

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

DANIEL ATAIDES

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO
FUNGO ENDOFÍTICO *Cochliobolus intermedius* ISOLADO DE
SABONETEIRA (*Sapindus saponaria* L.) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA.

Maringá
2011

DANIEL ATAIDES

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO
FUNGO ENDOFÍTICO *Cochliobolus intermedius* ISOLADO DE
SABONETEIRA (*Sapindus saponaria* L.) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Clemente
Co-Orientador: Prof. Dr. João Alencar Pamphile

Maringá
2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

A862c Ataidés, Daniel
 Caracterização química de compostos bioativos do fungo endofítico *Cochliobolus intermedius* isolado de saboneteira (*Sapindus saponaria* L.) e a avaliação da atividade antimicrobiana. / Daniel Ataidés. -- Maringá, 2011.

70. : il., figs., Color.

Orientador: Prof. Dr. Edimar Clemente.
Co-Orientador: Prof. Dr. João Alencar Pamphile.

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia - Linha de Pesquisa: Interações orgânicas.

1. Identificação química. 2. Metabólitos secundários. 3. Endófito. 4. Teste de antagonismo. I. Clemente, Edmar, orient. II. Pamphile, João Alencar, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Biológicas, Departamento de Biologia, Programa de pós-Graduação em Biologia - Linha de Pesquisa: Interações orgânicas. IV. Título

CDD. 21.ed. 547.7

JLM0000137

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

DANIEL ATAIDES

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO
FUNGO ENDOFÍTICO *Cochliobolus intermedius* ISOLADO DE
SABONETEIRA (*Sapindus saponaria* L.) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Edmar Clemente
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Veronica Elisa Pimenta Vicentini
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Lucimar Pereira Bonett
Universidade Paranaense

Aprovada em: 30 de agosto de 2011.

Local de defesa: Bloco 08, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Este trabalho eu dedico às pessoas mais importantes da minha vida, sem as quais, não teria a oportunidade de estudo e a vida não teria o menor sentido: Aos meus pais, José e Ivone, aos meus irmãos Danival, Grasiane, Rita e Julia, cada um deles, e especialmente a minha esposa Andreza, minha eterna namorada, pelo apoio em momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que torceram por mim durante este processo de aprendizagem e em especial,

Ao meu orientador professor Dr. Edmar Clemente pelo acompanhamento e orientação nesses dois anos de trabalho e por depositar confiança e credibilidade a mim e nas atividades propostas.

Ao meu co-orientador professor Dr. João Alencar Pamphile pela inestimável colaboração para a realização deste trabalho, de forma paciente e dedicada, sempre apoiando e direcionando nos momentos de maior dificuldade.

À professora Dra. Maria Helena Serragiotto e ao Professor Dr. Adriano Antonio da Silva pela imensa colaboração e acompanhamento durante as etapas para a caracterização química dos compostos isolados, a participação de vocês foi de imenso aprendizado.

Em primeiro lugar quero agradecer ao Autor da minha Vida, **Deus**, pelos meus maiores presentes, minha família e grandes e verdadeiros amigos, além das inúmeras oportunidades que colocou em meu caminho me mostrando nos momentos de dificuldade e desânimo, a força que eu precisava para continuar.

Em segundo, ao grande apoio que sempre recebi dos meus pais, Ivone e José, por entenderem as minhas escolhas, e o principal, me apoiar nelas, renunciando suas próprias para que eu pudesse começar a trilhar o meu caminho.

Aos meus colegas e companheiros de laboratório, Julio e Ravelly, pela amizade e respeito durante este período em que caminhamos juntos, diante de tentativas, erros, acertos, aprendizados, risadas e sábados intermináveis no laboratório!

A Andressa, merecedora de uma menção especial, devido à imensa ajuda nas horas de apoio nas dificuldades além da sua grande capacidade suportar as minhas limitações.

Aos colegas Valéria, Franciele, Marcos, George, Manuela e Camila, orientados da professora Maria Helena, e ao técnico Moacir do laboratório de química pela paciência e grande ajuda durante toda a etapa de caracterização química dos compostos.

Aos colegas da quarta turma do mestrado em Biologia Comparada – UEM e à Marcinha, nossa querida secretária, que sempre esteve ao nosso lado, de uma competência extraordinária.

E a todos aqueles não nomeados nestas folhas, mas que auxiliaram no meu caminhar durante esta importante etapa de minha vida.

EPÍGRAFE

“Existem sempre dois caminhos a seguir:

Aquele que todo mundo segue, e aquele que a nossa imaginação nos leva a seguir. O primeiro pode ser o mais seguro, mais confiável, menos crítico, o que você encontrará mais amigos, mas você será apenas mais um a caminhar.

O segundo, com certeza, será mais difícil, mais solitário, o que você terá maiores críticas, mas também, o mais criativo, o mais original possível. Não importa o que, nem quem você seja, ou que deseje na vida, a OUSADIA em ser diferente reflete na sua personalidade, no seu caráter, naquilo que você é. Pois é assim que as pessoas lembrarão de você um dia”.

(Ayrton Senna)

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO FUNGO ENDOFÍTICO *Cochliobolus intermedius* ISOLADO DE SABONETEIRA (*Sapindus saponaria* L.) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

RESUMO

Os fungos endofíticos são organismos que vivem em plantas saudáveis, dentro de seus tecidos intercelulares, apresentam, dentre muitas características, a capacidade de produzir uma enorme variedade de metabólitos secundários com um amplo espectro de utilização. O fungo endofítico *Cochliobolus intermedius* ainda pouco conhecido, pode efetivamente ser um bom produtor de compostos bioativos e foi isolado de *Sapindus saponaria* L. descrito na literatura, onde apresentou efeitos antimicrobianos, além de ser encontrado em ervas daninhas doentes. O objetivo deste trabalho foi o de obter metabólitos secundários produzidos a partir do fungo *C. intermedius*, a caracterização química destes e a avaliação da atividade antimicrobiana. Para tanto, o endofítico foi cultivado em caldo BD durante 7 dias, sem agitação e a uma temperatura de 28 °C. Posteriormente foi realizada a separação do caldo do micélio através de filtração seguida de centrifugação. O sobrenadante foi particionado com AcOEt resultando em um extrato que foi fracionado e utilizado para a identificação do composto. Após procedimentos cromatográficos (CCD e CC) seguidos, as frações foram devidamente submetidas à análise por RMN de ¹H (300 MHz) e ¹³C (75,5 MHz) para demonstração dos componentes químicos que resultou na identificação da curvularina, a partir da fração D. Testes de atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados demonstrando que a curvularina é a substância principal produzida por *C. intermedius*, com efeito inibitório ao crescimento dos fungos *Monilophthora perniciososa*, *Didymella bryoniae* e *Fusarium solani* f sp *glycines*, nas bactérias *Micrococcus luteus*, *Xanthomonas ax.pv. phaseoli*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus hyrae*. Os resultados permitem concluir que *C. intermedius* é um fungo endofítico que apresenta capacidade de agir contra o ataque de patógenos comprovando desta forma sua aplicação biotecnológica e como controle biológico.

Palavras-chave: identificação química, metabólitos secundários, endófito, teste de antagonismo.

CHEMICAL CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF ENDOPHYTIC FUNGUS *Cochliobolus intermedius* ISOLATED FROM “SABONETEIRA” *Sapindus saponaria*: Antagonism Test.

ABSTRACT

Endophytic fungi are organisms that live in healthy plants, inside of their intercellular tissues, presenting, among many features, the ability to produce a wide variety of secondary metabolites with a broad spectrum of use. The endophytic fungus *Cochliobolus intermedius* still little known, it may be a good producer of bioactive compounds, and it was isolated from *Sapindus saponaria* L. described in the literature because previous studies showed antimicrobial effects as well as being identified in sick weeds. The aim of this paper is to obtain secondary metabolites from *C. intermedius* the chemical characterization of these and antimicrobial activity. For this, the endophyte was grown in broth PDA (Potato Dextrose) for 7 days without agitation and a temperature of 28 ° C. Afterwards it was done the separation of the mycelium broth by filtration followed by centrifugation. The supernatant was partitioned with EtOAc resulting in an extract that was fractionated and used to identify compounds. After chromatographic procedures (TLC and CC) one after the other, the parts were analyzed by ¹H NMR (300 MHz) and ¹³C (75.5 MHz) to demonstrate the chemical components that result in the identification of Curvularina, from part D. Antibacterial and antifungal activities tests were done showing that curvularin is the main substance produced by *C. intermedius*, with inhibitory effect on growth of fungi *Moniliphtora perniciosa*, *Didymella bryoniae*, *Fusarium solani* f sp *glycines*, and bacteria *Micrococcus luteus*, *Xanthomonas ax.pv. phaseoli*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus hyrae*. The results indicate that *C. intermedius* is an endophytic fungus that has the capacity to act against the attack of pathogens, and thus proving their biotechnological applications and as a biological control.

