a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com metanol.....	66
FIGURA 6 Ação de metabólitos de <i>C. Cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>A. niger</i> . a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com acetato de etila.....	66
FIGURA 7 Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>A. niger</i> . a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com DMSO.....	66
FIGURA 8 Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>A. niger</i> . a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com etanol.....	67
FIGURA 9 Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>Fusarium</i> sp. a) Testemunha geral e	

	b) extrato do fungo obtido com DMSO.....	68
FIGURA 10	Foto de uma placa com <i>Fusarium</i> após ação do metabólito extraído com AcOEt.....	69
FIGURA 11	Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>Fusarium sp.</i> a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com etanol.....	69
FIGURA 12	Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>Fusarium sp.</i> a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com metanol.....	69
FIGURA 13	Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>Penicillium sp.</i> a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com DMSO.....	71
FIGURA 14	Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>Penicillium sp.</i> a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com Me(OH).....	72
FIGURA 15	Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>Penicillium sp.</i> a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com acetato de etila.....	72
FIGURA 16	Ação de metabólitos de <i>C. cladosporioides</i> sobre a esporulação do fungo <i>Penicillium sp.</i> a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com Et(OH).....	72
FIGURA 17	Microfotografia em microscópio ótico do teste de germinação do fungo <i>A. ochraceus</i> como a) testemunha geral b) na presença de extrato de <i>C. cladosporioides</i> extraído com AcOEt	74
FIGURA 18	Microfotografia em microscópio ótico do teste de germinação do fungo <i>A. niger</i> como a) testemunha geral b) na presença de extrato de <i>C. cladosporioides</i> extraído com	

AcOEt.....	77
FIGURA 19 Microfotografia em microscópio ótico do teste de Germinação do fungo <i>Fusarium sp.</i> a) testemunha geral b) na presença de extratode <i>C. cladosporioides</i> extraído com Metanol.....	78
FIGURA 20 Microfotografia em microscópio ótico do teste de germinação do fungo <i>Fusarium sp.</i> a) Testemunha geral e b) na presença de extrato de <i>C. cladosporioides</i> extraído com metanol.....	80
FIGURA 21 Análise comparativa da esporulação dos fungos com os extratos de <i>C. cladosporioides</i> + extratores; extratores e testemunha geral, para os fungos estudados.....	81
FIGURA 22 Análise comparativa da germinação dos fungos com os extratos de <i>C. cladosporioides</i> + extratores; extratores e testemunha geral, para os fungos estudados.....	82
FIGURA 23 Mínima concentração inibitória dos metabólitos extraídos de extratos de <i>C. cladosporioides</i> .Metabólito A - extração com AcOEt; metabólito C - extração com DMSO; metabólito B - extração com Et(OH) e metabólito A - extração com Me(OH), para o fungo <i>A. ochraceus</i>	100
FIGURA 24 Mínima concentração inibitória dos metabólitos extraídos de extratos de <i>C. cladosporioides</i> . Metabólito A - extração com AcOEt; metabólito C - extração com DMSO; metabólito B - extração com Et(OH) e metabólito A - extração com Me(OH) para o fungo <i>A. niger</i>	103
FIGURA 25 Mínima concentração inibitória dos metabólitos extraídos de extratos de <i>C. cladosporioides</i> . Metabólito A - extração com AcOEt; metabólito C - extração com DMSO;	

metabólito B - extração com Et(OH) e metabólito A - extração com Me(OH) para o fungo <i>Fusarium</i> sp.....	105
FIGURA 26 Mínima concentração inibitória dos metabólitos extraídos de extratos de <i>C. cladosporioides</i> .Metabólito A - extração com AcOEt; metabólito C - extração com DMSO; metabólito B - extração com Et(OH) e metabólito A - extração com Me(OH) para o fungo <i>Penicillium</i> sp.....	106

RESUMO

SOUZA, Luciana Pereira de. **Potencial antifúngico de extratos de *Cladosporium cladosporioides* (Fres) de Vries**. 2010. 110 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A influência de microrganismos na qualidade do café é estudada, geralmente, por meio de pesquisas com o fungo de gênero *Cladosporium*. Este fungo está associado a bebidas de boa qualidade, o que despertou o interesse para sua utilização como agente antagonista aos fungos deletérios à qualidade do café. Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar o efeito de extratos de *C. cladosporioides* em meio BD acrescido com extratores (metanol, etanol, dimetil sulfóxido e acetato de etila) e suas atividades contra fungos prejudiciais à qualidade do café. Testes de esporulação foram realizados com extratos e extratores e seus efeitos contra os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Avaliaram-se alterações nas características morfológicas dos fungos, tais como alterações na cor, no tamanho e na produção de esporos. Testes de germinação também foram desenvolvidos, a fim de se encontrar o extrator que apresentou melhor resultado na inibição da germinação dos fungos. O delineamento foi inteiramente casualizado, com seis repetições e dez repetições, para testes de esporulação e germinação, respectivamente. Os testes *in vitro* demonstraram o potencial dos metabólitos obtidos a partir de extrações realizadas com diferentes extratores, sendo, para esporulação e germinação de *A. ochraceus*, a partir de metabólitos de *Cladosporium cladosporioides* extraídos com metanol, atividade de 83% e 31%, respectivamente; para *A. niger*, taxa de 54% e 60%; para metabólitos extraídos com AcOEt, para *Fusarium* sp., atividade de 87% e 40%, respectivamente e para metabólitos extraídos com metanol 79% e 19%, respectivamente, para o fungo *Penicillium* sp.

*Orientadora: Sara Maria Chalfoun

ABSTRACT

SOUZA, Luciana Pereira de. **Antifungal activity of extracts of *Cladosporium cladosporioides* (Fres) de Vries**. 2010. 110 p. Dissertation (Master's degree in Agricultural Microbiology) - Federal University of Lavras, Lavras.*

The influence of microorganisms on the quality of coffee is usually studied through researches with the fungi of the genus *Cladosporium*, which is associated with good quality drinks. This work was carried out to determine the effects of the *C. cladosporioides* medium BD extracts increased with extractors and their activities against fungi quality of coffee. Sporulation tests were carried out with extractors and their effects against the fungi *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium* sp and *Penicillium* sp. We evaluated changes in morphological characteristics of fungi such as changes in color, size and spore production. Germination tests were also developed to meet the extractor that showed better results in the inhibition of germination fungi. The designed was totally randomized with six replicates and ten replicates for testing and sporing germination respectively. In vitro tests have demonstrated the potential of the metabolites obtained from extractions performed with different extracts, and for sporulation and germination of *A. ochraceus* from metabolites of *Cladosporium cladosporioides* extracted with methanol, the activity of 83% and 31% respectively, for *A. niger*, a rate of 54% and 60% for metabolites extracted with EtOAc to *Fusarium* sp., activity of 87% and 40% respectively and metabolites extracted with methanol 79% and 19%, respectively, for the fungus *Penicillium* sp.

*Adviser: Sara Maria Chalfoun

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O café é um dos principais produtos agrícolas da exportação brasileira, destacando-se a região sul do estado de Minas Gerais como produtora de bons cafés. Dentre os fatores que afetam a qualidade, fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* têm merecido destaque nas últimas décadas, tanto por alterações sensoriais, quanto pela produção de toxinas que podem prejudicar a saúde do consumidor. A qualidade do café pode ser influenciada por diversos fatores, entre eles, a espécie, a cultivar utilizada, o manejo da lavoura, o processamento e, principalmente, como se vem constatando, a presença de microrganismos, destacando-se os fungos.

Os fungos estão distribuídos amplamente na natureza e são contaminantes comuns dos alimentos, grãos e rações que, por apresentarem nutrientes como carboidratos, proteínas e lipídeos, constituem um substrato adequado para o desenvolvimento de microrganismos (Gourama & Bullerman, 1995). Determinados fungos contaminantes de produtos agrícolas produzem metabólitos secundários tóxicos denominados micotoxinas, que podem provocar intoxicações em seres humanos e animais

Dessa maneira, a caracterização e a identificação de fungos contaminantes de alimentos são essenciais para o controle da contaminação por esses microrganismos e da possível produção de micotoxinas. Os fungos podem influenciar a qualidade do café de duas maneiras bem distintas, que são: produzindo metabólitos tóxicos ao homem, conhecidos como micotoxinas, destacando-se a ocratoxina A, que já limita a exportação em alguns países ou agindo sobre os grãos, influenciando as características sensoriais do produto. Dentre os fungos que afetam negativamente a qualidade, destacam-se os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, tanto por alterações na bebida quanto pela produção de micotoxinas.

A influência benéfica de microrganismos na qualidade de vários produtos é bastante conhecida, como no caso dos queijos, vinhos e outras bebidas. Porém, a influência de microrganismos que afetam a qualidade do café se limita a relatos do fungo *Cladosporium* associado a bebidas de boa qualidade (Carvalho et al.1989a; Alves, 1996; Meirelles 1990). *Cladosporium* tem sido relatado associado a cafés de boa qualidade em várias regiões, o que despertou o interesse para o seu uso como agente de antagonista aos fungos deletérios à qualidade do café.

A utilização de fungicidas químicos é um dos métodos mais utilizados para controlar as doenças de plantas. Entretanto, há grande limitação em relação a aspectos de segurança dos mesmos, em função dos possíveis efeitos carcinogênicos e teratogênicos, bem como toxicidade residual (Skandamis et al., 2001; Eckert et al., 1994). Soma-se a este fato a preocupante realidade do progressivo surgimento de cepas microbianas resistentes a antimicrobianos em todos os campos de estudo da microbiologia, resultado da utilização abusiva desses compostos que exercem pressão para o surgimento do fenômeno de resistência (Andremont, 2001).

Com base nesses critérios, objetivou-se, com a realização deste trabalho, realizar a extração de substâncias bioativas obtidas de microrganismos com efeitos antagônicos sobre fungos toxigênicos deterioradores da qualidade e patogênicos ao cafeeiro. O objetivo específico foi avaliar o efeito de metabólitos extraídos do fungo *Cladosporium cladosporioides*, por meio de testes de esporulação e germinação contra os fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., além de determinar a concentração mínima inibitória de metabólitos extraídos de *Cladosporium cladosporioides* para cada fungo estudado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fungos associados a frutos e grãos de café

O fruto de café maduro contém, especialmente no mesocarpo mucilaginoso, açúcares simples, polissacarídeos, minerais, proteínas e lipídeos, entre outros compostos. Constitui, assim, excelente meio de cultura para o crescimento de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Amorim & Silva, 1968), que produzem suas próprias enzimas e agem sobre os componentes químicos da mucilagem, principalmente sobre os açúcares, fermentando-os e produzindo álcool, que é desdobrado em ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico e outros ácidos carboxílicos superiores.

A partir da produção de ácido butírico, são produzidos os compostos responsáveis pelos sabores indesejáveis (Carvalho & Chalfoun, 1985).

Os primeiros relatos da influência de fungos na qualidade de café datam de 1936, quando Krug (1940a) verificou, através de lupa de bolso em amostras de cafés ardidos, a presença de um fungo de micélio avermelhado, identificado, inicialmente, como do gênero *Fusarium*. A partir daí, esse pesquisador deu início a uma série de trabalhos sobre a origem dos cafés duros. Inicialmente, ele estudou a influência dos cafés de varrição na qualidade da bebida, verificando uma relação entre bebidas de má qualidade e a presença de grão de varrição, bem como aumento do fungo de micélio avermelhado, identificado como *Fusarium concolor* (Krug, 1940a).

Krug (1940b) estudou a microbiota de grãos de café nos estádios de cereja, seco no pé e seco no chão e verificou porcentagem de 0%, 13% e 20% de bactérias e 0%, 2% e 13%, para fungos, respectivamente. Sobre a diferença na qualidade do café de diferentes regiões, Krug (1940c) fez um levantamento e verificou maior porcentagem do fungo *Fusarium concolor* em bebidas de pior qualidade.

Dentre os microrganismos que incidem sobre os frutos de café encontram-se os fungos filamentosos associados a processos fermentativos que ocorrem durante as fases de desenvolvimento dos frutos até a fase pós-colheita, muitas vezes prejudicando a composição final do grão. Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os mais frequentemente associados com micotoxinas que ocorrem em cereias, grãos e sementes, em níveis que tornam os alimentos impróprios para o consumo.

Estudando os fungos filamentosos em diferentes estádios de maturação, Alves & Castro (1993) isolaram os gêneros *Colletotrichum* sp. e *Phoma* sp. dos estádios de maturação verde-cana e cereja e *Cercospora* sp. apenas na fase verde-cana, atribuindo a ausência desses fungos nas fases posteriores como consequência do fato de gêneros como *Fusarium*, *Penicillium* e *Cladosporium* aproveitarem-se das injúrias provocadas nos frutos pelos primeiros para penetrarem e colonizarem os tecidos mais rapidamente.

O gênero *Fusarium* foi encontrado em todos os estádios de maturação, com maiores percentagens verificadas nos estádios cereja, passa seco no pé e no chão. *Penicillium* sp. presente em todas as fases apresentou maior percentagem no café beneficiado, talvez por suportar baixa umidade (condição de armazenamento). *Cladosporium* sp. também foi isolado em todas as fases, porém, com maior incidência nas fases passa e seco no pé.

As espécies *Aspergillus niger* e *A.ochraceus*, segundo o autor, relacionadas com bebida de pior qualidade, foram encontradas a partir do estágio passa, com maior incidência nas fases chão e café beneficiado.

Da mesma forma, Taniwaki et al. (2003) isolaram fungos filamentosos de grãos de *Coffea arabica* L. provenientes de três regiões do estado de São Paulo, nos estádios de maturação cereja, passa, terreiro e tulha, encontrando *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus*. A frequência

de *Aspergillus ochraceus* foi menor em grãos de árvore e solo e maior na fase de secagem, onde houve predomínio dessa espécie.

A influência de microrganismos na qualidade do café é estudada por meios de pesquisas com o fungo de gênero *Cladosporium*, que está associado a bebidas de boa qualidade (Carvalho et al., 1989; Chalfoun et al., 2007).

Em estudos sobre a incidência de fungos em grãos de café provenientes de 31 países, foi verificada alta infestação em grãos sem desinfestação superficial dos grãos com hipoclorito de sódio a 5,0%, tendo sido constatado que a contaminação interna era maior nas amostras dos países africanos e asiáticos.

Em levantamento da ocorrência de população fúngica associada a grãos de café de seis localidades do estado de Minas Gerais, Alves (1996) verificou a presença de fungos do gênero *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Aspergillus*. Os fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium* sp. estavam associados a bebidas de má qualidade, enquanto *Cladosporium* associava-se a boas bebidas. O autor verificou, em diferentes estádios de desenvolvimento dos frutos do cafeeiro e em diferentes intensidades, os fungos *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp., em duas localidades do município de Lavras, tradicionalmente produtoras de café de boa e má qualidade, confirmando maior intensidade de *Cladosporium* sp. na primeira.

A incidência de populações fúngicas associadas à qualidade de bebida de café na Zona da Mata Mineira foi investigada por Fernandes (2000). Na sucessão de fungos em frutos de café, este autor verificou a presença *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Cercospora* e *Cladosporium*, em diferentes intensidades. Avaliando a flutuação das populações fúngicas, verificou *Cercospora* e *Cladosporium* aumentando de fevereiro a março e uma estabilidade de *Colletotrichum* e *Fusarium*, no dossel das plantas de café.

Silva (2000) realizou um levantamento da diversidade microbiana de cafés em diferentes estádios de maturação e identificou como sendo predominante *Cladosporium* (45,9%), seguido de *Fusarium* (38,8%), *Aspergillus* (2,2%) e *Penicillium* (13,1%).

Os fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp e *Fusarium* spp. estão relacionados com cafés de bebida inferior (Carvalho et al., 1989b; Meireles, 1990; Alves, 1996; Freitas, 2000). Um provável efeito desses microrganismos seria a produção de enzimas que, agindo sobre a mucilagem do fruto, produziriam álcool que, desdobrado a ácido acético, láctico, butírico e outros ácidos carboxílicos, comprometeriam a qualidade da bebida (Carvalho et al., 1989a).

Dentre os fungos associados a grãos de café, o *Cladosporium cladosporioides*, um ascomiceto da ordem Eurotiales (Kirk et al., 2001), é frequentemente encontrado e tem sido associado aos cafés de melhor qualidade, classificados como de bebida dura e mole, de acordo com Meirelles (1990), citado por Carvalho et al. (1989a) e Pereira (2001). O *Cladosporium cladosporioides* é um fungo entomopatogênico de ocorrência natural, também utilizado amplamente no controle biológico de diversas espécies de insetos. É considerado um fungo endofítico, vive no interior dos grãos sem causar danos aos mesmos e está largamente disseminado no ar e na matéria orgânica. Segundo Pereira et al. (2001), o fungo *Cladosporium* sp. tem sido relatado associado a cafés de boa qualidade em várias regiões, o que despertou o interesse para o seu uso como agente antagonista aos fungos deletérios à qualidade do café.

2.2 O gênero *Cladosporium*

O gênero foi descrito, pela primeira vez, em 1815, por Link. Tem, aproximadamente, 500 espécies, sendo 15 de ocorrência comum. *Cladosporium*

é um Ascomyceto mitospórico, subfilo Pezizomycota, classe Dothideomycetes e família Mycosphaerellaceae (Kirk et al., 2001).

O fungo apresenta colônias efusas ou ocasionalmente puntiformes frequentemente de coloração verde oliva, podendo ser cinza, amarelo-claro, marrom, negro ou parda, de textura aveludada ou flocosa. O micélio pode ser imerso ou superficial; estroma algumas vezes presente, sem hifopódiso ou setas (Kirk et al., 2001).

A célula conidiogênica é poliblastica, normalmente integral, terminal e intercalar, muitas vezes discreta, simpodial, mais ou menos cilíndrica cicatrizada, com marcas normalmente proeminentes. Os conídios são frequentemente em cadeias ou solitários nas espécies de conídios grandes. As cadeias ramificadas formam conídeossacropetais, simples, cilíndricos grandes, doliformes, elipsoides, fusiformes, ovoides, esféricos ou subsféricos, frequentemente com uma cicatriz protuberante basal ou próximo a ela, de coloração marrom-olivácea a preto, verrugoso ou equinulado, com 0 a 3 septos ou mais (Ellis, 1971, 976). Em frutos e grãos de café, o fungo é, normalmente, encontrado, porém, sem a descrição das espécies.

Os relatos de *Cladosporium* sp. associados a bebidas de boa qualidade (tipo mole e dura) são amplos (Carvalho et al., 1989b; Alves, 1996; Meirelles, 1990). Entretanto, a influência desse fungo na qualidade e a sua relação com os outros microrganismos ainda não foram estudadas e o seu esclarecimento pode conduzir à sua utilização como potencial agente de controle biológico.

Um provável mecanismo de ação de *Cladosporium* seria um consumo muito rápido do substrato presente no fruto (mucilagem), impedindo ou amenizando o estabelecimento de outros fungos. Esta ação impediria, então, a ocorrência de fermentações indesejáveis, como a butírica e a propiônica, devido à falta de substrato.

O primeiro relato de *Cladosporium* em grãos de café foi feito por Bitancourt (1957), que observou *Cladosporium* com comportamento diferente de outros fungos, não sendo encontrado no terreiro, mas no campo, até o estágio de seco no pé. Na região de maior umidade relativa, a incidência de *Cladosporium* foi menor e a quantidade da bebida pior, ocorrendo o inverso com a região de clima seco. Meirelles (1990) tratou grãos de café com benomyl ou hipoclorito, condicionando-os em sacos de algodão e verificou menor porcentagem de *Cladosporium* nos grãos. Ferreira (1989) relata na região de Viçosa, MG, uma espécie de *Cladosporium* hiperparasitando *Prospodium bicolor* (ferrugem-do-ipê) em sua fase inicial. Em condições de umidade, este fungo foi encontrado amplamente nas esporulações de ferrugem.

Apesar de os estudos sobre a microbiota dos grãos e frutos do café e a sua influência na qualidade da bebida serem antigos, somente a partir da década de 1990 começaram a surgir estudos mais aprofundados sobre as populações de microrganismos, buscando esclarecer os fatores relacionados.

2.3 Dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* em frutos de café

A dinâmica de colonização de *Cladosporium cladosporioides* é típica dos fungos saprófitas. Externamente, o fungo ocorre sobre o fruto durante todas as fases do desenvolvimento. Inicialmente, nos meses de outubro até março, com os frutos nos estágios de chumbinho até verde-cana, essa colonização é menos intensa, não excedendo 25% dos frutos.

Este fato se deve, principalmente, à presença de produtos fenólicos no fruto, como o tanino, que apresenta ação fungitóxica (Pimenta, 1995). A partir do mês de abril, a colonização começa a se acentuar, atingindo o índice máximo nos meses de maio e junho, quando o café já se encontra em estado de

maturação avançado, chamado cereja. Estas observações estão de acordo com as de Alves & Castro (1998), que relataram *Cladosporium* colonizando, além das cerejas, os frutos no estágio de passa. Internamente, o fungo começa a se manifestar a partir de março, quando o fruto inicia sua maturação; a partir do mês de abril, o fungo é encontrado facilmente na comunidade externa do grão.

Os grãos utilizados para a análise não apresentavam qualquer sintoma de lesão provocada por fungos ou pragas, o que pode evidenciar o caráter endofítico de *Cladosporium cladosporioides*. O fungo foi encontrado em folhas de helicônias, como endofítico, principalmente quando as folhas iniciam a senescência (Pereira, 1993). A mesma observação foi feita para folhas de cafeeiros sadios (Chaves et al., 2002).