Keywords: chemical identification, secondary metabolites, endophyte, antagonism test.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	ix
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	x
LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIACÕES.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv

CAPÍTULO I

1. Interação Fungo/Planta.....	16
2. Fungos Endofíticos	21
3. Metabólitos Secundários	24
4. Características do Fungo Endofítico e da Planta Hospedeira.....	29
5. Técnicas Cromatográficas e de Ressonância Magnética.....	33
6. REFERÊNCIAS.....	37

CAPÍTULO II

Resumo	53
Abstract	54
1. Introdução.....	55
2. Resultados e Discussão.....	56
2.1. Teste de atividade antifúngica.....	57
2.2. Teste de atividade antibacteriana.....	58
3. Parte experimental.....	59
3.1. Material fúngico.....	59
3.2. Fermentação e extração de compostos.....	60
3.3. Purificação e identificação dos constituintes químicos.....	60
3.4. Teste de atividade antifúngica.....	61
3.5. Teste de atividade antibacteriana.....	61
3.6. Análise estatística.....	62
4. Conclusão.....	62
5. Agradecimentos.....	62

6. REFERÊNCIAS.....	59
Guide for authors – Phytochemistry.....	75

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I

Figura 1: Molécula estrutural da Estreptomicina	27
Figura 2: Molécula Estrutural da Actinomicina, isolado a partir de bactérias do gênero <i>Streptomyces</i>	27
Figura 3: <i>Sapindus saponaria L.</i> , seus respectivos frutos e raízes	31
Figura 4: Molécula estrutural de um tipo de saponina conhecida como Solamina.....	32

Capítulo II

Figura 1: Curvularina cuja fórmula molecular é $C_{16}H_{20}O_5$	67
Figura 2a: Espectro de RMN de 1H (δCD_3OD ; 300MHz) da fração D.....	67
Figura 2b: Expansão do espectro de RMN de 1H (Região 2,50 a 3,50 ppm) da fração D.	68
Figura 3: Espectro de RMN de ^{13}C (δCD_3OD ; 75,5 MHz) da fração D.....	68
Figura 4a: Espectro de HSQC (δCD_3OD) da fração D.....	69
Figura 4a: Expansão de espectro de HSQC (região de 20 – 34 ppm) da fração D.....	69
Figura 5: Espectro de DEPT (δCD_3OD) da fração D.....	70
Figura 6: Teste de antagonismo e crescimento micelial de fungo fitopatígeno da espécie <i>M. pernicioso</i>	70
Figura 7: Teste de antagonismo e crescimento micelial de fungo fitopatígeno da espécie <i>F. solani</i> f sp <i>glycines</i>	71

Figura 8: Teste de antagonismo e crescimento micelial de fungo fitopatogéno da espécie *D. bryonae*.....71

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Capítulo II

Tabela 1: Dados de RMN ^1H e ^{13}C ($\delta\text{CD}_3\text{OD}$) da fração D e da curvularina-7-*O*- β -D-glucopranosídeo (Referencia).....72

Tabela 2: Crescimento micelial em direção ao disco tratado e controles.....73

Tabela 3: Formação de halo (mm) de inibição de desenvolvimento bacteriano.....73

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIACOES

AcOEt	Acetato de Etila
BuOH	Butanol
B.O.D.	Biochemical oxygen demand (Demanda bioquímica de oxignio)
CCL	Cromatografia em Coluna Liquida
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada analítica
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CH₂Cl₂	Diclorometano
D₂O	gua deuterada
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido deuterado
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MHz	Mega hertz
nm	Nanmetro
ppm	Parte por milhão
p/v	Peso/volume
pH	Potencial de hidrogênio
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrognio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
Rpm	Rotações por minuto
®	Marca registrada
δ	Deslocamento químico em partes por milhão
φ	Diâmetro
λ	Comprimento de onda
μg	Micrograma
μL	Microlitro
<i>d</i>	<i>Dupleto</i>

<i>dd</i>	Duplo-dupleto
<i>t</i>	Tripleto
<i>m</i>	Multipleto

Capítulo I

INTRODUÇÃO
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

INTRODUÇÃO

1- Interação Fungo/Planta

Existem associações entre os seres vivos, que são condições vitais para sobrevivência de determinadas espécies, que podem ser incapazes de conseguir por si mesmas, meios de sobrevivência, incluindo nutrientes e proteção contra espécies predadoras e parasitárias. E dentre elas, as mais encontradas e frequentes, estão às interações entre os fungos associados às plantas. Logo a sobrevivência destes organismos depende do sucesso de suas associações com outros seres vivos, dentre as quais, destacamos a interação ocorrida especialmente com as plantas, ou então, uma vez que estas podem também depender de sua capacidade de assimilar nutrientes do meio ambiente (VIVANCO et al., 2005).

Dentre o grupo de seres vivos, sem sombra de dúvidas, o que mais nos chama a atenção, é o grupo dos fungos, que durante muito tempo, foram considerados como vegetais e somente a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino à parte, o chamado “Reino Fungi”. Os fungos são organismos eucarióticos, que não possuem clorofila, por isso são heterotróficos, do ponto de vista nutricional, portanto, absorve componentes orgânicos como fonte de energia (RAVEN et al., 1992).

Do ponto de vista respiratório, são aeróbios em sua grande maioria, com algumas exceções que são anaeróbios estritos e facultativos. Podem ser uni ou multicelulares e reproduzem-se sexuada ou assexuadamente (CARLILE, WATKINSON e GOODAY, 2001).

A parede celular está presente e geralmente é formada por um açúcar denominado quitina, além de outros compostos como a galactose e a manana apresentando também celulose β -glucano. Apresentam formas filamentosas com células tubulares, denominadas hifas e o seu conjunto de micélio. O micélio dos fungos apresenta como principal função absorver nutrientes, podendo também apresentar funções específicas (GRIFFIN, 1994; ALEXOPOULOS et al., 1996; KAVANAGH, 2005).

Os fungos são aclorofilados, heterotróficos (quimiorganotróficos) com nutrição por um processo chamado de absorção, através da liberação de exoenzimas sobre o alimento. As moléculas são degradadas em formas mais simples, para possibilitar a absorção pelos fungos. Os fungos necessitam,

basicamente de Carbono (C), Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg), além dos micronutrientes.

Podem ainda apresentar fototropismo, necessitando de luz para o seu desenvolvimento, frutificação e pigmentação. A temperatura de crescimento varia entre 0 a 35°C. Apresentam uma variação de pH entre 3-8, com uma relativa tolerância a pH ácido (ALEXOPOULOS, et al., 1996).

Os fungos apresentam dois tipos de frutificações, uma forma chamada teleomórfica, que antigamente era denominada "forma perfeita" ou sexual, a outra é conhecida como frutificações assexuais ou clonais, anteriormente denominadas "forma imperfeita" e atualmente, anamórfica. Costumeiramente observamos que para cada espécie existe uma forma anamórfica e uma forma teleomórfica (GRIFFIN, 1994).

O modo de alimentação associado à fonte de nutrientes dos fungos permite separá-los em dois grupos principais:

Fungos saprófitos – fungos que vivem sobre matéria orgânica morta, criando estruturas reprodutoras a partir do micélio. Este tem grande importância nos ecossistemas, pois são decompositores, reciclando os elementos químicos vitais, como por exemplo, carbono, nitrogênio, fósforo, entre outros compostos. No entanto, esta capacidade de decomposição dos fungos pode ser um problema para o homem, uma vez que existem fungos capazes de destruir os cultivos, os alimentos, as roupas, os navios e mesmo certos tipos de plástico. A melhor maneira de proteger de fungos qualquer material é mantê-lo num meio o mais seco possível (CARLILE et al., 2001).

Fungos simbiotes – fungos que estabelecem relações simbióticas com seres autotróficos, tornando-os mais eficientes na colonização de habitats pouco hospitaleiros (CARLILE et al., 2001).

Uma importante associação simbiótica dos fungos são os micorrizos, associações entre as hifas e as raízes de árvores. Calcula-se que cerca de 90% das árvores de grande porte tenham micorrizos, sendo inclusive encontradas no registro fóssil. Este fato leva os cientistas a concluir que os micorrizos podem ter tido um importante papel na colonização do meio terrestre pelas plantas (BARBIERI; CARVALHO, 2001).

O fungo recebe da planta, nutrientes orgânicos e fornecem nutrientes minerais como o fósforo, cobre, zinco e água entre outros. As micorrizas

também ajudam na proteção das raízes contra infecções por parte de outros microrganismos do solo.

Segundo RAVEN et al., 1992 as micorrizas apresentam dois tipos principais:

Endomicorrizas – de longe as mais comuns, ocorrem em cerca de 80% das plantas vasculares, principalmente nos trópicos, onde os solos pobres e carregados positivamente impedem uma fácil absorção de fosfatos pelas raízes das plantas.

As hifas penetram na raiz e mesmo nas células vegetais, facilitando a absorção de nutrientes minerais. Estas associações não são específicas, existindo mais de 200 espécies de fungos em todo o mundo que formam endomicorrizas com os mais variados organismos vegetais;

Ectomicorrizas – características de certos grupos específicos de árvores ou arbustos de zonas temperadas, como as faias, carvalhos, eucaliptos e pinheiros.

As hifas formam um invólucro em torno das células das raízes, nunca as penetrando, porém aumenta enormemente a área de absorção, o que, aparentemente, as torna mais resistentes às rigorosas condições de seca e de baixas temperaturas além de prolongar a vida das raízes.

As ectomicorrizas desempenham o papel dos pelos radiculares, ausentes nestas circunstâncias. Neste caso, parece existir um elevado grau de especificidade nestas relações simbióticas, estando mais de 5000 espécies de fungos, principalmente cogumelos, envolvidas na formação de ectomicorrizas.

Nas associações parasitárias o fungo vive dentro da planta, recebendo a designação de fitopatógeno, de onde obtém o alimento necessário para seu desenvolvimento, em detrimento ao hospedeiro (RICHARDSON, 1999).

Neste caso, geralmente o metabolismo secundário do fungo é prejudicial à planta, quer pelo consumo de seus elementos vitais ou quer pela biossíntese de substâncias tóxicas para a mesma, onde então podemos dizer que existe patogenicidade podendo, eventualmente, levar a planta à morte (AGRIOS, 1988).

As plantas são organismos fixos, fato este que as obrigam a reconhecer os diferentes organismos que se encontram no seu entorno e responder aos mesmos, tais respostas ao seu ambiente, seja biótico ou abiótico, permitem as

plantas uma melhor distribuição de seus recursos para crescimento, reprodução e principalmente para defesa (VIVANCO et al., 2005).

Por isso não é surpresa que grande parte das suas reações de defesa, tenha reflexo direto na grande diversidade bioquímica não encontrada em nenhum outro grupo de organismos vivos. Fator este que nos leva a considerarmos o repertório bioquímico das plantas como sendo único e grandioso (VIVANCO et al., 2005).

A grande diversidade fitoquímica e o longo tempo de evolução deste metabolismo resultaram em interações de complexidade cada vez mais crescente (BARBIERI; CARVALHO; 2001).

Sabe-se também, que muitos dos metabólitos secundários acumulados e por sua vez produzidos pelas plantas são, denominados de fitoalexinas, são induzidos por microrganismos fitopatogênicos (PAXTON, 1981; BAILEY; MANSFIELD, 1984; DESJARDINS; SPENCER, 1989).

A idéia de que os compostos fitoquímicos, apresentavam uma função defensiva avançou por volta da primeira década do século XX, no momento em que, Marshall Ward, no ano de 1905 postulou que os “anticorpos” e as toxinas produzidas pela planta, desempenhavam uma função importante para bloquear todo tipo de processo infeccioso (VIVANCO et al., 2005).

Tais compostos defensivos poderiam potencialmente, ser encontrados, pré-formados, antes mesmo da instalação de uma infecção, ou então seriam sintetizados em resposta a esta infecção, sendo, portanto, induzíveis ou subsequente ao processo infeccioso (VIVANCO et al., 2005).

Existe ainda um extenso repertório de “metabólitos secundários”, presentes em concentrações variáveis, em todos os tecidos vegetais adultos, cuja função primordial parece ser a defesa contra invasões microbianas, além de servirem como uma barreira inicial contra a propagação de bactérias ou fungos dentro dos tecidos da planta, exercendo assim uma pressão seletiva sobre os patógenos potenciais (BARBIERI; CARVALHO, 2001; VIVANCO et al., 2005).

Com o passar do tempo percebeu-se que as plantas apresentavam uma enorme diversidade química de produtos, por ela produzidas, o que poderia ter ocasionado mutações em seus mecanismos de resistência, e sobrevivência, assim sendo, determinadas plantas tornavam-se agora, resistentes ao que

antes era um patógeno, tornado o mesmo um simples hóspede (ZHANG, SONG e TAN, 2006).

O que antes era uma relação desarmônica de parasitismo transforma-se agora em uma relação harmônica conhecida como simbiose, nestas associações simbióticas, a convivência entre fungos e plantas é pacífica, tendo em vista que estes organismos sobrevivem assintomaticamente a esta associação, portanto, convivem sem causar dano aparente ao seu hospedeiro, além de viver no interior das plantas e interagir diretamente com diferentes espécies (ZHANG, SONG e TAN, 2006).

Contudo, a presença destes microrganismos certamente influencia várias características presentes nas plantas conferindo as mesmas certos benefícios como, por exemplo, a produção de antibióticos além da produção de metabólitos secundários, que são de suma importância para a sua sobrevivência, levando a um melhor desempenho destas (CLAY, 1988), aumentando consideravelmente sua área foliar e também seu número de ramificações (LATCH; CHRISTENSEN, 1985); concedendo-lhes uma maior tolerância ao ataque de insetos (CARROLL; CARROLL, 1986; CLAY, 1988; CARROLL, 1986; AZEVEDO, 2000); além, é claro, da resistência a doenças, parasitas e herbivoria pela produção de toxinas (WHITE Jr.; MORROW, 1990).

Observamos então, que existe uma série de organismos que vivem em associação com as plantas, onde temos vários conceitos diferentes, onde o conceito de simbiose, que é estendido aos microrganismos das raízes. Além dos chamados endófitos, portanto diferem totalmente dos organismos denominados epífitos que crescem sobre os vegetais, além é claro dos fitopatógenos, que ocasionam doenças quando instaladas, dentro ou fora destes vegetais (BARBIERI; CARVALHO; 2001).

2- Fungos Endófitos

A palavra endófito significa dentro da planta (*endon* Gr. dentro; *phyton*, planta), podendo colonizar qualquer órgão do hospedeiro. O uso desse termo é tão amplo quanto a sua definição, espectro do potencial de plantas hospedeiras e habitantes, incluindo bactérias, fungos, algas e insetos (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Muitos desses fungos possuem função importante na adaptação e seleção de diferentes espécies vegetais. Ao longo da evolução, a presença de alguns deles em determinadas plantas permitiu que estas se desenvolvessem melhor e fossem mais resistentes tanto a ataques de insetos e outros animais herbívoros e de organismos que causam doenças, quanto a condições ambientais adversas, como baixa umidade ou elevadas temperaturas (OKI, FERNANDES e CORREA; 2008).

Como em qualquer outra relação parasita-hospedeiro ou hospedeiro-predador, ou hospedeiro-mutualista, fungos endofíticos e plantas apresentam uma relação ecológica representada por vales e picos: com os picos adaptativos ocupados pelos genótipos fungo-planta mais bem adaptados e os vales pelos menos adaptados. Uma simbiose especializada requer uma arquitetura morfológica, fisiológica e origens evolutivas bastante sólidas, de forma que tais interações possam evoluir e persistir ao longo do tempo (SAIKKONEN, WÄLI, HELANDER e FAETH; 2004).

Todos os micro-organismos que habitam, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, podem ser considerados um endófito, cujos exemplos mais conhecidos são, os fungos e bactérias que formam nódulos nas raízes das plantas, as quais estão associados, são bastante estudados, devido sua importância na agricultura, particularmente por sua participação na fixação de nitrogênio pelas plantas. Entretanto se observa uma distinção entre os endófitos, epífitas, que são aqueles organismos que vivem na superfície da plantas e fitopatógenos, que são causadores de doenças (ARNOLD, 2007).

Os fungos são denominados endofíticos particularmente quando se acredita que a associação é mutualística ou pelo menos não patogênica, ou ainda, seja uma infecção latente onde um patógeno latente está envolvido (LARRAN et al., 2002).

Agrios (1988) definiu infecções latentes como um estado onde o hospedeiro é infectado pelo patógeno, não demonstrando sintomas, persistindo a infecção até que os sinais ou sintomas forem solicitados a aparecer devido às condições ambientais ou nutricionais ou ainda pelo estágio de maturidade do hospedeiro ou do patógeno.

Alguns fungos endofíticos são conhecidos por produzir compostos que proporcionam aos tecidos da planta menor atração aos herbívoros, enquanto outras linhagens podem aumentar a resistência de plantas hospedeiras à seca, evidenciando assim que quando tais plantas passam por pressões de fatores, quer bióticos ou abióticos, a sua relação planta/endófito mostra-se ainda mais importante (ARNOLD, 2007).

O estudo da distribuição de endofíticos, biodiversidade e suas características bioquímicas também são de extrema importância dentro da fitopatologia para entender e melhorar a resistência da planta (LARRAN et al., 2002).

Os endófitos das partes aéreas dos vegetais têm despertado cada vez mais o interesse da comunidade científica, graças a indícios da grande potencialidade dos endofíticos, e da descoberta cada vez mais constante de características como a produção de compostos biologicamente ativos, antibióticos, fungicidas e herbicidas, fato este que nos leva a observar uma explosão de pesquisas sobre os endófitos de aproximadamente 0,8 artigos/ano na década de 70 para mais de 200 artigos/ano ao longo dos últimos seis anos (ARNOLD, 2007).