A dificuldade de detecção de *Cladosporium cladosporioides* nas fases iniciais de desenvolvimento dos frutos pode estar relacionada ao impedimento de sua manifestação, pela inibição pelos próprios compostos do fruto ou pela presença de outros como fungos, como *Phoma jolyana* var. *jolyana* Pirozynki e Morgan-Jones, que estava presente na maioria dos grãos em estágio verde cana. O aumento gradual do fungo coincide com a conversão dos compostos fenólicos em açúcares, facilitando a colonização interna do fruto.

No cafeeiro, o controle da ferrugem e da cercosporiose coincide com o período de colonização de *Cladosporium* sp. sobre os frutos desta cultura. Há uma sucessão enorme de fungos que se associam aos frutos do cafeeiro nos seus diferentes estágios de maturação. Outros relatos a respeito da associação fungo e qualidade são encontrados nos trabalhos de Meirelles & Pereira (2001).

Dentre os fungos associados a grãos de café, o *Cladosporium cladosporioides* é frequentemente encontrado e tem sido associado aos cafés de melhor qualidade, classificados como de bebida dura e mole, de acordo com Carvalho et al. (1989), citados por Meirelles (1990) e Pereira (2001).

2.4 Agentes de controle biológico

O uso intensivo de agroquímicos tem causado diversos problemas. Entre eles, pode-se citar a resistência de pragas a inseticidas, exigindo um aumento da concentração e do número de aplicações. Esse fato concorre para a contaminação do solo, da planta, da água, do homem e de todos os microrganismos vivos e inimigos naturais que fazem parte do agroecossistema. Esses problemas têm reforçado a necessidade de adoção de manejo mais racional e, entre as práticas preconizadas, pode-se destacar a utilização do controle biológico (Robbs & Bittencourt, 1998; Alves et al., 2001).

Atualmente, o uso de controle biológico vem assumindo importância cada vez maior em programas de manejo integrado de pragas, num momento em que se discute a produção integrada rumo a uma agricultura sustentável (Parra et al., 2002). Para Vendramim (2002), o sistema mais adequado para o controle de pragas baseia-se no controle integrado com a utilização de métodos harmoniosos de diferentes técnicas, em consonância com princípios ecológicos, econômicos e sociais, com o objetivo de manter os organismos-praga abaixo do nível de dano econômico.

O controle biológico de patógenos em pós-colheita data de 1953, quando Gutter e Littauer demonstraram a ação antagonista de *Bacillus subtilis* contra patógenos de frutos de citros (Wilson & Chalutz, 1989, citados por Kretzschmar, 1991). Porém, somente a partir da década de 1970 intensificaram-se os trabalhos de pesquisa sobre o tema, na busca de microrganismos com potencial de biocontrole em condições de armazenamento e estudos sobre o seu modo de ação (Kretzschmar, 1991). O campo de pesquisa na área de controle biológico de patógenos tem avançado e algumas experiências mais recentes merecem destaque (Quadro 1).

QUADRO 1 Experiências de controle biológico em pós-colheita

Cultura	Patógeno	Microrganismo de biocontrole	Referência
Maçã	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	(Castora et al., 2001)
Maçã	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Cândida sake</i>	(Usall et al., 2001)
Maçã	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Pseudomonas siringae</i> e leveduras	(Leverentz et al., 2000)
Grão de trigo	<i>Penicillium</i> spp.	<i>Pichia anomala</i>	(Boysen et al., 2000)
Milho	<i>Fusarium graminearum</i> F. <i>subglutinans</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>	(Rheeder et al., 1990)

A maioria dos trabalhos realizados com controle biológico em pós-colheita tem sido com frutas, principalmente aquelas armazenadas sob baixas temperaturas. Poucos são os trabalhos com grãos mantidos em temperatura ambiente, como ocorre com o café (Kretzchmar, 1991), que é colhido na forma de fruto fresco e sofre processamento, visando, principalmente, à perda de água e das estruturas indesejáveis, sendo o produto final um grão. Há carência de estudos sobre os fungos deletérios à bebida e sua atuação durante o período de

frutificação e pós-colheita. O uso de um agente de biocontrole, neste caso, deveria estar associado ao produto o maior tempo possível.

Existem duas condições básicas para o uso de biocontrole em pós-colheita. Pode-se manejar a microflora natural do ambiente ou introduzir outros microrganismos (Wilson & Wisniewski, 1989). Ainda segundo os mesmos autores, um bom agente de controle biológico deve: a) ser geneticamente estável; b) ser efetivo em baixas concentrações; c) não ser fastidioso; d) ser hábil no desenvolvimento em diversas condições ambientais; e) ser eficaz contra uma ampla gama de patógenos; f) ter crescimento satisfatório em meios baratos; g) ser facilmente transportado e armazenado; h) não produzir metabólitos secundários que possam ser deletérios a humanos; i) ser resistente a pesticidas; j) ser compatível com outros tratamentos químicos e físicos do produto e k) não ser patogênico ao hospedeiro.

Com base nos critérios, *Cladosporium* pode ser considerado, em uma análise inicial, como um potencial agente antagonista de fungos prejudiciais à qualidade do café.

A seleção e o isolamento do antagonista constituem as fases mais importantes quando se busca um agente de controle biológico (Wilson & Chalutz, 1989). No caso do biocontrole em frutos, o agente de controle biológico pode ser buscado tanto no próprio fruto quanto na filosfera da planta, que apresenta um ambiente geralmente semelhante. Deve-se proceder a um amplo isolamento de microrganismos potenciais, teste *in vitro* simples para a seleção inicial e aprofundamento dos testes nos microrganismos com melhor potencial.

Os mecanismos de interação antagonista entre microrganismos patogênicos e fungos antagonistas com a planta são semelhantes às interações em pós-colheita e podem ser divididos em antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro.

A antibiose baseia-se na produção de substâncias com efeito fungicida ou fungistática, bactericida e nematicida. Essas substâncias são produzidas pelos organismos antagonistas como um mecanismo de proteção à sua sobrevivência, diante dos demais microrganismos existentes na microflora que ocupa. Embora exista essa divisão, um agente antagonista pode atuar por meio de um ou mais mecanismos e, quando se tem esta condição, maiores são as chances de êxito no controle.

Dentre os mecanismos de atuação de *Cladosporium cladosporioides*, a competição, que se refere à interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação, é o mais provável, devido à sua ampla faixa de adaptação natural e também à sua rápida capacidade de colonizar o substrato. No entanto, a antibiose, que é a inibição dos microrganismos pela ação de um ou mais metabólitos produzidos por outro organismo, também pode estar envolvida.

Entre os microrganismos produtores de antibióticos e utilizados no controle biológico de doenças de plantas, tem-se o *Bacillus subtilis* (Sanhueza, 1987), bactéria que produz enorme gama de antibióticos, tais como micosubtilina, bacillomicina, bacilizina e funginicina e bulbiformina os quais exibem a capacidade de inibir vasta gama de bactérias e fungos fitopatogênicos (Dunleavy, 1955).

Por sua vez, os fungos do gênero *Trichoderma* spp. também produzem antibióticos de vários tipos, porém, nem todas as espécies de fungos têm ação de antibiose, pois se valem de outros mecanismos no biocontrole de plantas (Sanhueza, 1991).

Um dos mais famosos produtos de uso comercial para o controle da galha da coroa das rosáceas é derivado de bactérias do gênero *Agrobacterium*. Neste caso, a bactéria *A. radiobacter* produz uma substância antibiótica chamada bactericina, que é capaz de controlar a *A. tumefaciens*.

O mecanismo de parasitismo ou hiperparasitismo por microrganismos consiste na degradação da parede celular ou de estruturas de resistência dos fungos fitopatogênicos, com posterior penetração no fungo e absorção do conteúdo celular (Chet, 1987, 1990). Elad et al. (1982) demonstraram que as enzimas celulase e beta 1-3 glucanase são produzidas por *Trichordema* spp., quando o fungo hiperparasita a parede celular de *Pythium* sp. e que enzimas, como quitinase e beta 1-3 glucanase, são produzidas quando o fungo é colocado em presença de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfii*. Este mecanismo também parece estar relacionado com o fungo *Cladosporium cladosporioides*, em relação a fungos associados a frutos de café.

A competição é praticamente o mecanismo que coordena a existência de todos os demais mecanismos de biocontrole, pois, o que leva um microrganismo a controlar outro é exatamente a necessidade de sobrevivência em determinado habitat e essa competição confere, muitas vezes, o equilíbrio entre a população de patógenos.

O fenômeno do controle biológico por meio da competição envolve, principalmente, a disputa por nutrientes e espaço. A velocidade de crescimento, bem como a eficiência na absorção de determinadas formas de carbono, nitrogênio e outros nutrientes minerais, determina a sobrevivência dos microrganismos em alguns ambientes, assim como a sucessão de populações

(Paulitz, 1990) citam também a existência de compostos voláteis produzidos, tanto por microrganismos quanto pelas plantas, os quais podem atuar tanto inibindo como estimulando a germinação e o desenvolvimento de patógenos fúngicos, sendo este um importante mecanismo de controle dos fungos de solo.

Leong (1986) demonstrou a existência de um composto denominado sideróforo, produzido por *Pseudomonas fluorescens*, o qual apresenta efeito

quelante por Fe^{+3} . O sideróforo torna o ferro indisponível aos demais microrganismos que não disponham dos mecanismos de quelatinação.

Lockwood (1984) faz uma séria crítica ao controle biológico utilizado atualmente, ou seja, ele discorda do uso de apenas um único microrganismo no processo de biocontrole. Na natureza, o que ocorre é uma interação de várias populações microbianas e, muitas vezes, os organismos envolvidos não passam de saprófitas e que, de maneira direta, competem por espaço e nutrientes, tanto no solo, como na rizosfera e no filoplano.

Windels & Lindow (1985) relatam o caso do *coffee berry disease*, ou CBD do cafeeiro, causado por *Colletotrichum coffeanum* e ainda inexistente no Brasil. Nos países onde a doença ocorre, foi observado que as aplicações de fungicidas, em especial os cúpricos, aumentavam a incidência e a severidade da doença. Esse fato foi explicado com base na observação de que o controle biológico de *Colletotrichum* era devido, principalmente, à competição por nutrientes (em especial açúcares) com a microflora natural (leveduras) das folhas.

Em concordância com as observações acima, Tokeshi (1991) afirma que, somente retornando a um equilíbrio tanto ao nível de nutrição, como ocorre nos centros de origem ou mesmo florestas, assim como o restabelecimento de uma micloflora estável e competitiva, é que se poderão obter resultados satisfatórios no controle biológico de doenças. Desse modo, o manejo integrado de todos os fatores de controle é de vital importância para a manutenção e o retorno do equilíbrio biológico perdido.

2.5 Produtos naturais e biodiversidade

A busca por novos produtos para as indústrias farmacêuticas e agroquímicas é um processo que requer otimização contínua. A química combinatória e os ensaios em larga escala (“high-throughput screening” ou HTS)

têm revolucionado os processos de descoberta de fármacos nas indústrias farmacêuticas, em que os programas envolvendo produtos naturais perderam ênfase. Entretanto, como o impacto esperado dessas novas tecnologias na produtividade não tem sido materializado (Newman, 2003), os produtos naturais permanecem como a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novos fármacos (Harvey, 2000) e como importante ferramentas para o entendimento da lógica de rotas biossintéticas (Clardy & Walsh, 2004).

Os produtos naturais têm várias vantagens que justificam sua importância para a descoberta de novos fármacos, entre elas:

- enorme diversidade química com complexidade estrutural e potência biológica (Verdine, 1996);
- diversas fontes de produtos naturais são ainda pouco exploradas, em que novas estratégias de descoberta podem levar a novos compostos bioativos (Henkel et al., 1999);
- pesquisa com produtos naturais tem levado à descoberta de novos mecanismos de ação de fármacos (Urizar et al., 2002);
- são poderosas ferramentas bioquímicas, servindo como guia para a biologia molecular e química e a investigação das funções celulares;
- podem guiar o desenho de novos compostos sintéticos (Breibauer et al., 2002).

A diversidade de grupos funcionais e a arquitetura das moléculas obtidas nos produtos naturais durante os processos de biossíntese contribuem com a síntese e a química medicinal nas estratégias para a busca de compostos bioativos e também para a busca de ligantes seletivos de alvos celulares (Clardy & Walsh, 2004).

Comparando-se as principais fontes fornecedoras de compostos protótipos de novos fármacos (síntese orgânica, produtos naturais, química combinatória e coleções virtuais de compostos), a mais ampla diversidade química está associada às substâncias de origem natural (Harvey, 2000).

Com a contínua necessidade de novos protótipos para ensaios contra um número crescente de alvos moleculares, a diversidade química dos produtos naturais permanece altamente relevante para a descoberta de produtos (Harvey, 2002), uma vez que a natureza está continuamente desenvolvendo a sua versão de química combinatória, fornecendo estruturas ricas em estereoquímica, anéis concatenados e grupos funcionais reativos (Verdine, 1996). Contudo, a complexidade de muitos produtos naturais pode limitar as características para as modificações químicas que venham otimizar a obtenção de novos compostos bioativos (Clardy & Walsh, 2004).

É indiscutível que os produtos naturais desempenham papel fundamental nos processos de busca de novos protótipos e, como exemplo, podem-se citar as estatinas, medicamentos mais vendidos atualmente, os anti-hipertensivos antagonistas da angiotensina e inibidores da enzima conversora de angiotensina, ampla variedade de imunossuppressores e também a grande variedade de agentes antineoplásicos e antimicrobianos disponíveis no mercado que fazem parte de substâncias desenvolvidas a partir de produtos naturais (Cragg & Newman, 2005).

Atualmente, pesquisadores de produtos naturais têm voltado a atenção para fontes ainda pouco investigadas, como microrganismos marinhos, extremofílicos e endofíticos (Cragg & Newman, 2005). Associadas aos processos de identificação e ao cultivo desses microrganismos encontram-se novas técnicas de isolamento e identificação, bem como a manipulação das condições de cultivo para a obtenção de compostos bioativos.

2.6 Antimicrobianos produzidos por fungos

Produtos naturais são metabólitos derivados naturalmente de microrganismos, plantas ou animais. Há séculos esses produtos vêm sendo explorados pelo homem, sendo as plantas a principal fonte de compostos utilizados na medicina (Strobel & Dayse, 2003). Por conta de sua diversidade e complexidade estrutural, os produtos naturais são de grande importância na farmacologia e biotecnologia, podendo também ser utilizados como modelo de síntese e semissíntese de moléculas bioativas de amplo espectro e baixa toxicidade (Demain, 2006; Gullo et al., 2006). O exemplo mais conhecido entre os produtos naturais são os antibióticos. Na “era dourada dos antibióticos“ dos anos 1940 aos anos 1970, destacou-se a descoberta da penicilina, por Alexandre Fleming, em 1928 e por sua produção por Chain e Florey, em 1940 (Demain, 2000).

Os microrganismos, em especial os fungos, são conhecidos pela sua capacidade metabólica de produzir grande diversidade de moléculas bioativas. Essas substâncias, por sua vez, podem ser altamente tóxicas, por exemplo, as micotoxinas ou ser bastante úteis por poderem ser utilizadas como fármacos de uso em várias patologias.

Essa dicotomia de funções é consequência da grande diversidade de compostos químicos que os fungos produzem (Pinto et al., 2002).

Em 1994, dos vinte medicamentos mais vendidos, representando um mercado de aproximadamente 6,7 bilhões de dólares, seis deles foram obtidos *in natura* ou por transformação química de metabólitos provenientes de fungos. Dentre os medicamentos de maior repercussão terapêutica para doenças infecciosas destacam-se os antibióticos penicilina e cefalosporina, como os mais conhecidos de produtos de fungos (Singh & Barrett, 2006).

Recentemente, a pesquisa por produtos naturais tem perdido a popularidade na maioria das campanhas de medicamentos e, em alguns casos, tem sido substituída pela síntese química (Bills et al., 2002; Peláez, 2006).

Essa diminuição de interesse pode ser atribuída ao enorme esforço e aos altos custos que são requeridos na obtenção, na elucidação das estruturas e no desenvolvimento de medicamentos originados de produtos naturais. O tempo estimado desde o descobrimento até o lançamento de uma nova droga no mercado é de, aproximadamente, 10 anos, acarretando um gasto de mais de 800 milhões de dólares (Reichert, 2003; Dickson & Gagnon, 2004).

Como solução desse problema, a bioprospecção de metabólitos bioativos deve ser melhorada, com a utilização de novas tecnologias e alternativas, como engenharia genética e biossíntese mutacional, além da identificação mais rápida das moléculas, de forma economicamente viável (Butler, 2004; Weist & Sussmuth, 2005).

Os fungos endofíticos se destacam como grandes produtores de metabólitos secundários (Gunatilaka, 2006). Schulz et al. (2002) relatam a importância da pesquisa dos metabólitos desses microrganismos, pois, em comparação com fungos obtidos de outros substratos, relativamente poucos metabólitos têm sido isolados de fungos endofíticos.

Além disso, 51% das substâncias já estudadas são compostos inéditos, enquanto da microbiota do solo, apenas 38% eram novas. A procura por novos habitats e a diversidade fúngica são fatores importantes na busca por produtos naturais e, conseqüentemente, no desenvolvimento de novas drogas.

Fungos endofíticos podem conferir resistência à planta contra herbivoria por meio de dois mecanismos principais: 1) estímulo direto do vigor da planta e 2) produção de metabólitos que aumentam a resistência à herbivoria (Clay et al., 1993) *Neotyphodium*, por exemplo, é um endófito de *Festuca aerundinacea* que beneficia seu hospedeiro, aumentando a tolerância à seca (White Júnior et al.,

2002), o crescimento da raiz, a produção de sementes, a germinação, a captação de fósforo e a resistência a nematoides e insetos (Panaccione et al., 2001).

Clay & Schardl (2002) também estudaram endófitos de *F. aerundinacea* e outras gramíneas de clima temperado, observando que esses fungos são transmitidos verticalmente, por meio de sementes. Os endófitos colonizam a planta como um todo e o hospedeiro recebe proteção contra herbivoria, pela produção de toxinas alcaloides por esses endófitos. Tal é a eficiência dos endófitos na proteção de seus hospedeiros, que alguns autores relatam a preferência dos herbívoros à ingestão de plantas e/ou folhas que não contêm endófitos (Clay et al., 2002).

Outra característica interessante a respeito dos fungos endofíticos é a promoção de crescimento vegetal pela síntese de fitormônios e fixação de nitrogênio (Peixoto et al., 2002). White Júnior et al. (2002) acreditam que fungos produtores de hormônios de crescimento vegetal o fazem para modificar a fisiologia e a estrutura da planta, visando à extração de nutrientes para si. No trabalho de Varma et al. (1999), os autores estudaram o basidiomiceto *Piriformospora indica*, um endófito de raiz e afirmam a capacidade desse endófito em promover o crescimento vegetal de *Zea mays*, *Nicotiana tabaccum* e *Petroselinum 19 crispum* L., uma vez que a inoculação do fungo nessas plantas favorece o aumento de biomassa e, conseqüentemente, o crescimento vegetal.

A produção de enzimas também é citada na literatura como uma característica expressa por fungos endofíticos. Uma vez que a planta é colonizada por endófitos, ocorre a resposta de defesa bioquímica induzida, com a produção de altos níveis de peroxidases, H_2O_2 , fenilalanina amônio liases (FAL), proantocianidinas e fenilpropanoides, como ocorre na colonização da planta com *Cladosporium fulvum*, analisado por Osbourn (2001). Essa produção de enzimas em resposta à colonização do endófito pode ter um papel

fundamental na limitação de crescimento do endófito e/ou patógeno e na virulência dos mesmos (Boyle et al., 2001; Schulz & Boyle, 2005).

A interação de um fungo com seu hospedeiro vegetal varia e depende do modo pelo qual o fungo infecta seu hospedeiro e da extensão da resposta de defesa da planta. A colonização pode ser sistêmica ou local, inter ou intracelular. Os fungos endofíticos, que colonizam seus hospedeiros assintomaticamente (Boyle et al., 2001; Araújo & Azevedo, 2006), são fortes candidatos ao controle biológico de fitopatógenos, por ocuparem o mesmo nicho ecológico destes. Tal é a importância dessa característica dos endófitos que pesquisadores no mundo todo têm mostrado que os endófitos fornecem ao seu hospedeiro defesa efetiva contra patógenos (Clay, 2004). Arnold et al. (2003) estudaram a resposta de plantas de cacauete axênicas (isentas de microrganismos) inoculadas com endófitos do próprio hospedeiro e com o patógeno *Phytophthora* sp.

Os autores observaram que as plantas inoculadas com os endófitos apresentaram menos necrose e mortalidade das folhas, se comparadas aos controles, inoculados apenas com o patógeno. Os autores também relataram maior eficiência da proteção em folhas velhas, se comparadas às jovens, o que pode ser explicado pela existência de inúmeros metabólitos secundários sendo produzidos em folhas maduras.

Segundo Schulz & Boyle (2005), aproximadamente 80% dos fungos endofíticos produzem compostos biologicamente ativos (antibacterianos, fungicidas e herbicidas). Liu et al. (2001) estudaram a atividade antifúngica de fungos endofíticos isolados de *Artemisia annua* sobre os fitopatógenos *Gaeumannomyces graminis*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Phytophthora capsici*, *Helminthosporium sativum* e *Gerlachia nivalis*, encontrando isolados com ação inibidora para todos os patógenos avaliados.

Aproximadamente 7,5% do total de endófitos isolados de *Ulex europaeus* e *U. gallii* foram promissores na produção de antibióticos,

destacando-se *Conyothyrium* e *Microsphaeropsis* como maiores produtores (Fisher et al., 1986). Além da produção de vinte antimicrobianos, fungos endofíticos podem excluir patógenos que ocupem o mesmo nicho ecológico, por competição, como relatado por Bao & Lazarovits (2001) com *Fusarium*. Tendo em vista a extensa lista de trabalhos publicados envolvendo a capacidade de endófitos antagonizarem fitopatógenos, além da grande quantidade de fungos ainda a serem descritos, é provável que, nos próximos anos, muitos outros metabólitos e outras substâncias de interesse produzidas por endófitos venham a ser descobertas e descritas.

Segundo Osbourn (2001), apenas uma pequena proporção de fungos é apta a colonizar o interior das plantas. E, quando existe essa aptidão, fungos e bactérias penetram e colonizam seu hospedeiro tão sutilmente que se torna necessária a utilização de microscopia para observá-los (Bernstein & Carroll, 1977).

As interações entre plantas e microrganismos já são conhecidas há muito tempo. Porém, com exceção das associações micorrízicas, sempre foi dado um enfoque fitopatológico para essas interações. Atualmente, sabe-se que praticamente toda planta é colonizada por microrganismos.

Endófitos são todos os microrganismos, cultiváveis ou não, que habitam o interior das plantas, não causando dano ao hospedeiro, nem estruturas externas, excluindo-se desse grupo bactérias noduladoras e fungos micorrízicos (Azevedo & Araújo, 2006). A ideia de que esses microrganismos poderiam conferir características de interesse à planta fez com que o interesse em estudar esses seres aumentasse muito, nos últimos vinte anos (Araújo et al., 2002).

O conhecimento da comunidade endofítica começa com o isolamento e a caracterização desses microrganismos (Araújo et al., 2002), com consequente estudo da diversidade de espécies e gêneros que compõem a comunidade.

Uma vez conhecida a diversidade da comunidade, o programa de buscas por novos compostos ativos é uma alternativa promissora (Peláez et al., 1998). Os resultados obtidos por Arnold et al. (2003) indicam que folhas ou plântulas de cacau em fase de emergência não apresentam endófitos cultiváveis. Porém, quando as plantas são molhadas pela chuva, orvalho ou névoa, os microrganismos se tornam aptos a penetrar a planta e colonizá-la persistentemente como endófitos, sem causar dano aparente.

Endófitos são distintos dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Várias espécies de fungos endofíticos são conhecidas, por serem taxonomicamente relacionadas a patógenos virulentos dos mesmos hospedeiros relacionados, podendo refletir em recente especiação.

Exemplificando, em pinheiros, os endófitos *Lophodermium pinastri* e *L. conigenum* pertencem ao mesmo gênero do patógeno *L. seditiossum*. Os patógenos *Rhodoctone weirii* e *R. pseudotsugae* são taxonomicamente relacionados a *R. parkieri*, que é um endófito de Douglas-fir. O anamorfo de *R. parkieri*, *Meria*, é morfológicamente idêntico e, provavelmente, um parente próximo de *Meria laricis*, um patógeno de *Larix* spp.

Existe uma série de razões para que se aprofundem os estudos com endófitos. Primeiro, a falta de informações para elucidar a base biológica dessas interações. Segundo, porque os endofíticos são vantajosos, visto que muitos benefícios para a planta têm sido atribuídos à presença deles. Entre eles, vários endófitos são capazes de produzir antibióticos e outros metabólitos secundários de interesse farmacológico (Fisher, 1986; Azevedo, 1998; Peixoto Neto et al., 2002; Azevedo & Araújo, 2006); têm sido utilizados como agentes de controle biológico de pragas e doenças, como bioerbicidas, como vetores para a introdução de genes em plantas hospedeiras e conferem proteção à herbivoria (Clay et al., 2003, Azevedo et al., 2000) também promovem crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios (Varma et al., 1999; Peixoto Neto et al.,

2002; Schulz & Boyle, 2005) e fornecem tolerância ao estresse para seus hospedeiros (Boyle et al., 2001).

Em gramíneas do gênero *Festuca* e *Lolium*, a herbivoria causada por *Spodoptera frugiperda* pode ser reduzida pela colonização da planta pelo endófito *Acremonium* spp. (Clay et al., 1993). Besouros “elm bark” dispensam árvores que sejam colonizadas por *Phomopsis oblonga*; quando esses besouros são forçados a cruzarem em ramos colonizados por esse endófito em laboratório, poucas progênies emergem dos ramos. Fisher, et al., 1986 estudaram a produção de antibióticos por endófitos isolados de *Ulex europaeus* e *U. gallii*, encontrando quatro produtores de antibióticos, dentre os 25 isolados analisados.

Os microrganismos constituem fáceis materiais para manipulação em laboratório. Nos últimos anos, novas abordagens metodológicas, principalmente de genética molecular, têm sido muito úteis na geração de um quadro mais completo sobre a ecologia microbiana em um dado hábitat

2.7 Produção de metabólitos por espécies do fungo *Cladosporium*

De acordo com relatos de vários trabalhos, muitas espécies de fungos são capazes de causar antibiose a outros organismos fitopatogênicos, por meio da síntese e da excreção de metabólitos de natureza tóxica.

Sabe-se que fungos antagonistas, como espécies de *Cladosporium*, são descritos como hiperparasitas de microrganismos como *Puccinia horiana*, *U.appendiculatus* e *Cronartium flaccidum* (Assante et al., 2004) e estes vêm sendo utilizados no controle biológico de patógenos de plantas. Ainda que as observações microscópicas indiquem que *Cladosporium* sp. atua como um hiperparasita, não se descarta a possibilidade de que o antagonismo deste fungo também pode estar envolvido em outros mecanismos, como a produção de antibióticos, metabólitos tóxicos e produção de enzimas.

Vários dos microrganismos utilizados como agentes de controle biológico produzem metabólitos secundários que afetam o crescimento e a germinação mediante a produção de antibióticos e/ou enzimas que degradam a parede celular. Dentre os compostos produzidos por fungos, tem-se como objeto de estudo o cladosporol, substância sintetizada principalmente por espécies de *Cladosporium*.

De acordo com levantamentos bibliográficos, pode-se perceber que são escassos os trabalhos que relatam a produção do metabólito cladosporol. As bases de dados consultadas foram Scopus, Scfinder e Google Acadêmico, extraídas ou relacionadas no portal da CAPES.

No trabalho de Nassini et al. (2004), verificou-se que *Cladosporium tenuissimum*, produtor do cladosporol (C₂₀H₁₆O₆), conhecido como um inibidor da biossíntese de glucana nas concentrações de 12,5 e 100 ppm, inibiu a germinação e o crescimento micelial de vários fungos

Outro trabalho relacionado com a síntese de metabólito foi o isolamento de cladosporol a partir da fermentação do caldo de *Alternaria alternata var.* Foram investigados os efeitos de cladosporol antitumoral *in vitro* e *in vivo*. O crescente efeito inibitório do cladosporol *in vitro* contra seis linhagens de células humanas de câncer foi examinado.

Os resultados mostraram que cladosporol matou seletivamente as células cancerosas e teve importante efeito inibitório sobre o ser humano; *in vivo*, cladosporol também mostrou atividade antitumoral em camundongos portadores de câncer gástrico. Estes resultados sugerem que o cladosporol também tem efeitos potencialmente úteis inibitórios sobre as linhagens de células de carcinoma gástrico.

Sakagami (1995) isolou cladosporol (1) do filtrado da cultura de *Cladosporium cladosporioides*. Cladosporol demonstrou um inibidor da

biossíntese de β -1, 3 glucanos e a sua estrutura foi determinada por análise espectroscópica.

Uma série de compostos pentacíclicos, incluindo os principais metabólitos com a produção de citocinas e tirosina quinase com propriedades inibitórias, foi recentemente isolada de *Cladosporium cladosporioides* (Wrigley et al., 2001). Em um programa de triagem dedicado a encontrar novos e promissores compostos inibidores, como topoisomerase I, foi investigada a possibilidade de biotransformação dos derivados de cladosporol (Sakagami et al., 1995), a partir da cultura de *C. cladosporioides*.

Neste trabalho relatam-se dois casos da produção de cladosporol 1 fornecendo cladosporol 3 e acompanha a biotransformação de cladosporol de 3 a cladosporol 4. Isolados de *Cladosporium tenuissimum* foram selecionados e testados quanto à sua capacidade de inibir a germinação *in vitro* de *Cronatium flaccidum* e *Peridermium pini*. A germinação da ferrugem realizada em lâminas contendo água-ágar foi reduzida em 12, 18 e 24 horas, quando uma suspensão de conídios ($1,5 \times 10^7$ conídios/ml) dos isolados de *Cladosporium tenuissimum* foi adicionada. Quando as suspensões de conídios de ferrugens foram incubadas por 1, 11, 21 e 31 dias, a viabilidade foi reduzida a 20° e 4°C. Luz e microscopia ótica e eletrônica de varredura mostraram que os esporos da ferrugem foram diretamente parasitados por *Cladosporium tenuissimum* e que o antagonista desenvolveu várias estratégias para quebrar a parede do esporo e ter acesso aos tecidos subjacentes. A penetração ocorreu com ou sem apressórios. O hiperparasita exerceu uma força mecânica para destruir as estruturas de esporos por contato direto, penetrou nos aeciosporos e, posteriormente, proliferou dentro deles. No entanto, uma ação enzimática também esteve envolvida. Isto foi mostrado pela dissolução da parede celular do hospedeiro e pelo mínimo de inchaço na ponta infectando hifas. Filtrados da cultura do hiperparasita inibiram

a germinação de propágulos de ferrugem. O cladosporol purificado a partir do filtrado foi caracterizado por análises químicas e espectroscópicas. Os resultados indicaram que, nos diferentes meios de cultura BDA, MPGA e BDA+glicerol, com diferentes extratores (Hex, AcOEt e Me(OH)), a produção do cladosporol para cada isolado ocorreu em quantidades diferentes, tendo, no meio de cultura MPGA, a síntese do metabólito sido maior

2.8 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

Paralelamente ao desenvolvimento e à descoberta de novos fármacos antimicrobianos, foi observado um uso crescente desses agentes no tratamento de um número cada vez maior de infecções microbianas. Esta situação levou à necessidade de se utilizarem métodos para testar os agentes antimicrobianos *in vitro*, a fim de prever a sua atividade *in vivo* (Murray et al., 2002).

A atividade antimicrobiana é medida *in vitro* para determinar a potência do agente antimicrobiano em solução e a concentração nos líquidos ou tecidos conhecida do fármaco. A determinação dessas quantidades pode ser efetuada por dois métodos principais: diluição ou difusão. Ao utilizar um microrganismo padrão apropriado para teste e uma amostra conhecida do fármaco para comparação, esses métodos podem ser empregados para estimar a potência do antibiótico na amostra ou a sensibilidade do microrganismo (Brooks et al., 2000).

Os testes de diluição permitem a obtenção de resultados quantitativos, indicando a concentração de determinado fármaco necessário para inibir (ou inviabilizar) os microrganismos testados. Os testes de difusão envolvem o cultivo de papel de filtro contendo os antibióticos (Souza et al., 2003).

O método de diluição pode ser realizado em meios de cultura líquidos ou sólidos. Consiste em preparar sucessivas diluições do antimicrobiano, semeando, frente a cada diluição, o inóculo microbiano em número padronizado e, após a

incubação, verificar a menor concentração do antimicrobiano que inibiu a multiplicação do microrganismo. Esta concentração é chamada inibitória mínima (CIM) (Souza et al., 2003).

As concentrações nas quais não existe multiplicação microbiana podem ser ressemeadas em meios isentos do antimicrobiano para determinar se houve nelas um efeito microbicida (falta de crescimento na subcultura) ou microbiostático (crescimento a partir das concentrações em que o microrganismo foi inibido) (Mims et al., 1999).

Entre os numerosos fatores que afetam a atividade antimicrobiana *in vitro*, é necessário considerar os seguintes aspectos: pH do meio, composição do meio, estabilidade do fármaco, tamanho do inóculo, tempo de incubação e atividade metabólica dos microrganismos, uma vez que eles influenciam significativamente o resultado dos testes (Brooks et al., 2000).

2.9 Diluentes utilizados na extração de metabólitos

2.9.1 Solventes orgânicos

A grande maioria das reações químicas é realizada em solução. O veículo cumpre várias funções durante uma reação química, o que facilita as colisões entre os reagentes (s), que deve ocorrer com o fim de transformar o reagente (s) em produto (s). O veículo também oferece um meio de controle de temperatura, tanto para aumentar a energia da colisão de partículas a fim de que eles reajam mais rapidamente, como para absorver o calor gerado durante a reação exotérmica. A seleção de um solvente adequado é guiada pela teoria e experiência. Geralmente, um bom solvente deve satisfazer aos seguintes critérios:

- deve ser inerte às condições de reação.;
- deve dissolver os reagentes e reagentes;

- deve ter um ponto de ebulição adequado;
- deve ser facilmente removido no final da reação.

O segundo critério invoca o adágio "Como se dissolve como". Reagentes não-polares se dissolvem em solventes não-polares; reagentes polares se dissolvem em solventes polares. Há três medidas da polaridade de um solvente:

1. momento de dipolo;
2. constante dielétrica;
3. miscibilidade com água.

Moléculas com grandes momentos de dipolo e altas constantes dielétricas são considerados polar. Aqueles com baixos momentos dipolares e constantes dielétricas pequenas são classificados como não-polares.

Se denomina solvente, dissolvente ou dispersante aquela substância que permite a dispersão de outra substância em seu meio. Normalmente, o dissolvente estabelece o estado físico da dissolução. Por isso, se diz que o dissolvente é o componente de uma dissolução que está no mesmo estado físico que a dissolução.

Respeita-se a regra de polaridade das moléculas, em que solvente polar dissolve molécula polar e solvente apolar dissolve molécula apolar. Quando uma certa substância (orgânica por exemplo) tem dois grupos distintos que diferem nas características de polaridade, observa-se qual prevalece e o solvente será semelhante a esse. Mas, a interação entre o solvente e o soluto (ou disperso) está relacionada à diferença (ou ausência) de disputa entre as partes polares e apolares.

A maioria dos solventes é de origem orgânica (benzeno, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol, etanol etc.). São substâncias capazes de dissolver outras substâncias e formar uma solução, sendo utilizadas como

diluentes, dispersantes ou agentes de solubilização. Como características comuns a todos esses solventes, pode-se citar que são todos voláteis, inflamáveis, lipossolúveis e lipofílicos. A sua toxicidade varia conforme a molécula ou a mistura utilizada, tendo uma aplicação variada em nosso cotidiano. Didaticamente, são divididos em hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos ou halogenados, alcoóis, cetonas, éteres e outros (Holtz, 2008).

2.9.2 Toxicidade do solvente orgânico

Uma das formas mais simples de se verificar a toxicidade de um solvente em relação a um determinado microrganismo é a medida do crescimento do mesmo em meio bifásico, com esse solvente como a segunda fase. O efeito tóxico do solvente pode ser devido a dois processos: um resultante da difusão de moléculas de solvente por meio da membrana citoplasmática (toxicidade molecular) e outro associado ao contato entre o biocatalisador e o solvente orgânico (toxicidade de fase) (Lima, 1998). Portanto, o grau de utilidade dos solventes orgânicos é proporcional ao cuidado que eles exigem.

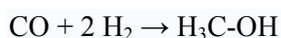
2.9.3 Alguns solventes utilizados para reações orgânicas

Nome	Estrutura	pb, °C	Momento de dipolo	Constante dielétrica
água		100	1,85	80
metanol		68	1,70	33
etanol		78	1,69	24,3
acetato de etila		78	1,78	6,02
dimetil sulfóxido (DMSO)		189	3,96	47,2

Metanol

O metanol, também conhecido como álcool metílico, é um composto químico com fórmula química CH_3OH . É líquido, inflamável, possui chama

invisível, fundindo-se a cerca de -98°C . Também conhecido como álcool da madeira, pode ser preparado pela destilação seca de madeiras, seu processo mais antigo de obtenção e de onde, durante muito tempo, foi obtido exclusivamente.



É, principalmente, um solvente industrial, pois ele dissolve alguns sais melhor do que o etanol; é utilizado na indústria de plásticos, na extração de produtos animais e vegetais e como solvente em reações de importância farmacológica, como no preparo de colesterol, vitaminas e hormônios. É matéria-prima na produção de formaldeído e utilizado no processo de tranterificação da gordura, para produzir biodiesel (Saffioti, 1968).

O etanol, também chamado de álcool etílico, álcool puro, álcool de cereais ou álcool, é volátil, inflamável e incolor. É uma das mais antigas drogas recreativas. No uso comum, é, muitas vezes, referida apenas como álcool.

É um álcool de cadeia linear e sua fórmula molecular é $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Sua fórmula empírica é $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$. Uma notação alternativa é $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$, o que indica que o carbono de um grupo metil (CH_3 -) está ligado ao carbono do grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), que está ligado ao oxigênio de um grupo hidroxila ($-\text{OH}$). É constitucional isômero do éter dimetílico e apresenta ampla utilização como solvente de substâncias destinadas ao consumo ou ao contato humano, incluindo perfumes, aromas, corantes e medicamentos. Em química, é um tanto solvente e matéria-prima essencial para a síntese de outros produtos.

Acetato de etila

O acetato de etila é da família dos ésteres, tem alto poder de solvência e é muito utilizado como solvente polar. É um líquido, límpido, incolor e com o odor forte e frutal, obtido pela reação do ácido acético com o etanol. Possui médio ponto de ebulição em 77°C , ponto de fulgor de -4°C e temperatura de

autoignição de 426°C. A fórmula química é $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, o peso molecular é 88 e o nome químico é etanoato de etila.

É um éster que é sintetizado do ácido acético e metanol na presença de ácidos fortes, tais como o ácido sulfúrico (com o objetivo de absorver a água e deslocar o equilíbrio no sentido da produção do éster) numa reação de esterificação.

Dimetil sulfóxido

O DMSO é um composto químico orgânico de fórmula $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ (Rosenbaum, 1965), peso molecular 78 (Carpenter, 1994) e temperatura de congelamento 18,5°C (Brayton, 1986). A elevada capacidade higroscópica decorre da sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que as formadas entre moléculas de água. Isso faz com que o DMSO puro passe rapidamente para a concentração entre 66%-67%, se for deixado exposto ao ar ambiente (Brayton, 1986), razão pela qual deve ser mantido em frasco hermeticamente fechado

Uma reação exotérmica é verificada quando o DMSO administrado topicamente reage com a água do ar e dos tecidos (Brayton, 1986). Essa particularidade química tem relação com várias propriedades da droga e com sua capacidade solvente, em particular sobre o acrílico e o poliuretano (Rosenbaum 1965), exigindo, assim, cuidados para não reagir com bandagens, paramentos e equipamentos confeccionados com esses materiais. É um subproduto da fábrica de papel (Rosenbaum, 1965). Na Europa, é obtido a partir do carvão e do petróleo (Briton, 1982). Sua extrema capacidade de penetração e difusão há muito levou a ser incluído como veículo componente de defensivos agrícolas (Rosenbaum, 1965).

Dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto muito utilizado como solvente aprótico e polar em laboratório e na indústria, com fórmula $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. É produzido pela oxidação do dimetilsulfureto (DMSO ou sulfeto de dimetila).

Já foram verificadas mais de trinta propriedades farmacológicas e terapêuticas do DMSO, as quais resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas, sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (Sojka et al., 1990). Essas propriedades garantem seu reconhecimento como droga das mais versáteis. Por outro lado, desde que foi introduzido como medicamento, o DMSO tem gerado polêmica no meio científico, dividindo opiniões, uma vez que a sua avaliação exata torna-se extremamente difícil, pelas inúmeras e complexas variáveis envolvidas.

Devido à intensa capacidade de penetração, muitas substâncias, quando associadas ao DMSO, podem ser carregadas através das membranas (Brayton, 1986; Blythe et al., 1986).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. A. P.; OLIVEIRA, L. S.; MORAES-SANTOS, T.; GLÓRIA, M. B. A. Café e saúde: três décadas de estudos. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, n. 4, p. 56-63, 2003. Especial Café.

ALVES, E. **População fúngica associadas ao café (*Coffea arabica* L.) beneficiado e às fases pré e pós colheita**: relação com a bebida e local de cultivo. 1996. 48 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ALVES, E.; CASTRO, H. A. de. Fungos associados ao café (*Coffea arabica* L.) nas fases pré e pós-colheita em lavouras da região de Lavras. **Summa Phytopatologica**, Jaguariúna, v. 24, n. 1, p. 4-7, jan./mar.1998.

ALVES, V. M. C.; VASCONCELLOS, C. A.; FREIRE, F. M.; PITTA, G. V. E.; FRANÇA, G. E. de. Sorgo. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. V. H. (Ed.). **Recomendação para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª Aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. p. 325-327.

AMORIM, H. V.; SILVA, D. M. Relationship between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and quality of the beverage. **Nature**, New York, v. 219, n. 27, p. 381-382, July 1968.

ANDRADE, A. V. M. **Efeitos de fontes de carbono na produção da atividade inulase por cladosporium cladosporioides e sua utilização para produção de xarope rico em D-frutose por hidrólise do extrato de alcachofra de Jerusalém**. 1991. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ANDREMONT, A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Infection Control**, Saint Louis, v. 29, n. 4, p. 256-25, Aug. 2001

ARAÚJO, J. M. de; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, n. 4, p. 447-451, 2000.

ASSANTE, G. M.; SARACCHINI, M.; FARINA, G.; MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Hystological studies on the mycoparasitism of *Cladosporium tenuissimum* and urediniospores of *Uromyces appendiculatus*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 2, p. 170-183, Feb. 2004.

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

BARON, E. J.; FINEGOLD, S. M. **Bailey & scott's diagnostic microbiology**. 8. ed. Saint Louis: C. V. Mosby Company, 1990.

BERNSTEIN, M. E.; CARROLL, G. C. Internal fungi in old-growth Douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 55, n. 6, p. 644-653, Mar. 1977.