Vários tipos de hospedeiros estudados durante os últimos 20 anos apresentaram a colonização por endófitos. Os endófitos foram detectados em plantas crescendo em florestas tropicais, temperadas e boreais, com hospedeiros que vão desde plantas herbáceas em vários habitats diferentes, com uma distribuição geográfica que vai desde os pólos e passando pelos desertos. Além de serem encontrados em briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (ZHANG, SONG e TAN, 2006).

Alguns exemplos do uso de endofíticos é o controle de insetos, que são amplamente descritos na literatura, envolvendo as interações entre fungos e pastagens de gramas de países de clima temperado. Os mecanismos pelos quais os fungos endofíticos controlam os ataques de insetos incluem, fatores

genéticos, condições ambientais, a produção de toxinas além da influência destes compostos em plantas e animais (VIEGAS, 2003).

O controle biológico tem sido frequentemente utilizado, apoiado pelo desenvolvimento da pesquisa básica e aplicada na agricultura no Brasil e em toda América do Sul como relatam LECUONA, 1996; ALVES, 1998 e MELO; AZEVEDO, 1998.

De acordo com Souza et al., (2004), por apresentar vastas áreas agricultáveis e pelo fato da maioria do seu território estar na região tropical, o Brasil e os demais países da América Latina tem sua agricultura gravemente infectada por pragas agrícolas. O uso de agrotóxicos, embora mesmo diminuindo o ataque de insetos e microorganismos fitopatógenos, ainda representa um alto risco para trabalhadores de campo e para os consumidores, e além do fato de seu uso ser, em certos casos, economicamente inviável.

Por este motivo o controle de pragas e doenças através de processos biológicos, ou seja, pelo uso de microrganismos entomopatogênicos ou aqueles que inibem/ antagonizam outros microrganismos patogênicos as plantas, é uma alternativa que pode contribuir para reduzir ou eliminar o uso de produtos químicos na agricultura (SOUZA et al., 2004).

Os endófitos foram inicialmente considerados neutros, não causando benefícios nem prejuízos aparentes para as plantas, mas conforme os estudos foram se aperfeiçoando e tais organismos começaram a ser melhores estudados, observou-se que embora sem prejuízo aparente, eram essenciais ao desenvolvimento das plantas em que eles se instalavam como hospedeiros (AZEVEDO, MACCHERONI, PERREIRA e LUIZ ARAÚJO; 2000).

A transmissão desses fungos de uma planta para outra ocorre verticalmente ou horizontalmente. A transmissão vertical se dá de uma planta para suas 'filhas' por meio de sementes infectadas com material genético do fungo (ARNOLD et al., 2003; OKI, FERNANDES e CORREA; 2008). Assim sendo, algumas plantas, como por exemplo o capim pode ter uma maior proteção contra herbívoros graças à presença de fungos endofíticos em suas sementes, pois estes produzem substâncias tóxicas denominadas alcalóides, do grupo da cafeína e da cocaína dentre outras (OKI, FERNANDES e CORREA; 2008).

Já a transmissão horizontal ocorre no momento em que uma planta é infectada por esporos de fungos liberados por outra, que são por sua vez dispersados pelo vento, chuvas, animais e outros meios (ARNOLD et al., 2003; OKI, FERNANDES e CORREA; 2008).

O número de espécies de fungos endofíticos pode variar de acordo com a espécie de planta, a parte onde o invasor se instala (folha, caule e raiz, dentre outras) e a fase de desenvolvimento dessas partes, em geral, a riqueza desses fungos é maior nas folhas, e o número aumenta à medida que a folha se desenvolve. Outro fator que pode influenciar a quantidade desses fungos em uma planta é a estação do ano. Em regiões tropicais, porém, não foram verificadas variações na quantidade de fungos endofíticos entre as estações do ano (OKI, FERNANDES e CORREA; 2008).

A duração da fase de endofíticos, a capacidade de crescer dentro de meristemas vegetais, a reprodução e o modo de transmissão de fungos foliares, são os principais traços que devem corresponder às características morfológicas e da história de vida das plantas hospedeiras para persistir no tempo evolutivo. O tamanho e arquitetura, vida útil prevista, e idade de maturidade sexual da planta, restringe fortemente o padrão de crescimento do fungo no hospedeiro e também a frequência dos modos verticais e horizontais de transmissão, bem como a duração do período de latência de fungos foliares (SAIKKONEN, WÄLI, HELANDER e FAETH; 2004).

3- Metabólitos Secundários:

Os metabólitos secundários tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica moderna. É fato histórico que o desenvolvimento da química orgânica ocorreu conjuntamente ao estudo das plantas, principalmente a partir do século XIX, quando deram início aos primeiros estudos a respeito das plantas, com interesse puramente científico, e como resultado obtiveram isolamentos de alguns princípios ativos de plantas então chamadas de medicinais, de onde destacamos o isolamento e identificação dos princípios ativos, até hoje empregados no tratamento de certas doenças, como por exemplo, a morfina, a quinina dentre outros (MONTANARI; BOLZANI, 2000).

O desenvolvimento alcançado com as atuais técnicas de isolamento e identificação de produtos levaram nos dias de hoje, a um número próximo de um milhão de produtos naturais isolados a partir das mais variadas fontes, diversos fatores que tem levado a este acentuado desenvolvimento, dentre os quais destaca-se o surgimento de novas demandas, quer no tratamento de doenças, humanas ou em animais e na agricultura. Dentro das principais fontes de produtos naturais, os micro-organismos são as mais abundantes e uma das menos estudadas, oferecendo grandes possibilidades para a obtenção de novas estruturas e atividades biológicas (BRIZUELA, GARCÍA, PÉREZ e MANSUR; 1998).

Muitas das moléculas encontradas são usadas como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas, a maioria delas provem de um conjunto diversificado de compostos chamados metabólitos secundários, um termo utilizado por fisiologistas vegetais e colocado em uso geral para produtos microbianos. Entretanto ao contrário dos compostos intermediários e co-fatores que participam na estrutura celular de sínteses e transdução de energia, os metabólitos secundários não são essenciais para o crescimento e metabolismo reprodutivo, entretanto tais compostos não podem de maneira alguma serem considerados como compostos sem importância (FERREIRA; AQUILA, 2000; TEODORO, 2004).

Os metabólitos Secundários têm estruturas químicas diversas, e uma intrincada estrutura molecular. Normalmente são produtos diferenciados de grupos específicos de alguns organismos, mesmo que de uma única espécie, algumas de suas especificidades, juntamente com o conjunto restrito e as condições fisiológicas, normalmente necessárias para sua produção, reforçam a idéia de que os metabólitos secundários não têm função essencial metabólica, contudo são produtos do metabolismo especializado e útil ao próprio organismo (TEODORO, 2004).

Os primeiros pesquisadores concentraram sua atenção sobre plantas, por causa da abundância de material de origem e a relativa facilidade com que poderiam ser recolhidos, no entanto, no século XX, a riqueza de metabólitos secundários produzidos por microrganismos começou a ser reconhecida e muito do interesse inicial consistia em estabelecer a estrutura química dos metabólitos. Os produtos pesquisados foram, geralmente, os produzidos em

grandes quantidades sob condições de cultivo bastante simples e facilmente isolado como compostos puros. Não surpreendentemente, muitas vezes eram as substâncias que tinham uma aparência conhecida pela sua cor ou então pela sua cristalinidade (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Antes da conhecida Era Antibiótica, conheciam-se, poucos produtos microbianos, e poucos foram realmente descobertos como resultado de sua atividade biológica. Uma das exceções foi o grupo de metabólitos de fungos, chamados alcalóides da cravagem ou esporão do centeio, de onde se purificou e isolou o princípio farmacologicamente ativo conhecido como ergotamina em 1907, de onde mais tarde também se isolou a substância conhecida como ácido lisérgico (LSD) (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

O uso de antibióticos pelo homem tem relatos muito antigos, como por exemplo, o uso de sapatos mofados por chineses para curar feridas infeccionadas nos pés (3000 anos a.C.), entretanto, o primeiro metabólito fúngico, reconhecido por sua eficácia foi, a penicilina, que é produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, cuja capacidade de inibir o crescimento bacteriano foi descoberta acidentalmente por Alexander Fleming, em 1928, e posteriormente isolado por ele mesmo (GALLO et al., 2008).