BILLS, G.; DOMBROWSKI, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J.; AN, Z. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. In: WATLING, R.; FRANKLAND, J. C.; AINSWORTH, A. M.; ISAAC, S.; ROBINSON C. H. (Ed.). **Tropical mycology: micromycetes**. New York: CABI, 2002. v. 2, p. 165-194.

BITANCOURT, A. A. As ferramentas e podridões da cereja do café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, São Paulo, v. 32, n. 359, p. 7-14, jan. 1957.

BOYLE, C.; GOTZ, M.; DAMMANN-TUGEND, U.; SCHULZ, B. Endophyte-host interactions III. Local vs. systemic colonization. **Symbiosis**, Rehovot, v. 31, n. 1, p. 259-281, Mar. 2001.

BOYSEN, M. E.; BJORNEHOLM, S.; SCHNURER, J. Effect of the biocontrol Yeast *Pichia anomala* on interactions between *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum* in moist grain under restricted air supply. **Postharvest Biology and Technology**, Georgia, v. 19, n. 2, p. 173-179, June 2000.

BRADY, S. F.; CLARDY, J. CR 377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 10, p. 1447-1448, Oct. 2000.

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

BREINBAUER, R.; MANGER, M.; SCHECK, M.; WALDMANN, H. Natural product guided compound library development. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 9, n. 3, p. 2129-2145, Dec. 2002.

BROOKS, G. R.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S. **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 524 p.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, Dec. 2004.

CARROLL, G. C.; CARROLL, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 56, n. 24, p. 3034-3043, Dec. 1978.

CARVALHO, V. D. de.; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. de R. Relação entre classificação de café pela bebida e composição físico-química e química do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: Ministério da Indústria e do Comércio/Instituto Brasileiro do Café, 1989a. p. 25-26.

CARVALHO, V. D. de.; CHALFOUN, S. M.; COUTO, A. C.; CHAGAS, S. J. de R.; VILELA, E. R. Efeito do tipo de colheita e local de cultivo na composição físico-química do grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1989, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: Ministério da Indústria e do Comércio/Instituto Brasileiro do Café, 1989b. p. 23-24.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 11, n. 126, p. 79-92, jun. 1985

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A. M.; TEPLow, D. B.; STEVENS, D.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. **Microbiology**, New York, v. 148, p. 2675-2685, Sept. 2002.

CHALFOUN, S. M.; CUNHA, R. L.; CARVALHO, V. L.; NOGUEIRA, D. A. Seletividade de fungicidas cúpricos e sistêmicos sobre o fungo *Cladosporium cladosporioides* em cafeeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 93-95, jan./mar. 2007.

CHAVES, R. C.; PEREIRA, R. T. G.; CASTRO, H. A. Obtenção de isolados de *Cladosporium* com potencial de biocontrole Pós colheita. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS, 15., 2002, Lavras. **Anais....** Lavras: UFLA, 2002. p. 191.

CHET, I. Mycoparasitism: recognition, physiology and ecology. In: BAKER, R.; DUNN, P. **New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases.** New York: Alan R. Liss, 1990. p. 725-783

CHET, I. Trichoderma: application, mode of action, and potential as biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: _____. **Innovative approaches to plant disease control.** New York: J. Wiley, 1987. p. 137-160.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, London, v. 432, n. 7019, p. 829-837, Dec. 2004.

CLAY, K.; MARKS, S.; CHEPLICK, G. P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. **Ecology**, Brooklin, v. 74, n. 6, p. 1767-1777, 1993.

CORRADO, M.; RODRIGUES, K. F. Antimicrobial evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 157-160, Apr. 2004.

CORTEZ, J. G. Aptidão climática para qualidade da bebida nas principais regiões cafeeiras de Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 18, n. 187, p. 27-31, fev. 1997.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 77, n. 1, p. 7-24, Jan. 2005.

DAGLIA, M.; TARSI, R.; PAPETTI, A.; GRISOLI, P.; DACARRO, C.; PRUZZO, C.; GAZZANI, G. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans* adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 6, p. 1225-1229, Feb. 2002.

DEMAIN, A. L. From natural products discovery to commercialization: a success story. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 33, n. 7, p. 486-495, July 2006.

- DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 26-31, Jan. 2000.
- DICKSON, M.; GAGNON, J. P. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 3, n. 5, p. 417-429, May 2004.
- DOGASAKI, C.; SHINDO, T.; FURUHATA, K.; FUKUYAMA, M. Identification of chemical antibacterial components against *Legionella pneumophila* in a coffee beverage. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, Tokyo, v. 122, n. 7, p. 487-494, July 2002.
- DUNLEAVY, J. Control of damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 45, p. 252-258, Mar. 1955.
- ECKERT, J. W.; SIEVERT, J. R.; RATNAYAKE, M. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 78, p. 971-974, July 1994.
- ELAD, Y.; CHET, I.; HENIS, Y. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 28, n. 7, p. 719-725, July 1982.
- ELLIS, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 507p.
- ELLIS, M. B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Surrey: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 507p.
- EZRA, D.; STROBEL, G. A. Effect of substrate on the bioactivity of volatile antimicrobials produced by *Muscodor albus*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 165, n. 6, p. 1229-1238, Dec. 2003.
- FARAH, A.; PAULIS, T.; TRUGO, L. C.; MARTIN, P. R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 5, p. 1505-1513, Feb. 2005.
- FERNANDES, M. C. A. O biofertilizante Agrobio. **Informativo do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia**, Seropédica, v. 4, n.13, p.1-16, set. 2000.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programa e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Botanica Helvetica**, Basel, v. 96, n. 1, p. 37-41, June 1986.

FONSECA, H. **Bioquímica de alimentos**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 249 p.

FREITAS, R. F. **Fungos associados à grãos de café beneficiados de diversos municípios da região sul de Minas Gerais**. 2000. 72 p. Tese (Doutorado em Microbiologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FURUHATA, K.; DOGASAKI, C.; HARA, M.; FURUYAMA, M. Inactivation of *Legionella pneumophila* by phenol compounds contained in coffee. **Journal of Antibacterial and Antifungal Agents**, Tokyo, v. 30, n. 5, p. 291-297, 2002.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in taninins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 371-383, Oct. 1963.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. Antimycotic and antiaflatoxic effect of lactic acid bacteria: a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 11, p. 1275-1280, Nov. 1995.

GULLO, V. P.; MCALPINE, J.; LAM, K. S.; BAKER, D.; PETERSEN, F. Drug discovery from natural products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 33, n. 7, p. 523-531, July 2006.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 69, n. 3, p. 509-526, Mar. 2006.

HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; FORD, E. J.; STROBEL, G. A.; PORCO, J. A.; TOMER, D. P.; ONEILL, K. L.; HEIDER, E. M.; GRANT, D. M. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, Oxford, v. 59, n. 14, p. 2471-2476, Mar. 2003.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 5, n. 7, p. 294-300, July 2000.

HENKEL, T.; BRUNNE, R. M.; MULLER, H.; REICHEL, F. Statistical investigation into the structural of natural products and synthetic compounds. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 38, n. 5, p. 643-647, Feb. 1999.

HOLTZ, A. **A ciência médica de House**. 7. ed. Rio de Janeiro: Best Seller, 2008. 288 p.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 31, n. 2, p. 163-167, Feb. 2001.

KIRK, P. M.; CANNOM, P. F.; DAVID, J. C.; STALPERS, J. A. (Ed.). **Dictionary of the fungi**. London: CABI, 2001. 665 p.

KRETZSCHMAR, A. A. Controle biológico de patógenos que ocorrem em pós-colheita. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa, 1991. p. 53-69.

KRUG, H. P. Cafés duros I. **Revista do Instituto de café do Estado de São Paulo**, Campinas, v. 15, n. 159, maio 1940a.

KRUG, H. P. Cafés duros II. **Revista do Instituto de café do Estado de São Paulo**, Campinas, v. 15, n. 163, p. 1393-1396, set. 1940b.

KRUG, H. P. Cafés duros III. **Revista do Instituto de Café do Estado de São Paulo**, Campinas, v. 15, n. 165, p. 1827-1831, Nov.1940c.

LARANJEIRA, D.; NEVES, R. P.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Efeito de extratos de caroá (*Neoglaziovia variegata*) e sisal (*Agave sisalana*) sobre *Fusarium oxysporum* F. sp. phaseoli. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 2, p.289, ago. 1995a. Suplemento.

LARANJEIRA, D.; NEVES, R. P.; OLIVEIRA, S. M. A.; MENEZES, M. Efeito de extratos de juazeiro (*Zizyphus joazeiro*) e sisal (*Agave sisalana*) sobre *Botryodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 321, ago 1994.

- LEE, S. E.; Fungicidal activity of piperonaline a piperidine alkaloid of cowpea (*Vigna unguiculata*) leaf extracts. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 71, n. 1, p. 45-48, Jan. 2005.
- LEONG, J. Siderohores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 187-209, Sept. 1986.
- LI, J. Y.; STROBEL, G. A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 261-265, May 2001.
- LILLEHOJ, E. B. Evolutionary basis and ecological role of toxic microbial secondary metabolites. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 97, n. 2, p. 325-332, July 1982.
- LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 49-52, jan./fev. 1998.
- LIU, C. H.; ZOU, W. X.; LU, H.; TAN, R. X. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 88, n. 3, p. 277-282, July 2001.
- LOCKWOOD, J. A.; SPARKS, T. C.; STORY, R. N. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. **Bulletin of the Entomological Society of America**, Washington, v. 30, n. 4, p. 41-51, 1984.
- LOPES, L. M. V.; PEREIRA, R. G. F. A.; MENDONÇA, J. M. A.; MENDES, A. N. G. Variação da ocorrência de fungos em grãos de sete cultivares de café (*Coffea arabica* L.) em três épocas durante a colheita. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 25., 1999, Franca. **Anais...** Rio de Janeiro: Procafé, 1999. p. 144-145.
- LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., na endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 67-73, Feb. 2000.
- MARCHI, C. E.; BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V. Proteção induzida por benzotiadiazole contra ferrugem-alaranjada (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 5, p. 1103-1106, set./out. 2002.

MEIRELLES, A. M. A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidades do estado de Minas Gerais.** 1990. 71 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MIMS, C. W.; LILJBKELKE, K. A.; RICHARDSON, E. A. Surface morphology, wall structure, and initial adhesion of conidia of the powdery mildew fungus *Uncinuliella australiana*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 352-358, Dec. 1999.

MOSS, M. O. Mycotoxins. **Mycological Research**, Cambridge, v. 100, n. 5, p. 513- 523, May 1996.

MURRAY, S. O.; KERSTEN, D.; OLSHAUSEN, B. A.; SCHRATER, P.; WOODS, D. L. Shape perception reduces activity in human primary visual cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, n. 23, p. 15164-15169, Nov. 2002.

NASSINI, G.; ARNONE, A.; ASSANTE, G.; BAVA, A.; MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, um hiperparasita do fungo ferrugem. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, n. 14, p. 2107-2111, July 2004.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Natural Products Reports**, London, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, July, 2003.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, London, v. 17, n. 3, p. 215-234, June 2000.

OSBOURN, A. Host-microbe interactions: fungi–molecular intimacy exposed: probing plantfungus interactions. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 4, n. 4, p. 363-364, Aug. 2001.

PANACCIONE, D. G.; JOHNSON, R. D.; WANG, J.; YOUNG, C. A.; DAMRONGKOOL, P.; SCOTT, B.; SCHARDT, C. L. Elimination of ergovaline from a grass-*Neotyphodium* endophyte symbiosis by genetic modification of the endophyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, n. 4, p. 12820-12825, Feb. 2001.

PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. Controle biológico: uma visão inter e multidisciplinar. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 125-142.

PAULITZ, T. C. Biological control of root rot pathogens in soilless and hydroponic systems. **HortScience**, Alexandria, v. 32, n. 2, p. 193-196, Mar. 1997.

PEIXOTO-NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 62-77, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/micro.asp>>. Acesso em: 14 nov. 2005.

PELÁEZ, F. The historical delivery of antibiotics from microbial natural products – can history repeat? **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 71, n. 7, p. 1981-1990, July 2006.

PELÁEZ, F.; COLLADO, J.; ARENAL, F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; DIÉZ MATAS, M. T.; GARCÍA, J. B.; GONZÁLEZ DEL VAL, A.; GONZÁLEZ, V.; GORROCHATEGUI, J.; HERNÁNDEZ, P.; MARTÍN, I.; PLATAS, G.; VICENTE, F. Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. **Mycological Research**, Cambridge, v. 102, n. 6, p. 775-761, 1998.

PEREIRA, J. A. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish***. 1993. 135f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PEREIRA, R. G.; BORÉM, F. M.; VILELA, T. Caracterização microbiológica e qualidade da bebida de cafés (*Coffea arabica* L.) da região Alto Rio Grande – Sul de Minas Gerais. In: SIMPÓSIO DE PESQUISAS DO CAFÉ DO BRASIL, 2., 2001, Vitória. **Resumos...** Brasília: Embrapa Café, 2001. p. 177-178.

PEREIRA, R. T. G. **Influência de *Cladosporium cladosporioides* na qualidade da bebida do café**. 2002. 42 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PIMENTA, C. J. **Qualidade do café originado de frutos colhidos em quatro estádios de maturação**. 1995. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PIMENTA, C. J. **Qualidade do café**. Lavras: UFLA, 2003. 304 p.

PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R.; CARVALHO JÚNIOR, C. de. Componentes de parede celular de grãos de frutos de café submetidos a diferentes tempos à espera para secagem. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 26, n. 2, p. 203-209, 2004.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, jan./fev. 2002.

PITT, J. I.; BASÍLICO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. Mycotoxins and toxigenic fungi. **Medical Mycology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 41-46, 2000. Supplement.

PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: a decade in review. In: KOE, W.; SAMSON, R. A.; EGMOND, H. P. van; GILBERT, J.; SABINO, M. (Ed.). **Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millennium**. Wageningen: Ponsen e Looyen, 2001. cap. 6, p. 153-172.

RAND-LUBY, L.; POMMIER, R. F.; WILLIAMS, S. T. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. **Annals Surgery**, Philadelphia, v. 224, n. 4, p. 583-590, Aug. 1996.

REICHERT, J. M. Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 2, n. 9, p. 695-702, Sept. 2003.

ROBBS, C. F. Enfermidades e pragas nos estados da Guanabara e Rio de Janeiro. **A Lavoura**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 9, p. 21-28, set. 1973.

ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M. Controle biológico de insetos: o controle biológico de insetos nocivos à agricultura com o emprego de fungos imperfeitos ou hifomicetos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 6, n. 4, p. 10-12, jul./ago. 1998.

RODRIGUES-HEERKLOTZ, K. F.; DRANDAROV, K.; HEERKLOTZ, J.; HESSE, M.; WERNER, C. Guignardic acid, a novel type of secondary metabolite produced by the endophytic fungus *Guignardia* sp.; isolation, structure elucidation, and asymmetric synthesis. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 84, n. 12, p. 3766-3772, Dec. 2001.

ROSE, R. J.; HODGSON, D. R. **Manual of equine practice**. Philadelphia: Saunders, 1993. 532p.

ROSENBAUM, E. E.; HERSCHLER, R. J.; JACOB, S. W. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. **JAMA**, Chicago, v. 192, n. 4, p. 309-313, 1965.

SAFFIOTI, W. **Fundamentos de química**: química geral, inorgânica e físico química. São Paulo: Nacional, 1968. 689 p.

SAKAGAMI, Y.; SANO, A.; HARA, O.; MIKAWA, T.; MARUMO, S. Cladosporol, β -1,3- glucan biosynthesis inhibitor, isolated by the fungus *Cladosporium cladosporioides*. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 36, n. 9, p. 1469-1472, Feb. 1995.

SANHUEZA, R. M. V. Uso de formaldeído e Trichoderma para prevenir a recolonização de solo por Phytophthora em pomares de macieiras. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 2., 1987, Piracicaba. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 55.

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

SCRUGLI, A.; COGONI, A.; MELIS, G. V.; DEIDDA, D.; POMPEI, R. Attività biologica di funghi endofitici di Orchidaceae spontanee della Sardegna. Biologic activity of endophytic fungi isolated from sardinian orchid roots. **Micologia Italiana**, New York, v. 29, n. 12, p. 29-37, Dec. 2000.

SHIMIZU, M.; NAKAGAWA, Y.; SATO, Y.; FURUMAI, T.; IGARASHI, Y.; ONAKA, H.; YOSHIDA, R.; KUNOH, H. Studies on endophytic actinomycetes (I) Streptomyces sp. isolated from Rhododendron and its antifungal activity. **Journal of General Plant Pathology**, Tokyo, v. 66, n. 4, p. 360-366, Aug. 2000.

SILVA, F. S. **Diversidade microbiana em grãos de (*Coffea arábica*L.) processados por via seca nas pré e pós-colheita**. 2000. 105 p. Tese (Doutorado em Microbiologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SINGH, S. B.; BARRETT, J. F. Empirical antibacterial drug discovery: foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 71, n. 7, p. 1006-1015, Mar. 2006.

SKANDAMIS, P.; KOUTSOUMANIS, K.; FASSEAS, K.; NYCHAS, G. J. E. Inhibition of orégano essential oil and EDTA on E. coli 0157:H7. **Italian Journal of food Science**, Pinerolo, v. 13, n. 1, p. 55-65, gen. 2001.

SOUZA, A. Q. L. **Fungos endofíticos de plantas tóxicas da Amazônia, *Palicourea longiflora* (AUBL.) RICH e *Strychnos cogens* BENTHAM**. 2001. 102 p. Tese (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

SOUZA, M. M. de; CRUZ, A. B.; SCHUMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. (Org.). **Ciências farmacêuticas contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003. p. 109-168.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 67, n. 4, p. 491-502, Dec. 2003.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 5, n. 1, p. 39-41, Jan. 2000.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 175, n. 2, p. 149-163, June 1999.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 141-158, Sept. 1998.

TANIWAKI, M. H.; PITT, J. I.; TEIXEIRA, A. A.; IAMANAKA, B. T. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 173-179, Apr. 2003

TOKESHI, H. Cana-de-açúcar. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. (Org.). **Micronutrientes na agricultura**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato/CNPq, 1991. p. 485-499.

- URIZAR, N.; LIVERMAN, A. B.; DODDS, D. T.; SILVA, F. V.; ORDENTTLECH, P.; YAN, Y.; GONZALEZ, F. J.; HEYMAN, R. A.; MANGELSDORF, D. J.; MOORE, D. D. A natural product that lowers cholesterol as an antagonist ligand for F X R. **Science**, Washington, v. 296, n. 5573, p. 1703-1706, May 2002.
- VARMA, A.; VERMA, S.; SAHAY, S. N.; BUTEHORN, B.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 6, p. 2741-2744, June 1999.
- VENDRAMIM, J. D. O controle biológico e a resistência de plantas. In: PARRA, J. R. P.; BOTELHO, P. S. M.; CORRÊA-FERREIRA, B. S.; BENTO, J. M. S. (Ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 511-519.
- VERDINE, G. L. The combinatorial chemistry of nature. **Nature**, London, v. 384, n. 6604, p. 11-13, Nov. 1996.
- WEIST, S.; SÜSSMUTH, R. D. Mutational biosynthesis: a tool for the generation of structural diversity in the biosynthesis of antibiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 68, n. 2, p. 140-150, Feb. 2005.
- WHITE JUNIOR, J. F.; BELANGER, F.; MEYER, W.; SULLIVAN, R. F.; BISCHOFF, J. F.; LEWIS, E. A. Clavicipitalean fungal epibionts and endophytes: development of symbiotic interaction with plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 33, n. 1, p. 201-213, 2002.
- WILSON, C. L.; WISNIEWSKI, M. E. Biological-control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 27, n. 2, p. 425-441, Dec. 1989.
- WILSON, C. L.; CHALUTZ, E. Postharvest biological control of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 40, p. 105-112, Sept. 1989.
- WINDELS, C. E.; LINDOW, S. E. **Biological control on the phylloplane**. 2. ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, 1985.

WRIGLEY, S. K.; AINSWORTH, A. M.; KAU, D. A.; MARTIN, S. M.;
BAHL, S.; TANG, J. S.; HARDICK, D. J.; RAWLINS, P.; SADHEGHI, R.;
MOORE, M. Novel reduced benzo[j]fluoranthren-3-ones from *Cladosporium*
cf. cladosporioides with cytokine production and tyrosine kinase inhibitory
properties. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 54, n. 6, p. 479-488, June 2001.

YEN, W. J.; WANG, B. S.; CHANG, L. W.; DUH, P. D. Antioxidant properties
of roasted coffee residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,
Easton, v. 53, n. 7, p. 2658-2663, Feb. 2005.

ZOU, W. X.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y.,
TAN, R. X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic
fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63,
n. 11, p. 1529-1530, Nov. 2000.

CAPITULO 2

**ATIVIDADE DE EXTRATOS DE *Cladosporium cladosporioides* NA
ESPORULAÇÃO E GERMINAÇÃO DOS FUNGOS *Aspergillus niger*,
Aspergillus ochraceus, *Fusarium sp.* e *Penicillium sp.***

1 RESUMO

Muitas espécies de fungos são capazes de causar antibiose a outros organismos fitopatogênicos por meio da síntese e da excreção de metabólitos de natureza tóxica. Fungos antagonistas têm sido empregados como agentes de controle biológico de pragas e doenças, devido à sua capacidade de trazer benefícios às plantas, impedindo o desenvolvimento de fungos patogênicos. Os microrganismos antagonistas são conhecidos pela sua capacidade de produzir antibióticos e pela sua capacidade metabólica de produzir grande diversidade de moléculas bioativas. A avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários produzidos por fungos antagonistas tem sido alvo de estudos. Com isso, o trabalho foi realizado com o objetivo de se determinar o efeito *in vitro* de metabólitos extraídos do fungo *C. cladosporioides* em meio de cultura BD, através de extratores (acetato de etila, etanol, DMSO e metanol) e suas atividades contra fungos prejudiciais ao café e a outras culturas. Foram realizados testes de esporulação contra os fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Avaliaram-se alterações nas características morfológicas dos fungos, tais como alterações na cor, no tamanho e na produção de esporos. Teste de germinação também foi desenvolvido com o objetivo de se determinar a redução da germinação dos fungos. Evidenciaram-se significativas reduções, tanto da esporulação quanto da germinação dos esporos dos fungos testados pela ação de extratos de *Cladosporium cladosporioides*.