Entretanto o emprego em larga escala somente ocorreu no início da década de 40, resultado dos esforços dos pesquisadores ingleses Forey e Chain, que diminuiu o índice de mortandade de soldados de 39% durante a Primeira Guerra Mundial, para 3,9%, na Segunda Guerra, portanto o sucesso no resultado do uso da penicilina motivou sua produção industrial, tornando-se o primeiro medicamento produzido em grande escala, dando assim origem indústria farmacêutica (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Paul Vuillemin (1889) foi o primeiro a utilizar o termo antibiótico, mas Waksman, em 1941, definiu os antibióticos, como sendo substâncias produzidas por microrganismos com a capacidade de inibir o crescimento de outros microrganismos ou ainda, de destruí-los, mesmo em soluções diluídas, quando fez o isolamento da estreptomicina (Figura 01), que combate o bacilo da tuberculose (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

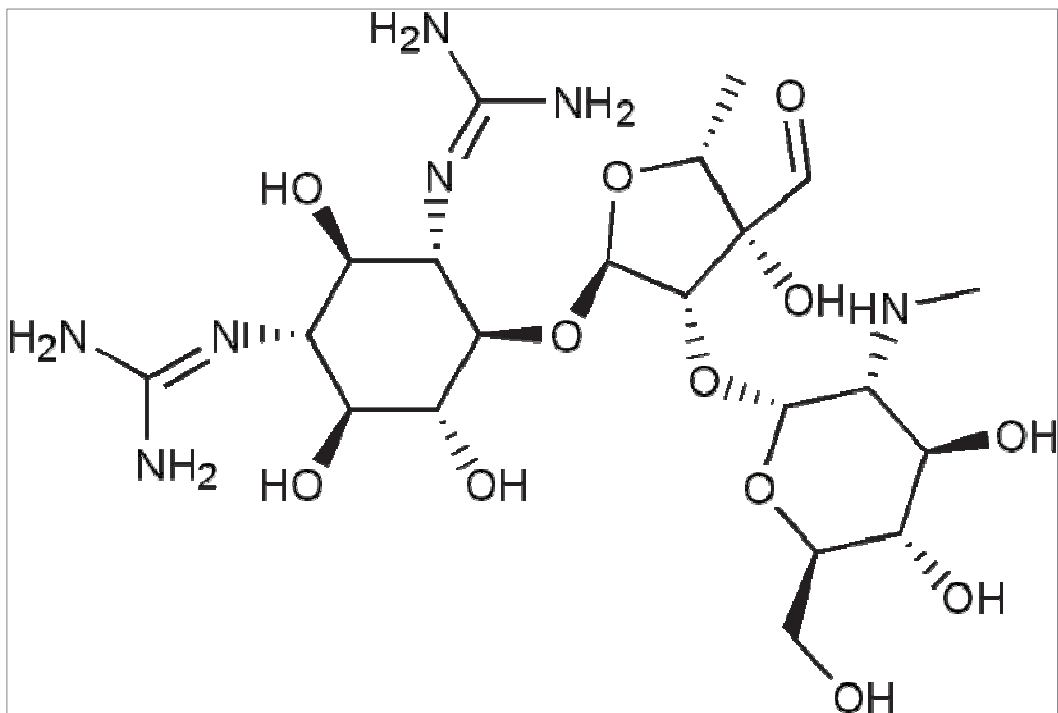


Figura 1: Molécula estrutural da Estreptomicina.

Waksman e equipe foram ainda responsáveis pelo isolamento e identificação do composto chamado de actinomicina (Figura 02), altamente letal para tuberculose, mas com efeitos colaterais graves aos humanos, além de ser utilizado como quimioterápico (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

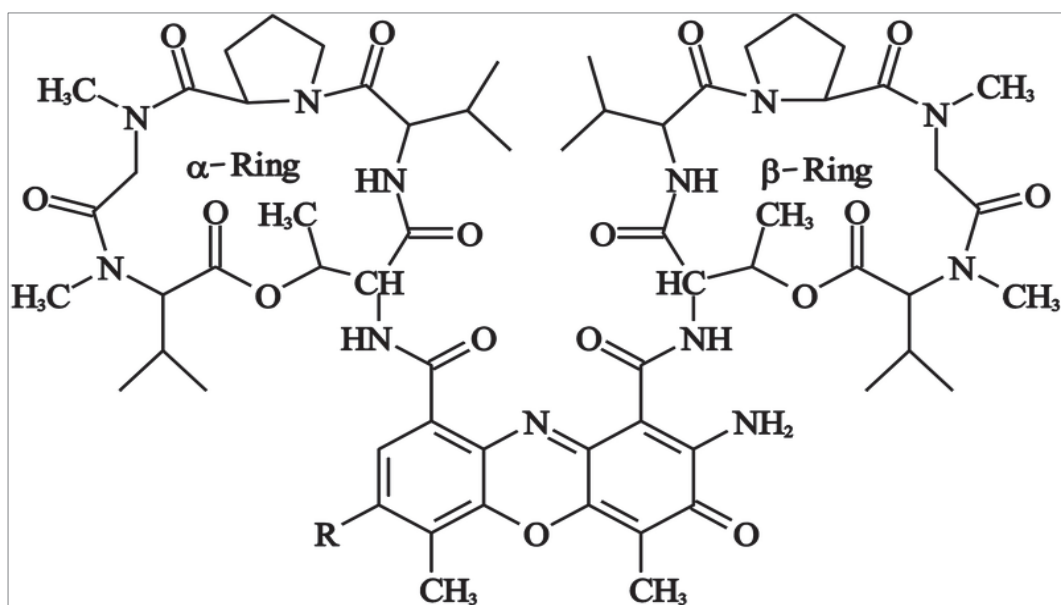


Figura 2: Molécula Estrutural da Actinomicina, isolado a partir de bactérias do gênero *Streptomyces*.

A descoberta dos antibióticos levou a um êxito momentâneo no combate às doenças onde, na década de 80, as indústrias farmacêuticas acreditavam que a guerra contra as infecções estava ganha, graças ao surgimento dos antibióticos produzidos a partir da fermentação microbiana e ao desenvolvimento de fármacos sintéticos, estes fatores levaram a um declínio das pesquisas nesta área, principalmente pesquisas ligadas a busca de novos antibióticos, a partir de fontes naturais. No entanto tem-se observado uma importante mudança no paradigma das grandes indústrias farmacêuticas, que tem feito com que os produtos de origem natural passem novamente a ocupar papel de destaque e levado a um retorno do interesse em novas classes de substâncias com atividade antibiótica (MONTANARI; BOLZANI, 2000).

Tais fatores de interesse são, por exemplo, o surgimento de novos alvos bacterianos ligados a evolução de doenças infecciosas, bem como o desenvolvimento de resistência aos antibióticos existentes pelas bactérias patogênicas, fator ligado ao uso indiscriminado de tais medicamentos, muitas vezes sem prescrição médica, ou ainda em subdosagens, ou então por um período de tempo insuficiente; toxicidade de alguns antibióticos em uso clínico, como é o caso da gentamicina, limitando seu uso; custo elevado da antibioticoterapia, principalmente para pessoas de baixa renda, que costumam ser mais susceptíveis a doenças infecciosas por estarem frequentemente expostas a condições sanitárias precárias; demanda de novas classes de pacientes ou de melhor adequação da antibioticoterapia a indivíduos imunossuprimidos, como por exemplo, portadores do vírus HIV, idosos, recém-nascidos e alérgicos dentre outros. Todos estes fatores, que justificam a necessidade por novas classes de antibióticos, talvez o mais sério seja a demanda por novos agentes antifúngicos, mais eficientes e de ação mais rápida, uma vez que segundo LEVY e MARSHAL em 2004, existem estimativas que mostram que cerca de 40% de todas as mortes por infecções hospitalares nos últimos anos tenham sido causadas por fungos. Observa-se que o uso de antibióticos pelo homem está limitado somente ao tratamento de infecções humanas, uma vez que tais substâncias podem também ter um amplo emprego na agricultura, em especial, os antibióticos com atividade fungicida, pois prejuízos econômicos causados pelas perdas de lavouras, de grãos e frutas

armazenados, causados pela presença de fungos, são preocupantes e altíssimos (LEVY; MARSHAL, 2004).

SCHULZ et al., (2002) isolaram, em doze anos de estudos, mais de seis mil e quinhentos fungos endofíticos de árvores e herbáceas, sempre em busca de novos metabólitos com potencial industrial, sugerindo que a associação entre fungos endofíticos e seus hospedeiros leve à produção de metabólitos secundários com atividade algum tipo de ação, quer seja antimicrobiana ou anti-herbicida.

Portanto todos estes fatores tornam os metabólitos secundários uma ampla e vasta fonte de pesquisa que visa o surgimento de novas substâncias químicas, que possam ajudar na tanto na indústria farmacêutica como na agricultura.

4- Características do Fungo Endofítico e da Planta Hospedeira:

Drechsler (1934) criou um novo gênero denominado de *Cochliobolus*, onde ele incluiria o grupo de espécies ascógenas com esporos de formato helicoidais e com anamorfos que são pertencentes ao gênero *Helminthosporium*, que inicialmente teriam sido referidos no gênero *Ophiobolus* (TINLINE, 1951), porém não transferiu *O. sativus* para o novo gênero (TINLINE, 1951). Dastur (1942) transferiu a referida espécie para o novo gênero, usando o binômio *Cochliobolus sativus* (TINLINE, 1951).

De acordo com WORAPATTAMASRI et al., (2009) O *Cochliobolus intermedius* R.R. Nelson (SIVANESAN, 1984) é a fase teleomórfica de *Curvularia intermédia*, Boedjin, cujo habitat é o caule de plantas lenhosas e herbáceas e também hospedeiros comuns de, trigo, arroz, soja, algodão, feijão, milho, sorgo, cenoura, tomate, girassol, azevém, ervilha e cebola (HANLIN; MENEZES, 1996).

Os níveis taxonômicos deste organismo são: Dominio Eukaria; Reino Fungi; Filo Ascomycota; Classe Dothideomycetes; Ordem Pleosporales; Família Pleosporaceae e por fim o Gênero *Cochliobolus*. *C. intermedius* possui conídios assimétricos, retos ou levemente curvos, elipsóides ou fusiformes, marrom com células apicais mais claras, usualmente com septo central e célula basal frequentemente mais estreita. Os conidióforos possuem cerca de 1 mm. Telemorfo obtido por pareamento de isolados compatíveis em meio de Sach,

cujo hospedeiros mais comuns seriam plantas daninhas doentes (LIMA; FURTADO, 2007)

Drechsler (1925) foi o primeiro que incluiu a fase teleomórfica de espécies de *Helminthosporium* no gênero *Ophiobolus* (1º *heterostrophus*). Mais tarde, o próprio Drechsler criou um novo gênero, *Cochliobolus*, o qual foi distinguido de *Ophiobolus* por possuir ascos grandes e ascósporos largos, sendo descrito por Drechsler em 1934, incluindo fungos com forma teleomórfica produtora de ascos com ascósporos helicoidais filiformes; tais ascos são raros na natureza (TINLINE; DICKSON, 1958; SIVANESAN, 1987).

Inicialmente o *C. intermedius*, foi isolado de capim-colchão (*Digitaria* sp.), doente, plantado e avaliado em estudos dentro de estufa pelo seu potencial como herbicida e de controle microbiano do capim-colchão (*Digitaria*). Alguns resultados indicaram que *C. intermedius*, poderia realmente ser um herbicida microbiano usado para o controle de capim-colchão em grandes culturas como soja, algodão e amendoim (TILLEY; WALKER, 2002).

Recentemente o *C. intermedius* foi encontrado e isolado por Garcia (2009) como endófito dos espaços inter e intracelulares das folhas de *Sapindus saponaria* L. (Figura 03), pertencente à família Sapindaceae, conhecida vulgarmente por saboneteira, saboeiro, sabão-de-macaco, sabonete e fruta-de-sabão, que é uma árvore nativa, perenifólia ou semidecídua, heliófita, de pequeno porte, podendo atingir até 8m, utilizada em paisagismo e em modelos de recuperação de áreas degradadas (PAOLI; SANTOS, 1998).

Apresenta copa densa e perfeitamente globosa. As folhas são compostas imparipenadas. Suas flores são brancas, dispostas em panículas. Os frutos contêm saponina. As sementes esféricas e duras, conhecidas como salta-martim, são utilizadas em artesanato (ALBIERO et al., 2001; LORENZI 2004; REYES 2008).



Figura 3: *Sapindus saponaria* L., seus respectivos frutos e raízes (Grisi, 2008)

Apresenta florescimento durante os meses de abril e junho. Seus frutos amadurecem durante os meses de setembro e outubro. A dispersão é barocórica e zoocórica, como por exemplo, morcegos frugívoros (PAOLI; SANTOS, 1998).

Sua ocorrência vai desde a Região Amazônica até Goiás e Mato Grosso, nas florestas pluviais e semidecíduas. A madeira é pesada, dura, compacta, de baixa durabilidade natural, pode ser empregada na construção civil e para confecção de brinquedos. É uma planta rústica e de crescimento moderado, indispensável para a composição de reflorestamento destinado a áreas degradadas de preservação permanente (PIO-CORREA, 1984 e LORENZI, 1992).

A casca, raiz e o fruto de *Sapindus saponaria*, são amplamente utilizados na cultura popular como calmante, adstringente, diurético, expectorante, tônico, depurativo do sangue, contra a tosse e tem propriedades cicatrizantes (ALBIERO et al., 2001; REYES 2008). O extrato do fruto

apresenta uma ampla atividade antifúngica (TSUZUKI et al., 2007), larvicida (SILVA et al., 2004; FERNANDES et al., 2005; BARRETO et al., 2006) e anti-hemorragica (CASTRO et al., 1999).

A planta da espécie *Sapindus saponaria* tem sido ainda muito estudada como produtora de interessantes metabólitos secundários, conhecidos como saponinas (Figura 4).

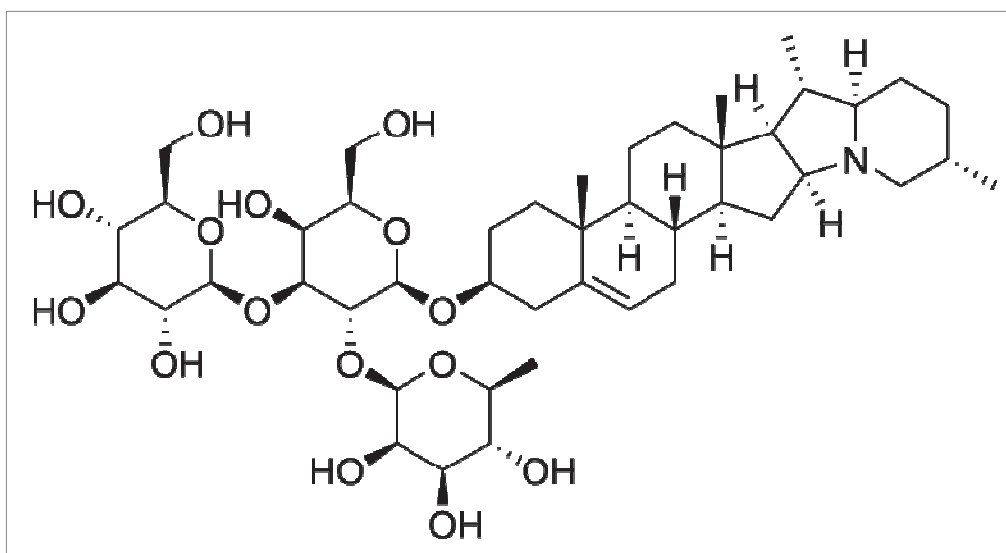


Figura 4: Molécula estrutural de um tipo de saponina conhecida como Solamina.

As saponinas em solução aquosa formam espuma, que diminui a tensão superficial da água. Essa atividade provém, como nos outros detergentes, do fato de apresentarem na sua estrutura, uma parte lipofílica, denominada aglicona ou sapogenina e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares (HOSTETTMANN; MARSTON; 1995).

As saponinas possuem atividades biológicas diversas como: ação moluscicida, atividade piscicida, e tóxica para vários animais, principalmente os de sangue frio, anti-inflamatória, analgésica, expectorante, antioxidante, espermicida, redutora de colesterol, antiviral, antibacteriana e antifúngica. Uma das teorias mais aceita para explicar a alta concentração de saponinas em muitas espécies de plantas de muitas famílias diferentes, é que estas funcionariam como proteção ao ataque de patógenos, sejam estes fungos, bactérias ou vírus (SIMÕES, 2007).

A partir disso, surge um crescente interesse no estudo mais aprofundado desses compostos, através de análises que venham a identificar e caracterizar os compostos encontrados. Esta planta foi escolhida por seu grande potencial medicinal e por apresentar como fungo endofítico o *Cochliobolus intermedius*, que apresenta, segundo a literatura, um potencial herbicida (TILLEY; WALKER, 2002).

5- Técnicas Cromatográficas e de Ressonância Magnética Nuclear:

Inicialmente, os extratos brutos obtidos, não poderiam ser plenamente identificados, então somente a partir do século XVII, com o desenvolvimento da química moderna, e das técnicas de separação, purificação que se tornou possível, finalmente, analisar as verdadeiras propriedades de tais extratos. (COLLINS; BONATO, 1990).

Estudos mais recentes demonstram vários compostos que foram isolados a partir de fungos endofíticos, dentre os quais destacamos os alcalóides, terpenóides, flavonóides e esteróis, que apresentam as mais variadas ações, como antibiótica, imunossupressora, enzimática e ainda antitumoral (GUO et al., 2008).

Dentre as muitas técnicas de separação, destaca-se a cromatografia, método introduzido pelo pesquisador e botânico russo chamado Michael Tswett, que em 1906 utilizou estes termos para descrever suas experiências com extratos de folhas e gema de ovo, usou para tanto, uma coluna cheia de carbonato de cálcio em pó, fazendo a lavagem com éter de petróleo (SKOOG et al., 2002).

De acordo com o trajeto percorrido pela amostra na coluna, foram surgindo bandas separadas com cores distintas, surgindo daí o nome da técnica, palavra de origem grega, onde “*chrom*” significa cor e “*graphe*” significa escrita, ou seja “escrita em cores” (SKOOG et al., 2002).