Palavras-chave: *Cladosporium cladosporioides*, esporulação, germinação, metabólitos.

2 ABSTRACT

Many species of fungi are capable of causing antibiosis to others pathogenic organisms through the synthesis and excretion of metabolites of toxic nature. Fungal antagonists have been used as biological agents control of pests and diseases, due to its ability to bring benefits to the plants preventing the development of pathogenic fungi. Microorganisms antagonists are known for their ability to produce antibiotics and their metabolic capacity to produce a wide variety of bioactive molecules. The evaluation of the antimicrobial activity of secondary metabolites produced by fungi antagonists have been investigated. Therefore, this work was carried out in order to determine the effect of metabolites extracted from the fungus *C. cladosporioides* in media database by extracting (Ethyl Acetate, Ethanol, DMSO and methanol) and its activity ruling coffee. Tests were conducted against the sporulation of *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium* and *Penicillium*. We evaluated changes in fungi morphological characteristics such as changes in color, size and spore production. Germination test was also carried out in order to determine the reduction in the inhibition of fungi germination. Prominence has been significant reductions, both of sporulation on the germination of spores of the fungi tested by the action of extracts of *Cladosporium cladosporioides*.

Key Words: *Cladosporium cladosporioides* Sporulation, Germination, metabolites.

3 INTRODUÇÃO

Atualmente, químicos de produtos naturais estão procurando por novas fontes de ampla diversidade biológica. Fungos são microrganismos que constituem enorme diversidade de espécies que habitam as diversas plantas existentes e se inserem no contexto para a busca de novos compostos com variabilidade química e biológica. Assim, há grande potencial químico e biológico a ser explorado com estudos de metabólitos secundários produzidos por fungos (Clardy & Walsh, 2004).

Muitas moléculas, na natureza, são metabólitos secundários obtidos em contextos ou situações específicas. Isso inclui metabólitos microbianos originados durante o período de ausência de nutrientes (antibióticos produzidos por *Pseudomonas*), durante o período de desenvolvimento e períodos de sinalização (como as moléculas “quorum-sensing”, moléculas sinalizadoras, que são sintetizadas em densidades particulares de culturas de microrganismos) (Clardy & Walsh, 2004).

Neste contexto, há trabalhos relacionados com a investigação de múltiplos mecanismos de biocontrole de *Cladosporium tenuissimum*, estabelecendo a caracterização química de metabólitos secundários, produzidos por estirpes do fungo e sua atividade inibindo a germinação dos urediniósporos do agente da ferrugem *Uromyces appendiculatus* (Nassini et al., 2004).

Têm-se outros relatos referentes à produção de metabólitos por fungos, valendo destacar a produção do composto cladosporol ($C_{20}H_{16}O_6$), inibidor da biossíntese de β -1, 3-glucano, isolado do filtrado da cultura de *Cladosporium cladosporioides*.

As identificações de novas substâncias e as atividades biológicas já estabelecidas com o cultivo de fungos indicam que esses microrganismos constituem uma fonte potencial de substâncias bioativas e novas entidades

químicas que ainda são pouco exploradas. Dessa forma, objetivou-se, com a realização deste trabalho, avaliar a atividade antimicrobiana do extrato fúngico de *Cladosporium cladosporioides*, por meio de testes de esporulação e germinação, dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium* spp. e *Penicillium* sp.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área experimental

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório do EcoCentro da EPAMIG, localizado no município de Lavras, Minas Gerais.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis e dez repetições, para testes de esporulação e germinação, respectivamente.

4.2 Meios de cultura

4.2.1 Ágar de Batata e Dextrose (BDA)

Batata	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL
pH	6,8

As batatas foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços e cozidas em 500 mL de água destilada, por 30 minutos, em forno de micro-ondas. Após filtração através de gaze, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante, completando-se com água destilada para 1.000 mL. O pH foi ajustado com NaOH, antes de se adicionar o ágar.

4.2.2 Meio líquido de batata e dextrose (BDL)

Batata	200,0 g
Dextrose	20,0 g
Água destilada	1000 mL
pH	6,8

As batatas foram descascadas, cortadas em pequenos pedaços e cozidas em 500 mL de água destilada, por 30 minutos, em forno de micro-ondas. Após filtração através de gaze, a dextrose foi adicionada ao caldo resultante, completando-se com água destilada para 1.000 mL.

4.2.3 Solução de Tween 80 a 0,1% (v/v)

Para o preparo da solução de Tween 80 a 1%, pesou-se 1 g de Tween 80, dissolvendo-se em 1.000 mL de água destilada. A solução foi, então, autoclavada e estocada, sob refrigeração, a 40°C

4.3 Preparo e inoculação dos fungos

Placas de Petri foram previamente autoclavadas e preparadas com meio BDA para a repicagem dos fungos a serem cultivados: *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Cladosporium cladosporioides*. Todos os isolados foram obtidos de grãos de cafês beneficiados, sendo depositados na micoteca do EcoCentro da Epamig, em Lavras, MG. Após a repicagem, os fungos foram mantidos na câmara de germinação.

4.4 Cultivo do microrganismo

Foi utilizada a linhagem *Cladosporium cladosporioides*, pertencente à coleção do Laboratório de Micologia da EPAMIG. As culturas foram preparadas em placas de Petri contendo meio BDA. Após crescimento em estufa a 30°C, durante, aproximadamente, 10 dias, a cultura foi conservada sob refrigeração, a 4°C e repicada a cada 30 dias.

4.5 Preparo do extrato

O extrato fúngico foi obtido a partir do micélio de *Cladosporium cladosporioides*. No caso do micélio, doze discos (0,5 cm de diâmetro) foram retirados do meio de cultivo BDA contendo crescimento micelial de *C. cladosporioides* e colocados em erlenmeyers com 300 mL de meio líquido BD (batata-dextrose).

Após, aproximadamente, vinte dias de cultivo, sob agitação orbital a 300 rpm em temperatura ambiente (28°C-30°C), o conteúdo dos erlenmeyers foi filtrado em papel de filtro GF/A. O meio foi separado do micélio por filtração a vácuo, utilizando funil de Buchner (filtro de papel Whatman nº.1), seguido por centrifugação, a 15 g, por 15 minutos. O sobrenadante foi esterilizado por filtração através de filtro de 0,45 µm (Milipore Corp., Bedford, MA), seguido de filtração em membrana tipo Millipore (0,2 µm de diâmetro do poro), para a obtenção do “filtrado do crescimento micelial”.

O filtrado foi submetido à partição com os extratores. Esta extração implica em obter material orgânico livre de sua matriz original (células e tecidos). Os solventes utilizados foram escolhidos em função do objetivo do trabalho: a extração de metabólitos obtidos a partir de extratores eficientes tais quais, acetato de etila (AcOEt), etanol (Et(OH)), dimetil sulfóxido, (DMSO) e metanol (Me(OH)) (alíquotas de 30 mL/L) imersos por 7 dias (para morte do fungo e extração dos metabólitos). Testes de esporulação e germinação com os fungos *A. ochraceus*, *A. niger*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram realizados nesta etapa do experimento.

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

4.6.1 Teste *in vitro* de esporulação dos fungos

Para o teste do extrato batata, dextrose + *Cladosporium cladosporioides* (BDC), utilizaram-se placas de Petri com cada fungo a ser testado, *A. ochraceus*,

A. niger, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Adicionaram-se 10 mL de água esterilizada destilada, formando-se uma suspensão de esporos. Acrescentou-se a suspensão ao meio de cultura fundido BDA, misturando-os e vertendo-os em 12 placas de Petri. Furos no centro do meio de cultura foram realizados para a adição dos filtrados e extratores. As placas foram secas na ausência de luz germicida.

No teste de esporulação, acrescentaram-se 50 µL do extrato BDC + cada extrator no centro das placas de Petri com meio BDA + suspensão dos fungos *A. ochraceus*, *A. niger*, *Fusarium* e *Penicillium* e testemunhas Et(OH), AcOEt, Me(OH) e DMSO. As placas foram vedadas e incubadas na câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações das placas foram realizadas após 7 dias de incubação.

Para a avaliação dos testes, foram adicionados 40 mL de água esterilizada às placas incubadas, contendo BDC + fração + fungo testado. Em seguida, foram raspadas para a obtenção de uma suspensão. Realizou-se a contagem de esporos por meio de uma câmara de Neubauer, em microscópio ótico.

A partir dos testes, foram avaliadas as estruturas morfológicas dos fungos, tais como alterações na cor, no tamanho e na produção de esporos.

4.6.2 Teste *in vitro* de germinação de esporos

O teste de germinação foi instalado em placas de Petri de 6 cm contendo 10 mL de meio água-ágar 2%. Os tratamentos foram misturados ao meio e, sobre este, transferidos 50 mL da suspensão de esporos de cada fungo, sendo, portanto, espalhados com alça de Drigalsky.

As placas foram mantidas em BOD, a 25°C, com regime de 6 horas de claro e 6 horas de escuro. Após o período de incubação, foi utilizada solução de lactoglicerol para analisar a germinação dos esporos e sua contagem. A

contagem foi feita em lâmina dividida em quadrantes, em que foram contados de 50 a 100 esporos por quadrante.

As avaliações foram realizadas após 12 horas de incubação em microscópio de luz para o fungo *Aspergillus ochraceus*, 18 horas para *Aspergillus niger*, 24 horas para *Fusarium* sp. e 26 para *Penicillium* sp. Para a constatação do tempo necessário para a germinação dos fungos, foi realizado um ensaio prévio.

Foram considerados germinados os esporos com tubo germinativo maior que o esporo.

4.7 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos com os fungos estudados (*A. ochraceus*, *A. niger*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp.) foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, com 9 tratamentos e 6 repetições para os testes de esporulação e 10 repetições para avaliação da germinação.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2000). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

TABELA 1 Tratamentos e descrição dos testes para análises estatísticas

Tratamentos	Descrição	
Extrato+extrator AcOEt		
Extrato+extrator DMSO		
Extrato+extrator Et(OH)		
Extrato+extrator Me(OH)	Testes	Testes
Testemunha AcOEt	Esporulação	Germinação
Testemunha DMSO		
Testemunha Et(OH)		
Testemunha Me(OH)		
Testemunha Geral		

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ação de metabólitos secundários do filtrado de *C. cladosporioides* obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a esporulação de *Aspergillus ochraceus*

TABELA 2 Efeito de metabólitos do fungo *C. cladosporioides* sobre a esporulação de esporos do fungo *Aspergillus ochraceus*.

<i>Tratamentos</i>	<i>Médias (Números de esporos/cm³)</i>
Extrato + extrator DMSO	2,5x10 ⁵ a
Extrato + extratoracoet	2,6x10 ⁵ a
Extrato + extrator Et(OH)	4,0x10 ⁵ a
Extrato + extrator Me(OH)	4,9x10 ⁵ a
Extrator DMSO	1,9x10 ⁶ b
Extrator Et(OH)	4,4x10 ⁶ c
Extrator AcOEt	4,4x10 ⁶ c
Extrator Me(OH)	6,3x10 ⁶ d
Testemunha geral	7,0x10 ⁶ e

CV:19,77 *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

De acordo com os resultados expressos na Tabela 2, pode-se perceber a influência dos solventes na extração dos metabólitos dos filtrados da cultura de *C. cladosporioides*. A esporulação de *A. ochraceus* com as testemunhas (DMSO, Et(OH), Me(OH) e AcOEt), na ausência do extrato, quando comparada com a testemunha geral, apresentou diferentes níveis de redução sobre a esporulação. Já na presença do extrato BDC + extratores, pode-se perceber a ação dos metabólitos extraídos dos filtrados e sua atividade na redução da esporulação do fungo, superior aos extratores e à testemunha.

Os extratores utilizados neste trabalho foram selecionados com base no fato de que os solventes devem extrair eficientemente as substâncias que se desejam, no caso, o metabólito cladosporol isolado de *C. cladosporioides*, e devem ser solventes atóxicos, baratos e, principalmente, terem o ponto de ebulição adequado para evitar a decomposição térmica das substâncias extraídas. Foram considerados os melhores solventes para inibição da esporulação de *A. ochraceus* aqueles cuja diferença entre a ação de (Extrator) - (Extrator + Extrato) obteve uma maior porcentagem da inibição, ou seja, cuja ação do metabólito foi mais efetiva. No caso, de acordo com os resultados mostrados na Tabela 2, os extratos apresentaram índices de esporulação significativamente inferiores ao da testemunha. No entanto, os extratores também apresentaram diferentes níveis de inibição sobre a esporulação. Como o extrator Me(OH) foi o que apresentou o menor índice de redução da esporulação, quando comparado com a testemunha geral, pode-se deduzir que a maior inibição do extrato deveu-se a ação do metabólito do fungo.

A presença do solvente Me(OH) no extrato de *C. cladosporioides* proporcionou significativa ação do metabólito, inibindo em 83% a esporulação de *A. ochraceus*. A escolha do extrator foi baseada no fato de o álcool (CH₃OH) ser um solvente muito utilizado para extrair metabólitos secundários, uma vez que são excelentes, baratos e considerados extratores muito eficientes, pois rompem as membranas celulares, extraíndo o material intracelular, o que não é o caso de solventes apolares. O extrator DMSO apresentou menor capacidade de extração do metabólito, se comparado com os outros solventes, uma vez que a porcentagem de inibição da esporulação de *A. ochraceus* foi de 24%. O extrator DMSO possui baixa toxicidade (Brayton, 1986; Soyka, 1990; Rose & Hodgson, 1993; Stone, 1993) e intensa capacidade de penetração; muitas substâncias, quando associadas ao DMSO, podem ser carregadas através das membranas (Brayton, 1986; Blythe et al., 1986; Rose & Hodgson, 1993; Rand-Luby et al.,

1996), as quais resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas, sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (Sojka et al., 1990).

De acordo com as ilustrações abaixo, pode-se perceber a atuação dos metabólitos secundários extraídos a partir de cada extrator e sua ação na inibição da esporulação de *Aspergillus ochraceus* por meio das alterações das características macroscópicas.

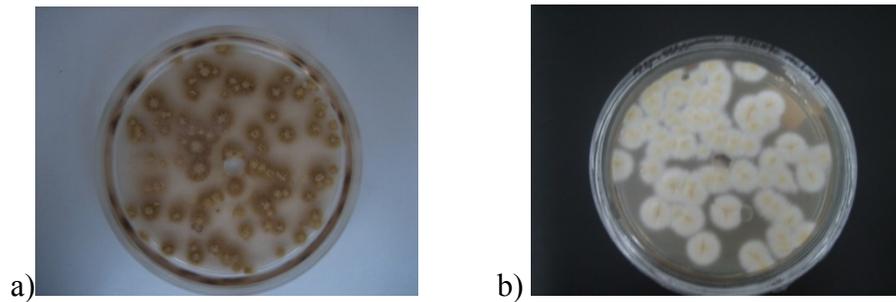


FIGURA 1 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *A. ochraceus*. a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com Me(OH)



FIGURA 2 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *A. ochraceus*. a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com dimetil sulfóxido



FIGURA 3 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *A. ochraceus*. a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com acetato de etila



FIGURA 4 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *A. ochraceus*. a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com etanol.

5.2 Ação de metabólitos secundários do filtrado de *C. cladosporioides* obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a esporulação de *Aspergillus niger*

TABELA 3 Efeito de metabólitos extraídos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação de esporos do fungo *Aspergillus niger*.

Tratamentos	Médias (número de esporos/cm ³)
Extrato + extrator DMSO	1,0 x 10 ⁶ a
Extrato + extrator Et(OH)	1,2 x 10 ⁶ a
Extrato + extrator Me(OH)	1,5 x 10 ⁶ a
Extrato + extrator AcOEt	1,7 x 10 ⁶ a
Extrator Et(OH)	3,0 x 10 ⁶ b
Extrator DMSO	3,3 x 10 ⁶ b
Extrator Me(OH)	4,1 x 10 ⁶ c
Extrator AcOEt	4,7 x 10 ⁶ d
Testemunha geral	5,6 x 10 ⁶ e

CV:22,42 Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Após análises microscópicas seguidas de análises estatísticas, foi possível perceber o efeito dos extratos extraídos com Et(OH), DMSO, Me(OH) e AcOEt na inibição da esporulação do fungo *Aspergillus niger*. Quando os solventes atuaram como testemunha na ausência do extrato de *C. cladosporioides*, estes apresentaram diferentes índices de inibição, comparados com a testemunha geral.

O extrator AcOEt apresentou maior eficiência para extração dos metabólitos fúngicos para *A. niger*. Sendo da família dos ésteres, acetato de etila tem alto poder de solvência e é muito utilizado como solvente polar. Tem sido favorecido, como todo o grupo dos solventes oxigenados, pelas restrições impostas aos solventes hidrocarbônicos convencionais.

Considerando-se que o extrator AcOEt foi o que apresentou menor inibição da esporulação em relação à testemunha, verificou-se que a significativa redução da esporulação pelo extrato obtido com o mesmo solvente foi o que apresentou maior atuação inibidora exercida pelo metabólito extraído do fungo

Cladosporium cladosporioides. Em contrapartida, os extratores Et(OH) e DMSO, para o fungo *Aspergillus niger*, não apresentaram boa atividade, em se tratando da extração dos metabólitos. Comparando-se a testemunha Et(OH) e DMSO com a testemunha geral, pode-se perceber que os próprios solventes inibiram significativamente a esporulação do fungo *A. niger*. Portanto, a inibição da esporulação de *A. niger* pela produção de metabólitos sintetizados a partir da extração com etanol e DMSO não foi considerada tão eficiente. A inibição da esporulação com extrações de metabólitos secundários realizados com os solventes Me(OH) e AcOEt foram, respectivamente, de 46% e 54%.

Há relatos sobre estudos com a produção de extratos fúngicos e produção de metabólitos obtidos a partir de outros fungos, como relatam Gerasimenya et al. (2002), que analisaram cepas do fungo *Pleurotus ostreatus*, ativas contra *Aspergillus niger*.

Além da inibição da esporulação de *A. niger*, demonstrada por meio da contagem de esporos, pode-se perceber que, dependendo do tipo de solvente utilizado na extração, diferentes quantidades e tipos de produtos podem ser obtidos. O emprego de solventes apolares, como o éter de petróleo ou solventes altamente polares, como metanol e água, é seletivos para certos grupos de compostos (Verpoorte, 1998), justificando o fato de as diferentes características morfológicas apresentadas para o mesmo fungo.

As alterações nas características macroscópicas podem ser visualizadas nas Figuras 5 a 8.



FIGURA 5 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *A. niger*. a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com metanol.



FIGURA 6 Ação de metabólitos de *C. Cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *A. niger*. a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com acetato de etila.



FIGURA 7 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *A. niger*. a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com DMSO.



FIGURA 8 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *A. niger*. a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com etanol.

5.3 Ação de metabólitos secundários do filtrado de *C. cladosporioides*, obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a esporulação de *Fusarium* sp.

TABELA 4 Efeito de metabólitos do fungo *C. cladosporioides* sobre a esporulação de esporos do fungo *Fusarium* sp.

Tratamentos	Médias (número de esporos/cm ³)
Extrato + Extrator AcOEt	1,9 x 10 ⁵ a
Extrato + Extrator DMSO	1,9 x 10 ⁵ a
Extrato + Extrator Me(OH)	3,1 x 10 ⁵ a
Extrato + Extrator Et(OH)	5,4 x 10 ⁵ a
Extrator DMSO	1,7 x 10 ⁶ b
Extrator AcOEt	5,0 x 10 ⁶ c
Extrator Et(OH)	6,6 x 10 ⁶ d
Extrator Me(OH)	6,7 x 10 ⁶ d
Testemunha Geral	7,3 x 10 ⁶ e

CV:12,26*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Com base nos resultados da Tabela 4, pode-se constatar que todos os extratos reduziram significativamente a esporulação do fungo *Fusarium* sp. No

entanto, quando analisados os resultados referentes aos extratores aplicados isoladamente, verificou-se que estes exerceram uma ação diferenciada sobre a esporulação do fungo, apresentando uma porcentagem dos metabólitos extraídos de *C. cladosporioides* com os extratores AcOEt de 66%, DMSO de 21%, Et(OH) de 83% e Me(OH) de 87%.

Os extratores Et(OH) e Me(OH) foram os que apresentaram menor atividade inibitória sobre a esporulação, podendo-se atribuir uma inibição altamente significativa observada nos extratos obtidos a partir desses solventes aos metabólitos extraídos do fungo.

O solvente DMSO, conforme dados da Tabela 4, apresentou considerável inibição da esporulação de *Fusarium sp.*, quando atuou na ausência do extrato de *C. cladosporioides*. A inibição da esporulação do fungo pela produção de metabólitos sintetizados a partir da extração com DMSO, portanto, não foi considerada eficiente.

Pelas ilustrações das Figuras 9 a 12, podem-se identificar as alterações na morfologia, assim como a diminuição de esporos visualizados macroscopicamente de *Fusarium sp.*, devido à ação do metabólito fúngico.



FIGURA 9 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *Fusarium sp.* a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com DMSO.

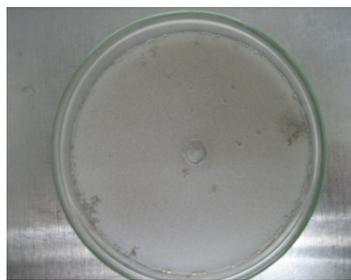


FIGURA 10 Foto de uma placa com *Fusarium* após ação do metabólito extraído com AcOEt.



FIGURA 11 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *Fusarium sp.* a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com etanol

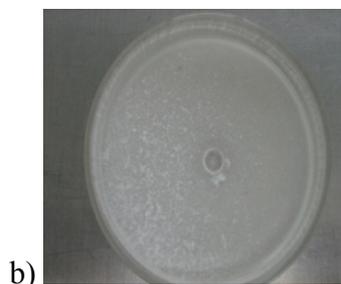


FIGURA 12 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *Fusarium sp.* a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com metanol

Pode-se perceber, por meio da Figura 12, a ação do metabólito do fungo *C. cladosporioides*, quando extraído com o solvente metanol. Ocorreu pouco

crescimento de esporos do fungo *Fusarium*, devido à intensa ação dos metabólitos extraídos.

5.4 Ação de metabólitos secundários do filtrado de *C. cladosporioides* obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a esporulação de *Penicillium sp.*

TABELA 5 Efeito de metabólitos do fungo *C. cladosporioides* sobre a esporulação de esporos do fungo *Penicillium sp.*

Tratamentos	Médias (número de esporos/cm ³)
Extrato + Extrator DMSO	5,3 x 10 ⁵ a
Extrato + Extrator AcOEt	6,8 x 10 ⁵ a
Extrato + Extrator Me(OH)	8,6 x 10 ⁵ a
Extrato + Extrator Et(OH)	1,0 x 10 ⁶ a
Extrator DMSO	1,7 x 10 ⁶ b
Extrator AcOEt	3,2 x 10 ⁶ c
Extrator Et(OH)	4,6 x 10 ⁶ d
Extrator Me(OH)	5,6 x 10 ⁶ e
Testemunha Geral	6,0 x 10 ⁶ e

CV:19,69*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

De acordo com os resultados expressos na Tabela 5, pode-se perceber que os extratos obtidos a partir dos diferentes solventes ou extratores apresentaram os índices significativamente superiores de inibição da esporulação do fungo *Penicillium sp.*

No entanto, considerando-se que os extratores, quando utilizados isoladamente, apresentaram diferentes graus de inibição da esporulação, verifica-se que o extrator Et(OH) foi o que apresentou o menor índice de inibição da esporulação e o extrator Me(OH) não diferiu da testemunha,

indicando não ter exercido efeito depressivo sobre a esporulação. Os resultados permitem concluir que a ação inibitória exercida pelos extratos obtidos a partir desses solventes deveu-se, predominantemente no caso do primeiro e exclusivamente no caso do segundo, a metabólitos do fungo *Cladosporium cladosporioides* presente nesses extratos

A ação do metabólito na inibição da esporulação de *Penicillium* foi de 60% extraídos em etanol e de 79% extraídos em metanol. Para extratores como DMSO e AcOEt, a inibição dos metabólitos foi de 19,5% e 42%. O extrator DMSO é uma substância que facilita a difusão e tem pouca interferência nos compostos. Estudos da estabilidade de compostos farmacêuticos em DMSO foram realizados com resultados satisfatórios. À temperatura ambiente, em 3 meses, 92% mantiveram sua integridade (Kozikowski et al., 2003), mas, para extração de metabólitos para a inibição da esporulação de *Fusarium* sp., o extrator DMSO, quando aplicado isoladamente, apresentou efeito depressivo na inibição da esporulação, se comparado à testemunha geral do fungo.

Como comprovação da ação de supostos metabólitos atuando na inibição da esporulação do *Penicillium*, podem-se perceber as alterações nas características macroscópicas do fungo, como cor, tamanho e forma, como se comprova nas ilustrações das Figuras 13 a 16.

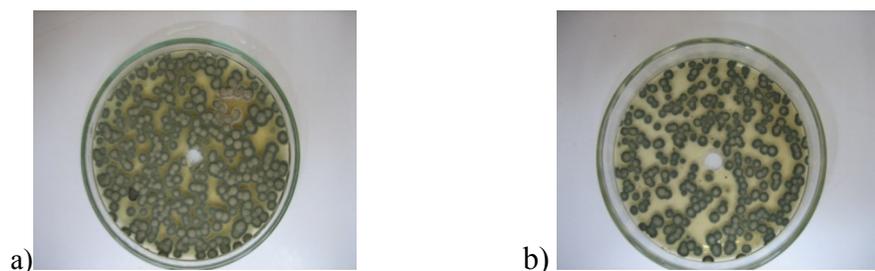


FIGURA 13 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *Penicillium* sp. a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com DMSO.



FIGURA 14 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *Penicillium sp.* a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com Me(OH).

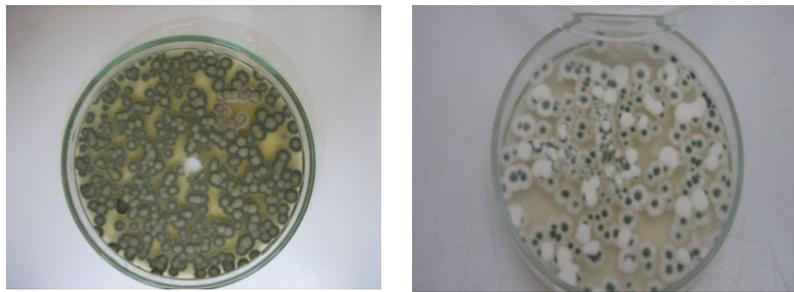


FIGURA 15 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *Penicillium sp.* a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com acetato de etila.

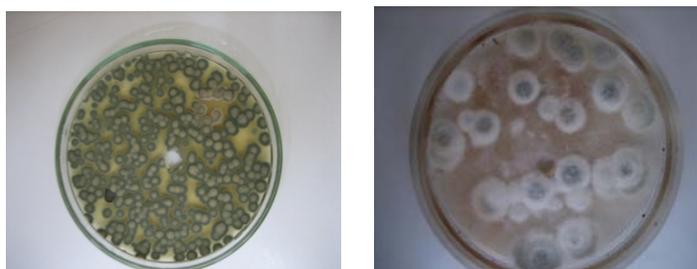


FIGURA 16 Ação de metabólitos de *C. cladosporioides* sobre a esporulação do fungo *Penicillium sp.* a) Testemunha geral e b) extrato do fungo obtido com Et(OH).

5.5 Ação de metabólitos secundários do filtrado de *C. cladosporioides* obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a germinação de *Aspergillus ochraceus*

TABELA 6 Efeito de metabólitos do fungo *C. cladosporioides* sobre a germinação de esporos do fungo *A. ochraceus*.

<i>Tratamentos</i>	<i>Médias (%)</i>
Extrato + extrator AcOEt	19 a
Extrato + extrator DMSO	20 a
Extrato + extrator Et(OH)	36 b
Extrator DMSO	40 b
Extrato + extrator Me(OH)	44 b
Extrator Me(OH)	74 c
Extrator AcOEt	74 c
Extrator Et(OH)	82 c
Testemunha geral	96 d

CV:22,27*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade

De acordo com os resultados para os testes de germinação com *A. ochraceus*, quanto mais baixa a porcentagem de germinação melhor a eficiência do extrato. Com isso, foi possível analisar que o AcOEt apresentou-se como melhor extrator, devido à sua menor porcentagem (19%) na germinação do fungo *A. ochraceus*.

Com relação ao extrato obtido com o DMSO, observou-se que, embora tenha se comportado de forma semelhante ao extrato obtido com o extrator AcOEt, o extrator, quando aplicado isoladamente, exerceu significativo efeito inibitório sobre a germinação de *A. ochraceus*.

Os extratos obtidos com os extratores Et(OH) e Me(OH) exerceram efeito intermediário e superior aos extratores utilizados isoladamente mas, por

sua vez, exerceram efeito significativo depressivo sobre a germinação dos esporos, quando comparados com a testemunha. As porcentagens expressas das atividades dos metabólitos extraídos de *C. cladosporioides* na redução da germinação do fungo *A. ochraceus* foi de 57% extraído com AcOEt, 21% extraído com DMSO, 48% extraído com etanol e 31% extraído com metanol.

Na Figura 17 pode-se visualizar a microfotografia em microscópio ótico da germinação do fungo *A. ochraceus*. Em *a)* pode-se perceber grande quantidade de esporos germinando, sendo visíveis ao microscópio vários tubos germinativos. Já em *b)*, pode-se visualizar o efeito do extrato de *C. cladosporioides* na inibição da germinação, em que estão presentes somente alguns tubos germinativos e esporos que não germinaram.

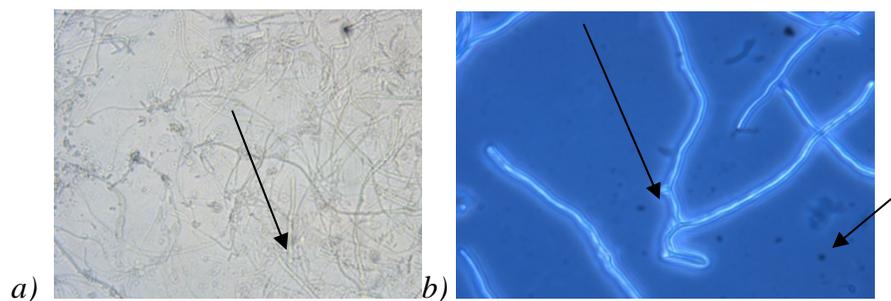


FIGURA 17 Microfotografia em microscópio ótico do teste de germinação do fungo *A. ochraceus* como *a)* testemunha geral *b)* na presença de extrato de *C. cladosporioides* extraído com AcOEt .

De acordo com dados da literatura, há trabalhos relacionados com a extração de vários metabólitos produzidos a partir do filtrado da cultura de células de *Cladosporium cladosporioides* (isolado MB2.F45). Estas células reduziram, em 36%, o crescimento do tubo germinativo de *Botrytis fabae*. Em comparação, frações orgânicas do filtrado da cultura de células de *P.*

brevicompectum apresentaram inibição de 96% a 97% da germinação dos conídios de *B. fabae* (Jackson et al., 1997).

5.6 Ação de metabólitos secundários do filtrado de *C. cladosporioides* obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a germinação de *Aspergillus niger*

TABELA 7 Efeito de metabólitos do fungo *C. cladosporioides* sobre a germinação de esporos do fungo *A. niger*.

<i>Tratamentos</i>	<i>Médias (%)</i>
Extrato + extrator AcOEt	3 a
Extrato + extrator Et(OH)	4 a
Extrato + extrator Me(OH)	6,2 a
Extrato + extrator DMSO	6,4 a
Extrator Et(OH)	13 b
Extrator DMSO	28 c
Extrator Me(OH)	38 d
Extrator AcOEt	40 d
Testemunha geral	62 e

CV:24,54*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Para o fungo *A. niger*, os extratos obtidos a partir de todos os extratores testados apresentaram significativa redução na germinação dos esporos em relação à testemunha. No entanto, quando testados isoladamente, os extratores apresentaram em diferentes intensidades efeitos inibitórios sobre a germinação. Esse efeito foi mais acentuado no caso dos extratores Et(OH) e, em seguida, DMSO. Portanto, deve-se atribuir o efeito mais acentuado dos metabólitos extraídos aos solventes AcOEt e Me(OH).

A alta taxa de inibição da germinação de *A. niger* é obtida com a produção de metabólitos a partir da extração com solventes. A síntese dos metabólitos secundários está associada à diferenciação ou desenvolvimento celular, sendo bem observada nos fungos que apresentam crescimento filamentosos, com morfologia complexa (Calvo et al., 2002).

Relatos comprovam que ocorre produção de substâncias antimicrobianas a partir de outros fungos, não somente *C. cladosporioides*, que atuam inibindo a germinação de fungo *Aspergillus niger*. Conforme estudos de Gerasimenya et al. (2002), analisando cepas de *Pleurotus ostreatus*, estas foram ativas contra *Aspergillus niger*, bactérias gram-positivas e gram-negativas.

Lu et al. (2000) constataram atividade de três novos metabólitos produzidos pelo fungo *Colletotrichum* sp., isolado da planta medicinal *Artemisia annua* L. (Asteraceae), contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e *Pseudomonas* sp., atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, e inibição de crescimento de fungos patogênicos, como *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum* e *Phytophthora capsici*.

Na ilustração a seguir pode-se visualizar a microfotografia em microscópio ótico da germinação do fungo *A. niger*. É possível visualizar, na microfotografia da testemunha, maior quantidade de esporos germinando, se comparada à microfotografia em que os esporos estão na presença dos metabólitos extraídos a partir de acetato de etila, cujos tubos germinativos se encontram em menor quantidade e também ocorre a presença de esporos que não germinaram.

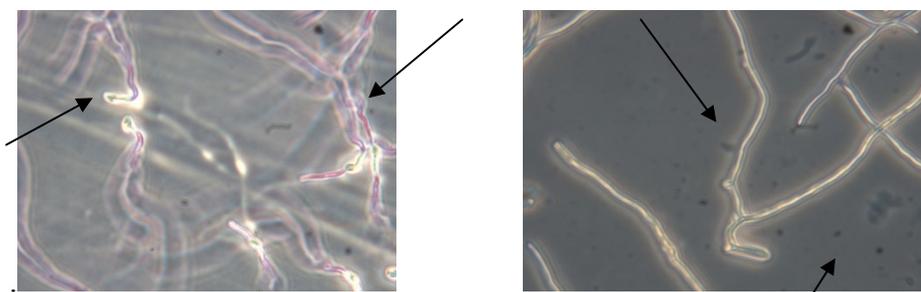


FIGURA 18 Microfotografia em microscópio ótico do teste de germinação do fungo *A. niger* como a) testemunha geral b) na presença de extrato de *C. cladosporioides* extraído com AcOEt.

5.7 Ação de metabólitos secundários do filtrado de *C. cladosporioides* obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a germinação de *Fusarium* sp.

TABELA 8 Efeito de metabólitos do fungo *C. cladosporioides* sobre a germinação de esporos do fungo *Fusarium* sp.

Tratamentos	Médias (%)
Extrato + extrator Et(OH)	40 a
Extrator Et(OH)	49 b
Extrato + extrator Me(OH)	58 c
Extrato + extrator DMSO	70 d
Extrato + extrator AcOEt	72 d
Extrator DMSO	88 e
Extrator AcOEt	91 e
Extrator Me(OH)	96 e
Testemunha geral	96 e

CV:11,81 *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

A ação do metabólito fúngico extraído pelos extratores demonstrou ser mais baixa para o fungo *Fusarium*, uma vez que a porcentagem de germinação foi mais alta em todos os tratamentos.

O conjunto extrato + extrator Et(OH), embora tenha revelado germinação de 40%, apresentou taxa relativamente menor, se comparado com a taxa de germinação da testemunha geral. Os princípios ativos derivados de metabólitos secundários presentes em extratos de *C. cladosporioides* extraídos com Et(OH) apresentaram ação de apenas 9,3%, demonstrando não ser este solvente tão eficaz.

De acordo com os dados da Tabela 8, o metabólito extraído com Me(OH) reduziu a taxa de germinação de 96% para 58%, em relação à testemunha geral, indicando uma taxa de ação do metabólito de 40%, valor alto quando analisados os valores da ação para cada um dos extratores. Na Figura 19 podem-se visualizar aos esporos não germinados de *Fusarium* sp., na ação do extrator Me(OH).

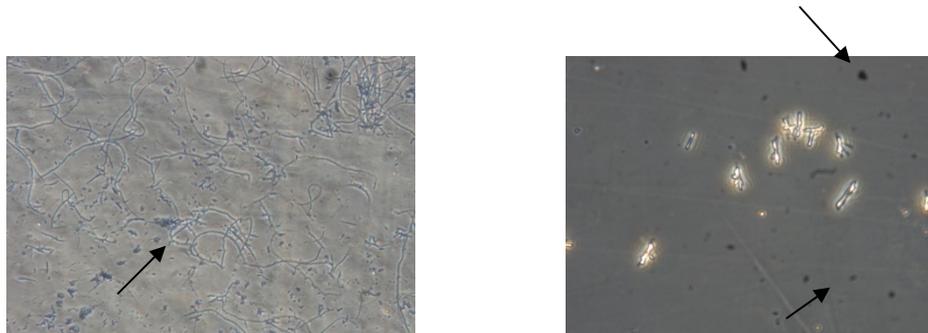


FIGURA 19 Microfotografia em microscópio ótico do teste de Germinação do fungo *Fusarium* sp. a) testemunha geral b) na presença de extratode *C. cladosporioides* extraído com Metanol.

5.8 Ação de metabólitos secundários do filtrado de *C. cladosporioides* obtidos a partir da extração com Me(OH), Et(OH), DMSO e AcOEt sobre a germinação de *Penicillium* sp.

Na germinação do fungo *Penicillium* sp., como pode se observa na Tabela 9, de acordo com as análises estatísticas, os extratores exerceram certa interferência na germinação, em comparação à testemunha geral. Isso indica que os solventes sem a ação do metabólito foram responsáveis pela redução da germinação. Mas, quando se analisa o efeito desses solventes somados aos extratos de *C. cladosporioides*, a germinação é reduzida a porcentagens significativamente inferiores, no caso dos extratos obtidos a partir dos solventes AcOEt e Me(OH).

TABELA 9 Efeito de metabólitos do fungo *C. cladosporioides* sobre a germinação de esporos do fungo *Penicillium* sp.

Tratamentos	Médias
Extrato + extrator Et(OH)	18 a
Extrator Et(OH)	33 b
Extrato + extrator AcOEt	34 b
Extrato + extrator Me(OH)	35 b
Extrato + extrator DMSO	45 c
Extrator AcOEt	45 c
Extrator Me(OH)	51 c
Extrator DMSO	60 d
Testemunha geral	84 e

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Com relação aos demais extratos, verificou-se significativa redução nos índices de germinação em relação à testemunha, porém, com significativa participação dos extratores no processo de inibição da germinação do fungo.

O extrator Et(OH), como ilustrado na Figura 20, reduziu de forma significativa a germinação do fungo, uma vez que a germinação na ausência de extratores foi de 84% e, sob a interferência do extrator Me(OH), passou a ser de 33%. Na presença do extrato, a porcentagem de germinação foi de somente 18%.

Há relatos também de extratos obtidos de culturas de outros fungos que inibiram a germinação do fungo *Penicillium* sp. Como exemplo, o extrato da linhagem de *Streptomyces* foi testado ainda contra vários patógenos de plantas, apresentando atividade contra *Pythium ultimum*, *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Erwinia carotovora*, *Cochliobolus carbonum* e *Penicillium* sp., mostrando o grande potencial dessas novas substâncias para a medicina e a agricultura (Castillo et al., 2002).

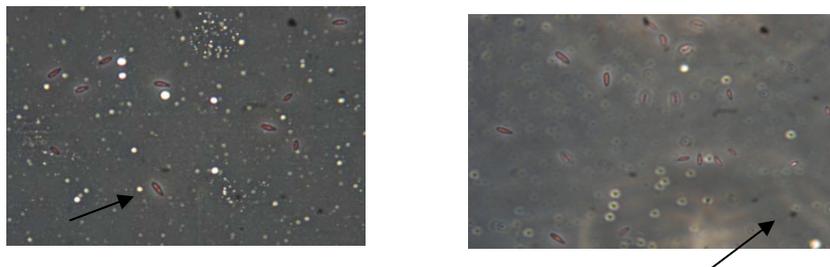


FIGURA 20 Microfotografia em microscópio ótico do teste de germinação do fungo *Fusarium* sp. a) Testemunha geral e b) na presença de extrato de *C. cladosporioides* extraído com metanol.

5.9 Análise comparativa dos resultados para teste de esporulação e germinação

Para efeito de análise geral dos resultados obtidos na esporulação e na germinação de cada fungo, na presença e na ausência dos extratores, os gráficos são apresentados nas Figuras 21 e 22

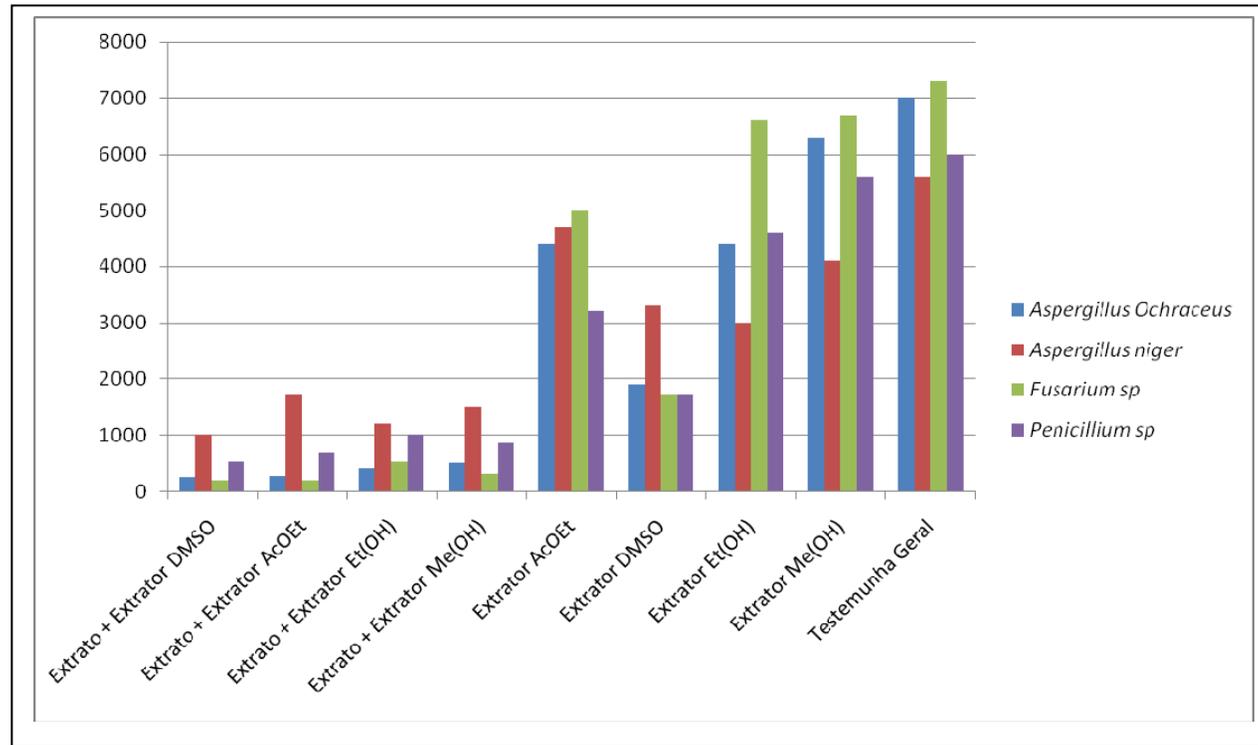


FIGURA 21 Análise comparativa da esporulação dos fungos com os extratos de *C. cladosporioides* + extratores; extratores e testemunha geral, para os fungos estudados.