Dentre os diferentes tipos de métodos de análises, as técnicas cromatográficas ocupam um lugar de destaque tanto na química quanto na bioquímica, graças a sua grande eficiência na separação, identificação e quantificação das espécies químicas presentes em uma amostra, mesmo que constituída de misturas complexas (COLLINS; BONATO, 1990).

Das técnicas usadas, destacam-se duas, que foram aplicadas no desenvolvimento das atividades de laboratório: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e a Cromatografia em Coluna Líquida (CCL), que serão brevemente descritas a seguir.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de execução mais fácil e costumeira em laboratório de química orgânica, e consiste na análise de amostras muito pequenas (1-100µg). A CCD trata-se de uma técnica de adsorção líquido-sólido, onde a separação acontece pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. Por ser um método simples, rápido, visual e econômico, a CCD é a técnica predominantemente escolhida para análises rápidas, além de estabelecer se dois compostos são ou não idênticos, verificar a pureza de um determinado composto, determinar o número de componentes diferentes em uma dada mistura, bem como determinar o solvente apropriado para separação em uma coluna de cromatografia (DEGANI et al., 1998).

Na preparação da CCD, aplicamos uma camada fina do adsorvente finamente pulverizado, por exemplo, a sílica, podendo ser também usado, óxido de alumínio, e ainda adicionado algum material fluorescente à luz ultravioleta sobre uma placa lisa e plana de vidro. Alguns micro-litros (µL) da amostra são aplicados em uma das bordas da placa, a uma distância de 1 cm, através de um capilar delgado de vidro e a mesma imersa alguns milímetros em um solvente de eluição, mantido em recipiente fechado. O solvente, por força da capilaridade, faz o carregamento dos componentes da amostra, de forma ascendente e variando de acordo com sua polaridade, portanto diferentes compostos ascendem a diferentes alturas dependendo de suas estruturas moleculares, lembramos ainda que, esta técnica é especialmente útil no caso de compostos pouco voláteis ou sensíveis ao calor (DEGANI, CASS; VIEIRA; 1998).

Os compostos em análise, separados por meio de cromatografias, se apresentam incolores, acarretando desta na forma a necessidade se usar reveladores, que tem como finalidade mostrar a posição do composto na placa cromatográfica. Os reveladores mais costumeiramente são: vapores de iodo, para visualização em lâmpada ultravioleta (UV) visível, indicadores de fluorescência, considerados não destrutivos. Dentre os métodos destrutivos

temos o aquecimento das misturas de solventes, que colorem o rastro do analito, aquecimento a 150°C em chapa aquecedora como por exemplo o terpeno, ácido sulfúrico, *dragendorf* além de outros reveladores específicos para certos grupos funcionais tais como: nitrato de prata (para derivados halogenados), 2,4-dinitrofenilidrazina (para cetonas e aldeídos), verde de bromocresol (para ácidos) e ninidrina (para aminoácidos) (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

A segunda técnica muito utilizada é a cromatografia em coluna, aplicada na separação preparativa, purificação e também no fracionamento de substâncias orgânicas, geralmente utilizada após a CCD.

A cromatografia líquida em coluna (CC) é dividida em dois grupos distintos: a cromatografia líquida clássica, realizada em colunas de vidro, sob pressão de 1 atm, ou seja, atmosférica, com o fluxo da fase móvel ocorrendo graças à força da gravidade, e a cromatografia líquida de coluna metálica, de altas pressões e fases móveis elevadas, conseguida graças ao auxílio de uma bomba de alta pressão que empurra a fase móvel com uma vazão maior e portanto mais eficiente. Este processo é chamado de “*high performance liquid chromatography*” (HPLC) e no Brasil de CLAE, designado por “cromatografia líquida de alta eficiência” graças à sua elevada eficiência atingida na separação (COLLINS et al., 2006).

A coluna líquida simples, faz uso de um tubo de vidro de tamanho e calibre específico, montados de forma vertical, contendo o suporte sólido finamente dividido, a chamada fase estacionária, que em geral é de sílica gel ou óxido de alumínio. A substância que se deseja purificar ou a mistura que se quer fracionar é aplicada no topo da coluna, ela será chamada de fase móvel e a eluição da substância efetuada mediante a percolação com solvente adequado. Na parte inferior da coluna recolhe-se um número de frações, nas quais se encontram os componentes da mistura separados. A velocidade de tráfego de uma substância pela coluna depende de sua polaridade, da polaridade da fase estacionária e da polaridade do solvente (eluente) utilizado. Quando o composto é atraído pela fase estacionária e não pelo solvente, ocorre uma migração de forma lenta, entretanto se sua afinidade for maior pelo solvente, ocorrerá uma migração mais rápida, logo o êxito de uma coluna

depende da escolha do suporte sólido e do tipo de solvente adequados (DEGANI et al., 1998).

Após o fracionamento realizado por cromatografia, fazemos uso de outra técnica que ajuda na caracterização e identificação química dos compostos, esta técnica é chamada de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou espectroscopia.

O RMN é uma técnica importante para a investigação da molécula, pois permite obter a informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria, apresenta várias aplicações em diversas áreas científicas, por exemplo, na química esta técnica é frequentemente usada no estudo da estrutura dos compostos usando técnicas uni ou bidimensionais simples substituindo deste modo, as técnicas de cristalografia por raios X. Esta técnica não é destrutiva, permitindo a análise de compostos orgânicos e também inorgânicos (CORREIA, 2002).

A base teórica da espectroscopia de RMN foi proposta em 1924, por Pauli em 1924, sugerindo que determinados núcleos atômicos teriam as propriedades de spin e momento magnético e que conseqüentemente, a exposição a um campo magnético deveria levar a um desdobramento de seus níveis de energia. A partir dos postulados de Pauli, Bloch e Purcell descobriram em 1946, trabalhando de forma independente, demonstraram a capacidade que os núcleos apresentam de absorver radiação eletromagnética em um campo magnético intenso como conseqüência do desdobramento de níveis de energia induzido pelo campo magnético levando ambos ao premio Nobel de 1952 (SKOOG et al., 2002)

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma técnica muito utilizada na Química, Biologia dentre outras. Esta técnica de ressonância é utilizada para identificar diversos tipos de núcleos presentes em um composto químico, existe ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , ^{27}Al , ^{31}P e ^{15}N . Os espectrofotômetros RMN utilizados neste trabalho mais comumente analisados como o de ^1H e de ^{13}C (NETO, 2006).

Os aparelhos de ^1H utilizam ímãs supercondutores de campos magnéticos muito intensos e com pulsos curtos de radiação de radiofrequência, provocando a absorção de energia pelos núcleos de ^1H . A excitação destes núcleos condiciona um fluxo de pequena corrente elétrica em uma bobina que

envolve a amostra. O instrumento por sua vez amplifica a corrente exibindo o sinal, através de um pico ou então uma série de picos, que por sua vez exibindo um espectro legível (CORREIA, 2002).

Os espectros de RMN de ^{13}C por sua vez, são mais complexos e apresentam muitas linhas, graças aos diversos acoplamentos escalares com os núcleos de hidrogênio, em sua versão mais comum os núcleos de hidrogênio são irradiados durante todo o experimento, essa técnica é conhecida como desacoplamento heteronuclear em banda larga (MACEDO JUNIOR, 2007).

A técnica de RMN é aplicada, principalmente, em substâncias líquidas e também em sólidas, em soluções, existindo também, RMN de sólidos. Comumente se analisam substâncias líquidas, dissolvidas em solventes apropriados para cada tipo de análise, por exemplo, para se fazer um RMN de ^1H de uma substância que se dissolve em clorofórmio, este solvente necessita ser deuterado (CDCl_3) para que os sinais do próprio solvente não interfira na análise, outros tipos de solventes utilizados também são, acetona- d_6 , CD_3CN , DMSO-d_6 , MeOD , D_2O , dentre outras (NETO, 2006).

6. REFERÊNCIAS

AGRIOS G. N. **Plant Pathology**. 3ª ed. New York: Academic Press, p. 803, 1988.

ALBIERO, A. L. M.; BACCHI, E. M.; MOURÃO, K. S. M. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta Scientiarum**, v. 23, n.2, p. 549-560, 2001.

ALVES, S.B. **Controle Microbiano de Insetos**. Editora Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil. p.1163, 1998.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, 4ª ed. New York: John Wiley, Sons Inc., p. 869. 1996.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia – Princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, p. 187. 2003.

ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 40–65, 2001.

ARNOLD, A. E.; MEJIA, L. C.; KYLLO, D.; ROJAS, E. I.; MAYNARD, Z.; ROBBINS, N.; HERRE, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in Tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n. 26, p.15649-15654, 2003.

ARNOLD, A.E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51–66, 2007.

AZEVEDO, J. L. Microorganismos endofíticos. In: MELO, I. S. e AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**, Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, L. L.; MACCHERONI, JR.; PEREIRA, J. O. ARAUJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 40-65, 2000.

AZEVEDO, J. L. MACCHERONI, W. J.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microorganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, p. 233-268, 2002.