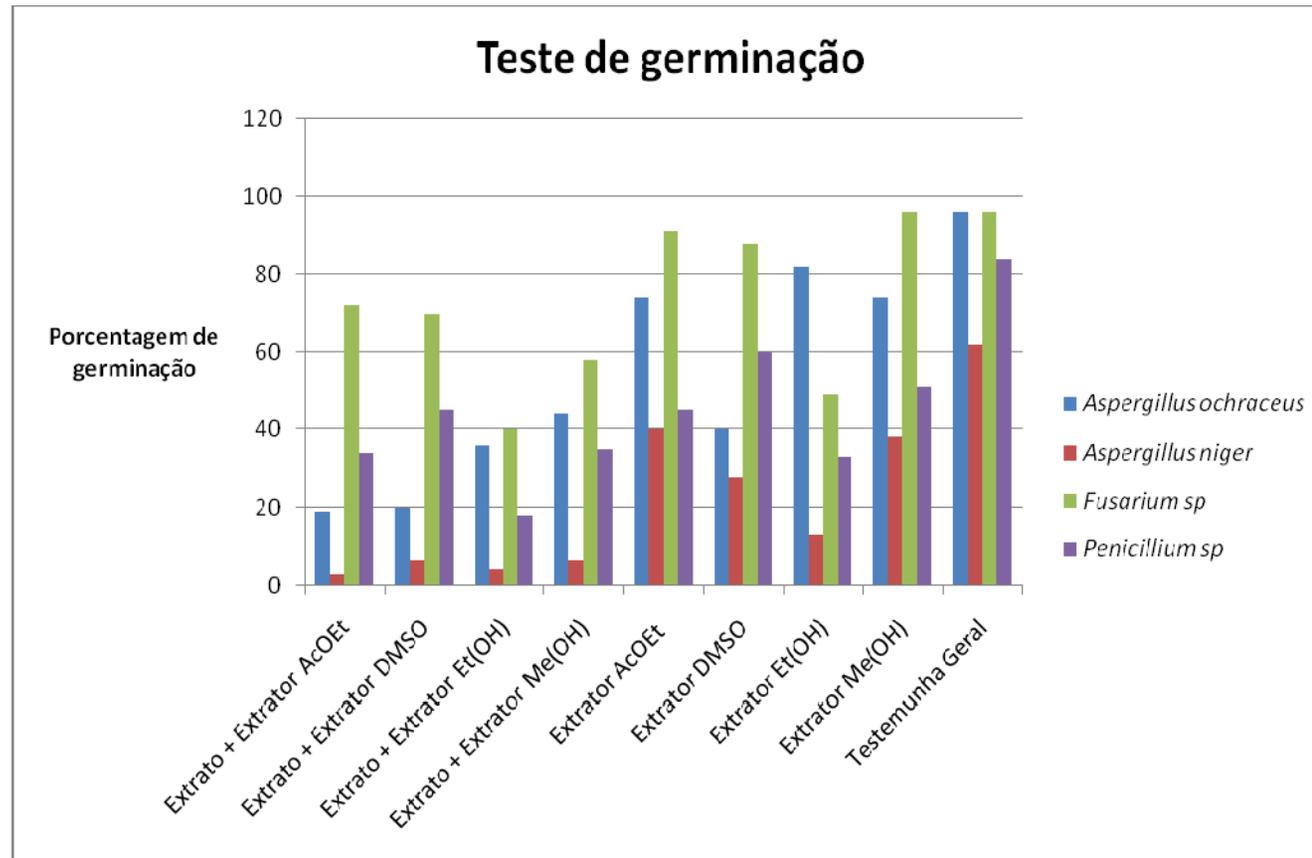


FIGURA 22 Análise comparativa da germinação dos fungos com os extratos de *C. cladosporioides* + extratores; extratores e testemunha geral, para os fungos estudados.

Em se tratando de extratos obtidos a partir do fungo *Cladosporium cladosporioides*, existem relatos sobre testes de eficiência do fungo entomopatogênico *Cladosporium cladosporioides* em campo, na concentração de $5,2 \times 10^5$ esporos/mL, que obtiveram redução de 93% na população de *O. praelonga*, no 39º dia após o tratamento (Sanches, 2003), comprovando a ação de metabólito cladosporol produzido pelo fungo.

Na Tabela 10, estão descritas as porcentagens dos metabólitos produzidos e sua ação na redução da esporulação e germinação dos fungos estudados.

TABELA 10 Porcentagens expressas das atividades dos metabólitos extraídos de *C. cladosporioides* nas reduções das esporulações dos fungos.

Fungos	AcOEt	DMSO	Et(OH)	Me(OH)
<i>A. ochraceus</i>	59%	24%	57%	83%
<i>A. niger</i>	54%	41%	32%	46%
<i>Fusarium</i>	66%	21%	83%	87%
<i>Penicillium</i>	20%	20%	60%	79%

TABELA 11 Porcentagens expressas das atividades dos metabólitos extraídos de *C. cladosporioides* nas reduções das germinações dos fungos.

Fungos	AcOEt	DMSO	Et(OH)	Me(OH)
<i>A. ochraceus</i>	57%	21%	48%	31%
<i>A. niger</i>	60%	35%	15%	51%
<i>Fusarium</i>	20%	19%	9%	40%
<i>Penicillium</i>	13%	18%	18%	19%

6 CONCLUSÕES

Os extratos do fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fres) de Vries, obtidos a partir dos solventes (AcOEt, Et(OH), Me(OH) e DMSO, reduziram a esporulação e a germinação dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.

Os metabólitos exibiram acentuada ação esporicida e significativa redução da germinação dos esporos, limitando o desenvolvimento dos fungos testados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGHE, D. A. V.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity**. London: Academic, 1991. p. 47-69.

BLYTHE, L. L.; CRAIG, A. M.; CHRISTENSEN, J. M.; APPELL, L. H.; SLIZESKI, M. L. Pharmacokinetic disposition of dimethyl sulfoxide administered intravenously to horses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 47, n. 8, p. 1739-1743, Aug. 1986.

BRANEN, A. L. Introduction to the use of antimicrobials. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. (Ed.). **Antimicrobials in foods**. 2. ed. New York: M. Dekker, 1993. p. 1-9.

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

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 3, p. 447-459, Sept. 2002.

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A. M.; TEPLow, D. B.; STEVENS, D.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. **Microbiology**, New York, v. 148, n. 9, p. 2675-2685, Sept. 2002.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, London, v. 432, n. 7019, p. 829-837, Dec. 2004.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programa e resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

GERASIMENYA, V. P.; EFREMENKOVA, O. V.; KAMZOLKINA, O. V.; BOGUSH, T. A.; TOLSTYCH, I. V.; ZENKOVA, V. A. Antimicrobial and antitoxical action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. extracts. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Redding, v. 4, n. 2, p. 48-54, 2002.

JACKSON, M.; TWADDLE, G. **Business process implementation: building workflow systems**. New York: ACM, 1997.

KOZIKOWSKI, A. P.; ADAMCZYK, M. Methods for the stereoselective cis-cyanoxylation and carboxyhydroxylation of olefins. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 48, n. 3, p. 366-372, Feb. 1983.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, Limerick, v. 151, n. 1, p. 67-73, Feb. 2000.

NASSINI, G.; ARNONE, A.; ASSANTE, G.; BAVA, A.; MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, um hiperparasita do fungo ferrugem. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, n. 14, p. 2107-2111, July 2004.

RAND-LUBY, L.; POMMIER, R. F.; WILLIAMS, S. T. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. **Annals Surgery**, Philadelphia, v. 224, n. 4, p. 583-590, Apr. 1996.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 23, n. 2/3, p. 127-149, July/Aug. 1988.

ROSE, R. J.; HODGSON, D. R. **Manual of equine practice**. Philadelphia: Saunders, 1993. 532 p.

SANCHES, A. C. Cultivo de citros: impacto em propriedades do solo. **Citricultura Atual**, Cordeirópolis, v. 5, n. 28, p. 18-19, 2002.

SOJKA, E. J.; KIMMICK, S. V. B.; CARISON, G. P. Dimethyl sulfoxide update: new applications and dosing methods: proceed. **American Association of Equine Practitioners**, Lexington, v. 36, p. 683-690, Dec. 1990.

STONE, R. W. Clinical updates on the use of dimethyl silfoxide. **Canine Practice**, Mission Viejo, v. 18, n. 1, p. 16-19, 1993.

ZUURBIER, K. W. M.; FUNG, S. Y.; SCHEFFER, J. J. C.; VERPOORTE, R.
In-vitro prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids
in humulus lupulus. **Phytochemistry**, New York, v. 49, n. 8, p. 2315-2322, Dec.
1998.

CAPÍTULO 3

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de frações do extrato de *C. cladosporioides* contra os fungos *A. ochraceus*, *A. niger*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.

1 RESUMO

Conduziu-se este trabalho com o objetivo de avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) sobre o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Foram testados, *in vitro*, os filtrados de *Cladosporium cladosporioides* adicionados aos extratores metanol, etanol, acetato de etila e DMSO, após o processo de liofilização. Avaliou-se a ação dos metabólitos, pesando-se, aproximadamente, 0,5 mg dos extratos sólidos e diluindo-os em 40 µL de Tween 80 a 1%. Como testemunha positiva foi utilizado o fungicida comercial Fegatex. Para as testemunhas negativas, foram testados somente o meio BDA na presença de esporos dos fungos específicos. Após 48 horas, foram realizadas as leituras dos testes. Os testes foram realizados em duplicata, avaliando-se o crescimento de cada fungo nas cavidades das placas. Foram encontradas concentrações inibitórias mínimas de 35,5 µg/mL, 142 µg/mL e 568 µg/mL, para metabólitos extraídos com Me(OH), Et(OH) e DMSO, respectivamente, para os fungos *A. ochraceus*, *Fusarium* sp., *A. niger* e *Penicillium*, e, para a testemunha Fegatex, a concentração mínima foi de 31 µg/mL.

Palavras-chave: *Cladosporium cladosporioides*, fungos, metabólitos, CIM.

2 ABSTRACT

This research was conducted aiming the evaluating the minimum inhibitory concentration on the development of *Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *Fusarium sp.* and *Penicillium sp.* Were tested in vitro the filtrates of *Cladosporium cladosporioides* extractors added to methanol, ethanol, ethyl acetate and DMSO after the lyophilization process. We evaluated the action of metabolites, by weighing about 0.5 milligrams of extract solids and diluting them in 40 μ L of Tween 80 1%. A positive control was used commercial fungicide Fegatex. For negative controls were tested only PDA medium in the presence of spores in specific fungi after 48 hours were performed readings of the tests The tests were performed in duplicate by evaluating the growing of each fungus in the wells of boards. We found minimal inhibitory concentrations 35.5 mg / mL, 142 mg / mL and 568 mg / mL for metabolites extracted with Me (OH), Et (OH) and DMSO respectively for the fungi *A. ochraceus*, *Fusarium sp.*, *A. niger* and *Penicillium*, and to witness Fegatex, the minimum concentration was 31 g / mL

Key words: *Cladosporium cladosporioides*, fungi, metabolites, CIM.

3 INTRODUÇÃO

Com os resultados analisados por meio dos testes de esporulação e germinação com os fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., foi possível constatar o potencial dos metabólitos extraídos de *Cladosporium cladosporioides* com os diferentes diluentes. Em uma próxima etapa, tem-se a liofilização dos extratos acrescidos com extratores acetato de etila, dimetil sulfóxido, metanol e etanol. Este processo tem as seguintes vantagens, quando comparado com o processo convencional de secagem: a estrutura do material é mantida, a umidade é removida a baixas temperaturas, ocorre aumento da estabilidade do produto durante a estocagem e a minimização de várias reações de degradação, devido à fácil transição de material hidratado para desidratado.

Grande variedade de métodos laboratoriais pode ser empregada para medir a susceptibilidade *in vitro* de agentes antimicrobianos. Esses testes são também de grande importância em estudos sobre epidemiologia de resistência e em investigações sobre novos agentes antimicrobianos (National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 2000). Os principais métodos microbiológicos para a detecção de atividade antimicrobiana podem ser classificados em três tipos: ensaios bioautográficos, de difusão e de diluição (Rios et al., 1988).

A concentração inibitória mínima (CIM) tem sido calculada por métodos *in vitro* e utilizada como parâmetro para avaliar a atividade antimicrobiana por vários autores. A MIC é a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo em tubos ou em placas de microtítulo em um tempo específico (Davidson & Parish, 1989; NCCLS, 2000), sendo a efetividade antimicrobiana de um composto frequentemente descrita em termos de MIC (Mann & Markham, 1998).

Entretanto, a definição da MIC, muitas vezes, difere entre artigos publicados na literatura e tem sido um obstáculo para a comparação desses estudos.

Os métodos de diluição são aqueles nos quais os extratos ou as substâncias a serem testados são adicionados a meios de culturas líquidos ou sólidos adequados, previamente inoculados com o microrganismo teste. Após a incubação, o crescimento do microrganismo é determinado pela comparação direta ou turbidimétrica da cultura teste com o controle negativo (meio de cultura inoculado sem adição de substância inibidora) e positivo (Berghe & Vlietinck, 1991). O método de diluição em meio líquido é o que apresenta metodologia mais complexa, entretanto, é o mais preciso. Esse método é recomendado, principalmente, para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) (Rios et al., 1988).

O método de diluição pode ser realizado de várias formas, dentre elas, o método turbidimétrico (The United..., 2006) e a diluição em placa de microtítulo (Berghe & Vlietinck, 1991; Eloff, 1998; Brandão, 2004). Métodos que empregam placas de microtitulação são mais econômicos por permitirem avaliar simultaneamente diversas concentrações da substância potencialmente antimicrobiana (Mann & Markham, 1998).

O objetivo deste estudo foi determinar, por meio de métodos de diluição, a concentração inibitória mínima do extrato de *C. cladosporioides* acrescido dos extratores Et(OH), AcOEt, Me(OH) e DMSO contra os fungos *A. ochraceus*, *A. niger*, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. Determinou-se CIM como sendo a menor concentração que inibe o crescimento do microrganismo. Esse método apresenta a vantagem de ser quantitativo, podendo ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis como lipossolúveis (Mitscher et al., 1972 ; Rios et al., 1988) .

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Determinação da concentração inibitória mínima do extrato de *C. cladosporioides* com os extratores AcOEt, Et(OH), DMSO e Me(OH) contra os fungos *A. ochraceus*, *A. niger*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.

Os filtrados fúngicos foram obtidos a partir do processo descrito no subtópico Preparo do extrato, no tópico Meios de cultura/Materiais e Métodos, do Capítulo 2. Cerca de 1 litro de cada filtrado foi submetido ao processo de liofilização (liofilizadora Liobras), que consiste na remoção de água e outros solventes, com base no fenômeno da sublimação.

As soluções obtidas após o processo de liofilização foram armazenadas em câmaras frias, a 4°C, até serem submetidos a testes para se determinar a mínima concentração inibitória contra *A. ochraceus*, *A. niger*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.

Como testemunha positiva para os testes de CIM, empregou-se o produto Fegatex, agroquímico com propriedades bactericida, fungicida e esporicida, elaborado à base de cloretos de benzalcônio (N-cloreto alquil dimetil benzil amônio e N-cloreto alquil dimetil etil benzil amônio). Age por contato e induz à resistência localizada. Como testemunha negativa, utilizou-se suspensão de cada fungo testado, acrescido somente com meio de cultura BD.

4.1.1 Ensaio de diluição

O ensaio para a determinação da concentração inibitória mínima é obtido por meio da macrodiluição que consiste em se preparar diluições sucessivas do antimicrobiano a ser testado em meios de cultura sólidos ou líquidos, semear os fungos em estudo e, após incubação, verificar a menor concentração (maior diluição) do antimicrobiano que inibiu o crescimento do microrganismo. Testes foram realizados para determinar a mínima concentração do extrato fúngico de

C. cladosporioides e sua atividade contra *A. ochraceus*, *A. niger*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.

Foram pesados 0,5 mg do extrato fúngico liofilizado de *C. cladosporioides* + extratores, para serem dissolvidos em 40 Tween 80 a 1%.

Em seguida, à solução obtida foram adicionados 400 mL do meio de cultura BD (batata e dextrose sem ágar), autoclavado por 15 minutos, a 120°C. Na placa Elisa de 96 orifícios (diâmetro de 7 mm, altura 10 mm, volume 400 mL, deixada por 30 minutos em hipoclorito-concentração 1%, em seguida, lavada com água destilada e etanol, para ser deixada dentro da capela de fluxo laminar, sob influência de UV), 100 mL da solução + meio BD (preparados acima) foram pipetados nos dois primeiros orifícios; adicionaram-se 100 mL de meio BD ao 2º orifício e homogeneizou-se.

Foram transportados 100 mL da solução do segundo orifício para o terceiro, procedimento que foi repetido até o 10º orifício. Esporos dos fungos a serem testados foram coletados em água esterilizada, filtrados para a remoção dos micélios e a suspensão foi calibrada para $5,6 \times 10^6$ esporos/mL.

Em seguida, diluiu-se a suspensão de esporos em meio de cultura BD, na proporção de 1:50. Após o preenchimento dos orifícios, acrescentaram-se 100 mL de suspensão de esporos, em meio BD, nos orifícios de 1 a 10. Os testes foram realizados em duplicatas com placas diferentes.

4.1.2 Testemunhas do teste para *Aspergillus ochraceus*

Para testemunha positiva, foram dissolvidos 96 mL Fegatex (um fungicida, bactericida e esporicida que age por contato e tem marcante ação de choque), em 3 mL de DMSO, tendo 20 mL dessa solução sido diluídos em 1 mL do meio de cultura BD. Em seguida, colocaram-se 100 mL da solução Fegatex em DMSO/BD no 1º e no 2º orifício da placa Elisa. Adicionaram-se 100 mL de meio BD ao 2º orifício e homogeneizou-se.

Foram transportados 100 mL da solução do segundo orifício para o terceiro orifício; colocaram-se 100 mL do meio BD no terceiro orifício e homogeneizou-se. Esse procedimento também foi repetido até o 10^o orifício. Após o preenchimento dos orifícios, acrescentaram-se 100 mL de suspensão de esporos em meio BD nos orifícios de 1 a 10.

Para testemunha negativa, empregou-se suspensão de esporos de *A. ochraceus* diluída em meio BD, na proporção de 1:50. Em seguida, foram transportados 100 mL desta solução no primeiro e no segundo orifícios da placa Elisa. Adicionaram-se 100 mL de meio ao segundo orifício e homogeneizou-se. Retiraram-se 100 mL deste orifício para o terceiro orifício e esse procedimento foi repetido até o 10^o orifício.

4.1.3 Testemunhas do teste para *Aspergillus niger*

Para testemunha positiva, foram dissolvidos 96 mL de Fegatex, em 3 mL de DMSO, tendo 20 mL desta solução sido diluídos em 1 mL do meio de cultura BD. Em seguida, colocaram-se 100 mL da solução Fegatex em DMSO/BD no 1^o e no 2^o orifício da placa Elisa. Adicionaram-se 100 mL de meio BD ao 2^o orifício e homogeneizou-se. Foram transportados 100 mL da solução do segundo orifício para o terceiro orifício; colocaram-se 100 mL do meio BD ao terceiro orifício e homogeneizou-se. Esse procedimento também foi repetido até o 10^o orifício. Após o preenchimento dos orifícios, acrescentaram-se 100 mL de suspensão de esporos em meio BD nos orifícios de 1 a 10.

Para testemunha negativa, empregou-se suspensão de esporos de *Aspergillus niger* em meio BD, na proporção de 1:50. Em seguida, foram transportados 100 mL desta solução no primeiro e no segundo orifícios da placa Elisa. Adicionaram-se 100 mL de meio ao segundo orifício e homogeneizou-se e retiraram-se 100 mL deste orifício para o terceiro orifício. Este procedimento foi repetido até o 10^o orifício.

4.1.4 Testemunhas do teste para *Fusarium* sp.

Para testemunha positiva, foram dissolvidos 96 mL de Fegatex em 3 mL DMSO, tendo 20 mL desta solução sido diluídos em 1 mL do meio de cultura BD. Em seguida, colocaram-se 100 mL da solução Fegatex em DMSO/BD no 1º e no 2º orifício da placa Elisa. Adicionaram-se 100 mL de meio BD ao 2º orifício e homogeneizou-se. Foram transportados 100 mL da solução do segundo orifício para o terceiro orifício; colocaram-se 100 mL do meio BD ao terceiro orifício e homogeneizou-se. Esse procedimento também foi repetido até o 10º orifício. Após o preenchimento dos orifícios, acrescentaram-se 100 mL de suspensão de esporos em meio BD nos orifícios de 1 a 10.

Para testemunha negativa, empregou-se suspensão de esporos do fungo *Fusarium* sp. em meio BD, na proporção de 1:50. Em seguida, foram transportados 100 mL desta solução no primeiro e no segundo orifícios da placa Elisa. Adicionaram-se 100 mL de meio ao segundo orifício e homogeneizou-se e retiraram-se 100 mL deste orifício para o terceiro orifício. Este procedimento foi repetido até o 10º orifício.

4.1.5 Testemunhas do teste para *Penicillium* sp.

Para testemunha positiva, foram dissolvidos 96 mL de Fegatex em 3 mL DMSO, tendo 20 mL desta solução sido diluídos em 1 mL do meio de cultura BD. Em seguida, colocaram-se 100 mL da solução Fegatex em DMSO/BD no 1º e 2º orifício da placa Elisa. Adicionaram-se 100 mL de meio BD ao 2º orifício e homogeneizou-se. Foram transportados 100 mL da solução do segundo orifício para o terceiro orifício; colocaram-se 100 mL do meio BD ao terceiro orifício e homogeneizou-se. Este procedimento também foi repetido até o 10º orifício. Após o preenchimento dos orifícios, acrescentaram-se 100 mL de suspensão de esporos em meio BD nos orifícios de 1 a 10.

Para testemunha negativa, empregou-se suspensão de esporos de *Penicillium* sp. em meio BD, na proporção de 1:50. Em seguida, foram transportados 100 mL desta solução no primeiro e no segundo orifícios da placa Elisa. Adicionaram-se 100 mL de meio ao segundo orifício e homogeneizou-se e retiraram-se 100 mL deste orifício para o terceiro orifício. Este procedimento foi repetido até o 10º orifício.

Após o preenchimento das testemunhas, colocou-se uma placa Elisa vazia sobre a placa na qual foram montados os testes, a qual foi envolvida com rolopac e armazenadas na câmara de germinação artificial com fotoperíodo de 12 horas, à temperatura de 25°C. As avaliações foram realizadas após 72 horas após a montagem dos testes. Todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas (capela de fluxo laminar mod. FL7752).

Após períodos de incubação, foram realizadas leituras da concentração inibitória mínima por meio da verificação visual do crescimento microbiano. Para interpretação dos resultados, foi considerada CIM a inibição total do crescimento microbiano visível.

Durante os testes, foram utilizados controles, com os meios de culturas e solvente utilizados na solubilização do extrato, a fim de verificar seu efeito sobre os microrganismos. A leitura dos resultados foi considerada válida somente quando houve crescimento microbiano nos controles (Souza et al., 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima do extrato de *C. cladosporioides* com os extratores AcOEt, Et(OH), DMSO e Me(OH) contra *A. ochraceus*

A CIM foi definida como a mais baixa concentração do material testado que inibe totalmente o crescimento visual dos fungos comparado ao grupo controle, analisado em triplicata (Zacchino, 2001). A determinação da CIM foi desenvolvida após a realização dos testes de esporulação e germinação dos fungos estudados.

Os extratos + extratores foram liofilizados para a remoção dos solventes para o desenvolvimento dos testes *in vivo* e para identificar e quantificar, por meio de análises químicas dos metabólitos produzidos. Esta extração implica em se obter material orgânico livre de sua matriz original (células e tecidos).

De acordo com os resultados dos CIM demonstrados na Tabela 11, pode-se perceber que os metabólitos extraídos dos filtrados de *Cladosporium cladosporioides* tiveram concentração mínima inibitória igual a 35,5 µg/mL como substâncias extraídas de Me(OH) e de 284 µg/mL para AcOEt e Et(OH).

Este resultado confirma o maior sucesso obtido com ambos os extratores nos testes de esporulação e germinação para *A. ochraceus*. Para substâncias extraídas com Et(OH) e DMSO, as concentrações mínimas inibitórias foram de 568 µg/mL.

Há relatos relacionados com CIM do extrato metanólico das partes aéreas de *Solanum palinacanthum*, o qual foi submetido a fracionamentos direcionados por testes, para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) do derivado do ácido cafeico contra *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e o fungo

Aspergillus ochraceus foram de 250, 1.000, 1.000 e >568 μ g/mL, respectivamente. Contra os mesmos organismos, os valores de CIM para a outra substância isolada de *Solanum* foram 1.000, >1000, >1000 e 35 μ g/mL

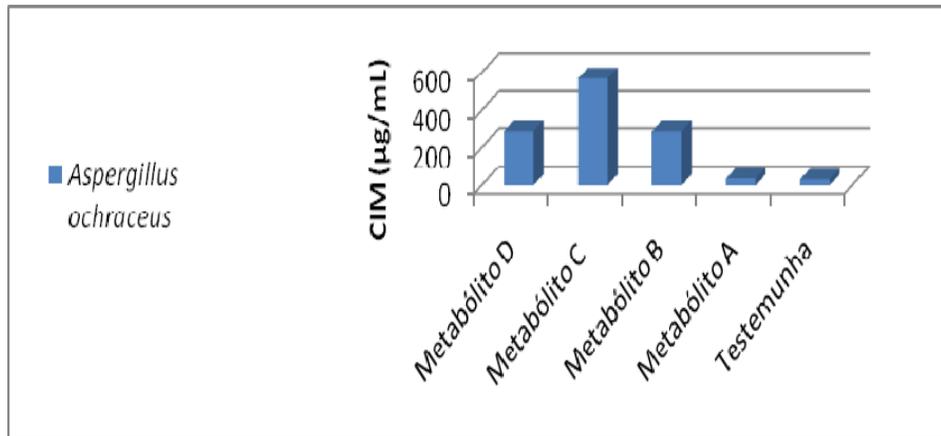


FIGURA 23 Mínima concentração inibitória dos metabólitos extraídos de extratos de *C. cladosporioides*. Metabolito A - extração com AcOEt; metabolito C - extração com DMSO; metabolito B - extração com Et(OH) e metabolito A - extração com Me(OH), para o fungo *A. ochraceus*.

TABELA 12 Determinação da mínima concentração inibitória ($\mu\text{g ml}^{-1}$) das frações obtidas do filtrado fúngico para *A. ochraceus*

<i>Tratamentos</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	10
Testemunha + ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 31	N 15,5	N 7,75	N 3,875	N 1,9375	D 0,9687	D 0,4844	D 0,2422	D 0,1210	D 0,0605
Testemunha -	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
BDC+Me(OH) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	N 284	N 142	N 71	N 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11
BDC + Et(OH) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	N 284	D 142	D 71	D 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11
BDC+ DMSO ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	D 284	D 142	D 71	D 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11
BDC + AcOEt ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	N 284	D 142	D 71	D 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11

*Testemunha positiva - Fegatex e testemunha negativa esporo/BD * BDC - extrato obtido a partir de meio BD+fungo *C. cladosporioides* * N - não ocorreu desenvolvimento do fungo * D - ocorreu desenvolvimento do fungo

5.2 Determinação da concentração inibitória mínima do extrato de *C. cladosporioides* com os extratores AcOEt, Et(OH), DMSO e Me(OH) contra *A. niger*

TABELA 13 Mínima concentração inibitória dos metabólitos obtidos de extratos de *C. cladosporioides*. Metabólito A - extração com AcOEt; metabólito C - extração com DMSO; metabólito B - extração com Et(OH) e metabólito A -extração com Me(OH).

<i>Tratamentos</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Testemunha + ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N	N	N	N	D	D	D	D	D	D
	31	15,5	7,75	3,87	1,9375	0,9687	0,4844	0,2422	0,1210	0,0605
Testemunha -	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
BDC+Me(OH) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	568	284	142	71	35,5	17,7	8,87	4,43	2,2	1,11
BDC + Et(OH) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	568	284	142	71	35,5	17,7	8,87	4,43	2,2	1,11
BDC+ DMSO ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	568	284	142	71	35,5	17,7	8,87	4,43	2,2	1,11
BDC + AcOEt ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N	N	D	D	D	D	D	D	D	D
	568	284	142	71	35,5	17,7	8,87	4,43	2,2	1,11

*Testemunha positiva - Fegatex e testemunha negativa esporo/BD * BDC - extrato obtido a partir de meio BD+fungo *C. cladosporioides* * N - não ocorreu desenvolvimento do fungo * D - ocorreu desenvolvimento do fungo

De acordo com os testes de esporulação, germinação e análises estatísticas desenvolvidas, foi possível determinar a porcentagem de ação dos metabólitos. Para o extrator AcOEt, como já discutido no capítulo anterior, obtiveram-se 54% e 60% de eficiência para esporulação e germinação, respectivamente e 46% e 51% para extração com metanol. A concentração inibitória mínima encontrada foi a partir de 284 $\mu\text{g/mL}$ para maior ação do metabólito extraído de AcOEt e 568 $\mu\text{g/mL}$ para metabólito extraído de Me(OH).

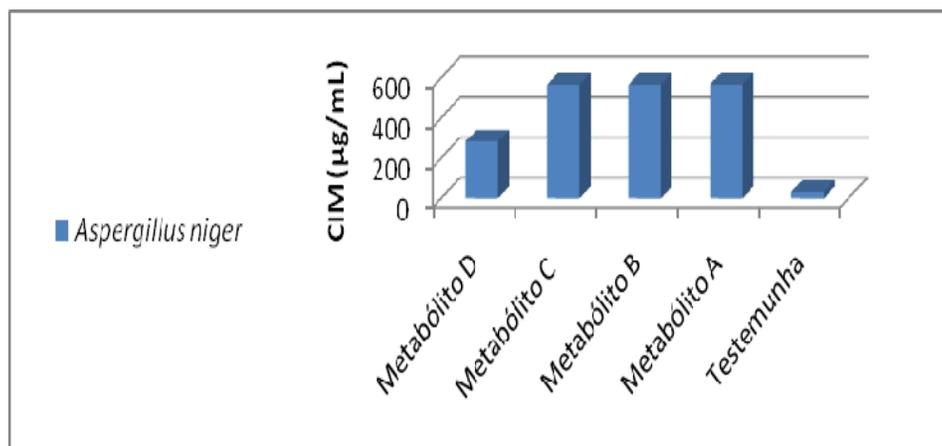


FIGURA 24 Mínima concentração inibitória dos metabólitos extraídos de extratos de *C. cladosporioides*. Metabolito A - extração com AcOEt; metabolito C - extração com DMSO; metabolito B - extração com Et(OH) e metabolito A - extração com Me(OH) para o fungo *A. niger*.

5.3 Determinação da concentração inibitória mínima do extrato de *C. cladosporioides* com os extratores AcOEt, Et(OH), DMSO e Me(OH) contra *Fusarium* sp.

TABELA 14 Determinação da mínima concentração inibitória ($\mu\text{g ml}^{-1}$) das frações obtidas do filtrado fúngico para *Fusarium* sp.

<i>Cavidades</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Testemunha + ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 31	N 15,5	N 7,75	N 3,875	D 1,9375	D 0,9687	D 0,4844	D 0,2422	D 0,1210	D 0,0605
Testemunha -	D	D	D	D						
BDC+Me(OH) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	N 284	N 142	N 71	N 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11
BDC + Et(OH) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	N 284	N 142	D 71	D 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11
BDC+ DMSO ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	D 284	D 142	D 71	D 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11
BDC + AcOEt ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	N 284	D 142	N 71	N 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11

*Testemunha positiva - Fegatex e testemunha negativa esporo/BD * BDC - extrato obtido a partir de meio BD+fungo *C. cladosporioides* * N - não ocorreu desenvolvimento do fungo * D - ocorreu desenvolvimento do fungo

Para o fungo *Fusarium*, pode-se concluir, a partir dos dados da Tabela 14, que a concentração mínima inibitória encontrada para atividade do metabólito extraído a partir de metanol foi muito significativa, igual a 35,5 µg/mL, de acordo com os testes de esporulação e germinação.

Obtiveram-se concentrações inibitórias de 142 µg/mL para extração com Et(OH) e 284 µg/mL para ação do metabólito extraído com AcOEt.

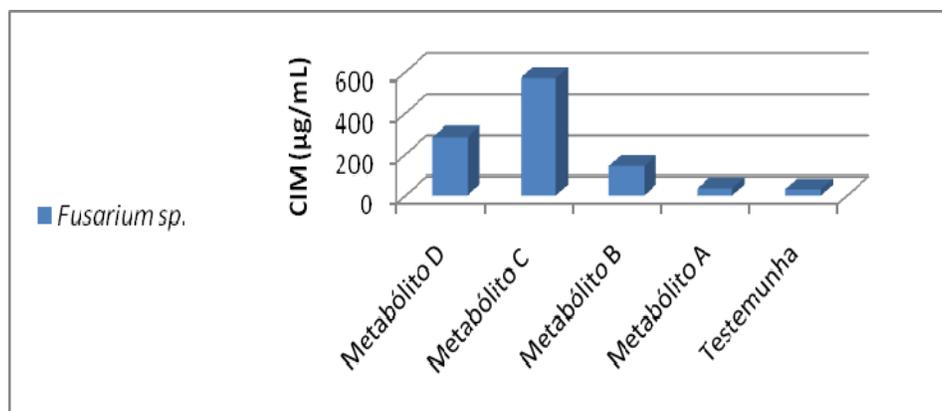


FIGURA 25 Mínima concentração inibitória dos metabólitos extraídos de extratos de *C. cladosporioides*. Metabólito A - extração com AcOEt; metabólito C - extração com DMSO; metabólito B - extração com Et(OH) e metabólito A - extração com Me(OH) para o fungo *Fusarium sp.*

5.4 Determinação da concentração inibitória mínima do extrato de *C. cladosporioides* com os extratores AcOEt, Et(OH), DMSO e Me(OH) contra *Penicillium sp.*

TABELA 15 Determinação da mínima concentração inibitória ($\mu\text{g ml}^{-1}$) das frações obtidas do filtrado fúngico para *Penicillium* sp.

<i>Cavidades</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>	10
Testemunha + ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 31	N 15,5	N 7,75	N 3,875	D 1,9375	D 0,9687	D 0,4844	D 0,2422	D 0,1210	D 0,0605
Testemunha -	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
BDC+Me(OH) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	N 284	N 142	D 71	D 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11
BDC + Et(OH) ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	N 284	D 142	D 71	D 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11
BDC+ DMSO ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	D 284	D 142	D 71	D 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11
BDC + AcOEt ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	N 568	D 284	D 142	D 71	D 35,5	D 17,7	D 8,87	D 4,43	D 2,2	D 1,11

*Testemunha positiva - Fegatex e testemunha negativa esporo/BD * BDC - extrato obtido a partir de meio BD+fungo *C. cladosporioides* * N - não ocorreu desenvolvimento do fungo * D - ocorreu desenvolvimento do fungo

Analisando-se os resultados obtidos com o fungo *Penicillium sp.*, percebe-se que a mínima concentração inibitória para metabólitos extraídos com Me(OH) foi de 142 µg/mL. Para inibição da esporulação, apresentou taxa de 79% e de 19% para redução da germinação para metabólitos extraídos com Et(OH). Para CIM, foi de 284 µg/mL. Em valores menores que este foi determinado o crescimento do fungo nas cavidades.

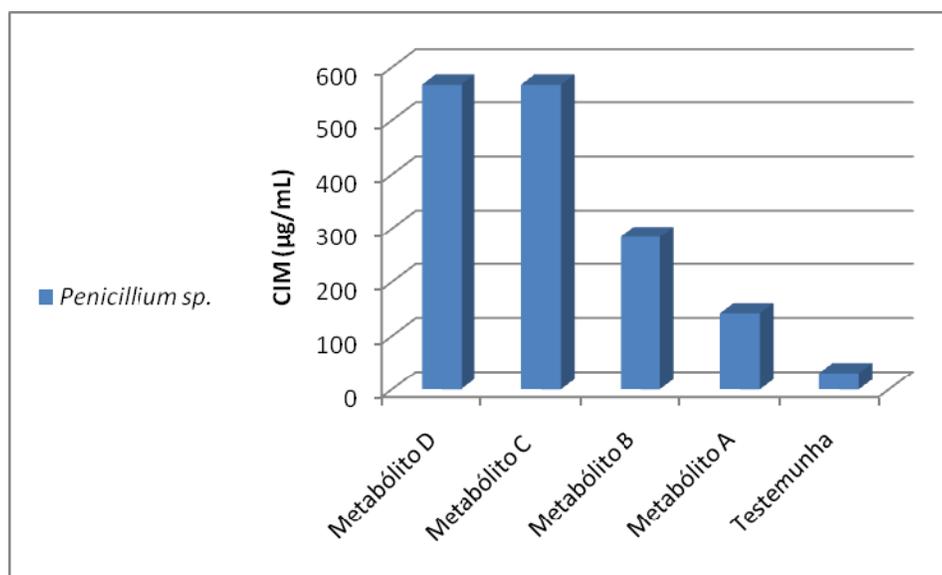


FIGURA 26 Mínima concentração inibitória dos metabólitos extraídos de extratos de *C. cladosporioides*. Metabolite A - extração com AcOEt; metabolite C - extração com DMSO; metabolite B - extração com Et(OH) e metabolite A - extração com Me(OH) para o fungo *Penicillium sp.*

TABELA 16 Determinação da mínima concentração inibitória das frações obtidas dos filtrados de *C. cladosporioides* para os fungos *A. niger*, *A. ochraceus*, *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.

Metabólitos	Concentração, em µg/mL			
	CIM			
	<i>A. niger</i>	<i>A. ochraceus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
Extrato+extrator Me(OH)	568	35,5	35,5	142
Extrato+extrator Et(OH)	568	284	142	284
Extrato+extrator DMSO	568	568	568	568
Extrato+extrator AcOEt	284	284	284	568
Testemunha +	31	31	31	31

Os testes *in vitro* revelaram a concentração inibitória mínima para metabólitos extraídos de cada extrator. Pode-se concluir que os metabólitos extraídos pelo extrator Me(OH) evidenciaram que a concentração mínima inibitória para inibição de esporulação e germinação dos fungos *Fusarium* e *A. ochraceus* foi de 35,5 µg/mL, sendo, ainda, para o *A. niger* uma concentração mais alta quando extraído de 568µg/mL e *A. ochraceus* de 142 µg/mL.

A concentração mínima inibitória para os outros fungos *A. niger* variou de 568 a 284 µg/mL e *Penicillium* sp. variou de 142 µg/mL a 568 µg/mL, de acordo com cada extrator.

6 CONCLUSÕES

O extrator Me(OH) mostrou-se o mais eficaz na inibição dos fungos testados, com a menor CIM, exceto para o fungo *A. niger*, em que o melhor extrator mostrou ser o acetato de etila.

Pesquisas futuras estão direcionadas a este trabalho com seleção e formulação de substâncias bioativas obtidas de microrganismos com efeitos antagônicos sobre fungos toxigênicos deterioradores da qualidade e patogênicos ao cafeeiro, a fim de se desenvolver formulações a partir das substâncias bioativas testadas, visando à aplicação em condições de campo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGHE, D. A. V.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.) **Methods in plant biochemistry, assays for bioactivity**. London: Academic, 1991. p. 47-69.

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M. A. M.; TEPLOW, D. B.; STEVENS, D.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. **Microbiology**, New York, v. 148, p. 2675-2685, Sept. 2002.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, London, v. 432, n. 7019, p. 829-837, Dec. 2004.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**, Washington, v. 43, n. 1, p. 148-155, Jan. 1989.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programa e resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

GERASIMENYA, V. P.; EFREMENKOVA, O. V.; KAMZOLKINA, O. V.; BOGUSH, T. A.; TOLSTYCH, I. V.; ZENKOVA, V. A. Antimicrobial and antitoxic action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. extracts. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Redding, v. 4, n. 2, p. 48-54, 2002.

JACKSON, M.; TWADDLE, G. **Business process implementation: building workflow systems**. New York: ACM, 1997.

KOZIKOWSKI, A. P.; ADAMCZYK, M. Methods for the stereoselective cis-cyanoxyhydroxylation and carboxyhydroxylation of olefins. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 48, n. 3, p. 366-372, 1983.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, Amsterdam, v. 151, n. 1, p. 67-73, Feb. 2000.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 4, p. 538-544, Apr. 1998.

MITSCHER, L. A.; LOU, R.; BATHALA, M. S.; KLU, W. N.; BEAL, I. L., WHITE, R. Intimicrobial agents from higher plants: (I) introduction, rationale, and methodology. **Lloydia**: a quarterly journal of biological science, Cincinnati, v. 35, n. 2, p. 157, June 1972.

NASSINI, G.; ARNONE, A.; ASSANTE, G.; BAVA, A.; MORICCA, S.; RAGAZZI, A. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, um hiperparasita do fungo ferrugem. **Phytochemistry**, Oxford, v. 65, n. 14, p. 2107-2111, July 2004.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests**. Wayne, 2000.

RAND-LUBY, L.; POMMIER, R. F.; WILLIAMS, S. T. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. **Annals Surgery**, Philadelphia, v. 224, n. 4, p. 583-590, Apr. 1996.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 23, n. 2/3, p. 127-149, July/Aug. 1988.

ROSE, R. J.; HODGSON, D. R. **Manual of equine practice**. Philadelphia: Saunders, 1993. 532 p.

SOUZA, E.; GUTTIERI, M.; MCLEAN, R. Registration of 'Lolo' wheat. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 2, p. 734-735, Mar. 2003.

THE UNITED State Pharmacopedia. Washington, 2006. 3539p.

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 435-479.