BAILEY, J.A.; MANSFIELD, J.W. **Phytoalexins**. Glasgow: Blackie, p. 334, 1982.

BARBIERI, R. L.; CARVALHO, F. I. F. de. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.7, n. 2, p. 79–83, 2001.

BARRETO, C. F., CAVASIN, G. M., SILVA, H. H. G., & SILVA, I. G. Estudo das alterações morfo-histológicas em larvas de *Aedes aegypti* (Díptera, culicidae) submetidas ao extrato bruto etanólico de *Sapindus saponaria* Lin (SAPINDACEAE). **Revista de Patologia Tropical**, v. 35, n. 1, p.37-57, 2006.

BILLS, G.; DOMBROWSKY, A.; PELAEZ, F.; POLISHOOK, J. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. **Tropical mycology: micromycetes**, v. 2, p. 165 - 194, 2002.

BODDY, L.; GRIFFITH, G. S. Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. **Sydowia**, v. 41, p. 41-73, 1989.

BRIZUELA, M. A.; GARCÍA, L.; PÉREZ, L.; MANSUR, M. Basidiomicetos: nueva fonte de metabólitos secundários. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.15, p.69-74, 1998.

CAFÊU, M. C. **Estudo químico e avaliação biológica dos fungos endofíticos *Xylaria* sp. e *Colletotrichum crassipes* isolados de *Carearia sylvestris* (Flacourtiaceae)**. Tese. 248f. (Doutorado em química) - Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2007.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. Londres, Academic. 2001.

CARROLL, G. C. The Biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; HEAVEL, J. Van Der (Eds.). **Microbiology of the Phyllosphere**. Cambridge: **Cambridge University Press**, p. 205-222, 1986.

CASTRO, O. GUITIÉRREZ, J. M., BARRIOS, M., CASTRE, I. & ROMERO, U. E. Neutralización del efecto hemorrágico inducido por veneno de *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae) por extractos de plantas tropicales. **Revista Brasileira Tropical**, v. 47, n. 3, p. 605-616, 1999.

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina “Química Orgânica”. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 560-562, 1997.

CLAY, K. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. **Ecologia**, v. 92, p.10-16, 1988.

CLAY, K. HOLA, J. Plant diversity in successional fields. **Science**, v. 285, p. 1742-1744, 1999.

CLAY, K. Fungi and the food of the goods. **Nature**, v. 427, p. 401 – 402, 2004.

COLLINS, C. H.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Editora da Unicamp, p. 279, 1986.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos em cromatografia**. Campinas: Editora da Unicamp, p. 454, 2006.

COLNAGO, L.A.; ALMEIDA, F. C. L.; VALENTE, A. P. Espectroscopia de massa e RMN multidimensional e multinuclear. Revolução do estudo de macromoléculas biológicas. **Química Nova na Escola**, v. 16, p. 9-14, 2002.

CONABIO (comp.). **Catálogo de autoridades taxonómicas de los hongos (Fungi) de México**. Base de datos SNIB-CONABIO. México, 2008.

CORREIA, D. P. **Espectroscopia de RMN**. Disponível em:
<<http://pt.scribd.com/doc/16778717/Monografiaespectroscopia-de-RMN>>.
Acesso em: 28 fevereiro de 2010.

COSTA, A. L. **Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C** . Disponível em: <<http://www.iq.usp.br/disciplina/qfl2144/2144-05-IVRMN.ppt#256>>. Acesso em: 20 abril de 2010.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q. B. e VIEIRA, P. C. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, 1998.

DESJARDINS, A. E.; SPENCER, G. F. Furanocoumarin phytoalexins, trichothecene toxins and infection of *Pastinaca sativa* by *Fusarium sporotrichioides*. **Phytopathology**, v.79, n.2, p.170-175, 1989.

DIAS, L. S. e DIAS, A. S. Metabólitos secundários como fontes de bioherbicidas: situação actual e perspectivas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 30, n.1, p.510-517, 2007.

DIENER, U. L.; DAVIS, N. D. Production of aflatoxin on peanuts under controlled environments. **Journal of Stored Products Research**, v. 5, n. 3, p. 251-258, 1969.

DUMAS, B.; FREYSSINET, G. e PALLETT, E. Tissue-specific expression of germin-like oxalate oxidase during development and fungal infection of Marley seedlings. **Plant Physiology**, v. 107, n. 4, p. 1091-1096, 1995.

ESPÓSITO, E; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Edusc, p. 510, 2004.

FAHEY, J. W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: Biologically active natural products (Capítulo 9). **American Chemical Society**, p. 120-128, 1988.

FERNANDES, F. F.; FREITAS, E. P. S.; COSTA, A. C.; & SILVA, I. G. Larvicidal potential of *Sapindus saponaria* to control of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p.1243-1245, 2005.

FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Londrina, v. 12, p. 175-204, 2000.

GALLO, M. B. C.; GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M. T. **Natural products from endophytic fungi**, In: SAIKIA, R.; BEZBARUAH, R. L.; BORA, T. C. **Microbial Biotechnology**, India: New India Publishing Agency, p. 139-168, 2008.

GARCIA, A. 2009. **Atividade antagonística *in vitro* de fungos endofíticos isolados de folhas de *Sapindus saponaria* L. contra fungos fitopatogênicos e bactérias patogênicas**. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada), Universidade Estadual de Maringá.

GOMES-FIGUEIREDO, J. A. 2004. 136 p. **Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp.** Dissertação. (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná.

GRIFFIN, D. **Fungal physiology**. 2 ed. New York: Willey, p. 472, 1994.

GROVE, J. F.; POPLER, M. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. **Mycopathologia**, v. 70, p. 103-105. 1980.

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

[GUO](#) H.; [SAMARAKOON](#) A.; [VANHAESEBROECK](#). B.; E [MALARKANNAN](#) S. The p110 δ of PI3K plays a critical role in NK cell terminal maturation and cytokine/chemokine generation. [The Journal of Experimental Medicine](#). v. 205, n.10, p. 2419-2435, 2008.

HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. **European Journal of plant pathology**, v. 102, n. 2, p. 155-162, 1996.

HANLIN, R. T.; MENEZES, M. **Gêneros ilustrados de ascomicetos**. UFRPE. Recife- PE, p. 274, 1996.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. E.; WOLFENDER, J.L.. Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine. p. 17-45. Clarendon Press, Oxford, 1995.

IAA/PLANALSUCAR. **Relatório anual: Programa nacional de melhoramento da cana-de-açúcar**, 116p, 1982.

IGNOFFO, C. M.; GARCIA, C. AND HOSTETTER, D. L. Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenous fungus *Nomuraea rileyi*. **Environmental Entomology**, v. 5, p. 935-936, 1976.

ISAKA, M., JATURAPAT, A., RUKSEREE, K., DANWISSETKANJANA, K., TANTICHAROEN, M., THEBTARANONTH, Y. Phomoxanthenes A and B, novel xanthone dimmers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1015–1018, 2001.

JEGOROV, A.; HAVLÍČEK, V. SEDMERA, P. Rapid screening of destruxins by liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 33, p. 274–280, 1998.

KAIJIANG, L.; ROBERTS, D. W. The production of destruxins by the entomogenous fungus, *Metarhizium anisopliae* var. major. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 47, n. 1, p. 120-122, 1986.

KAVANAGH, K. **Fungi: Biology and applications**. Hong Kong: Willey, p. 280, 2005.

KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HÜCHELHOVEN, R. Endophyte or parasite – What decides? **Current opinion in plant biology**, v. 9, p. 358-363, 2006.

KROHN, K.; MICHEL, A.; ROEMER, E.; FLOERKE, U.; AUST, H. J.; DRAEGER, S.; SCHULTZ, B.; WRAY, V. Biologically active metabolites from fungi Phomosines A–C. Three new biaryl ethers from *Phomopsis* sp. **Nat. Prod. Lett.**, v. 6, p. 309–314, 1995.

LARRAN, S. ROLLAN, C.; ÁNGELES, H. B.; ALIPPI, H. E. URRUTIA, M. I. Endophytic fungi in healthy soybean leaves. **Investigación Agraria: Producción y Protección Vegetales**, v. 17, n. 1, P. 173-178, 2002.

LATCH, G.C.M.; CHRISTENSEN, M. J. Artificial infection of grasses with endophytes. **Annals of Applied Biology**. 107: 17-24, 1985.

LECUONA, R.E. **Microorganismos patógenos empleados en el control Microbiano de insectos plaga**, Castelar, p. 338, 1996.

LEVY S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine Supplement**. v. 10, n. 12, p. 122-129, 2004

LI, H.; QING, C.; ZHANG, Y.; ZHAO, Z. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1515–1519, 2005.

LIMA, A.; FURTADO, M. Espécies do gênero *Curvularia* (fungos anamórficos: Hyphomycetes) na ilha de Santiago, Cabo Verde. **Portugaliae Acta Biologica**, v. 22: p. 145-156, Portugal, 2007.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flor, 2004.

- LUO, X.; MA, Y.; WU, S.; WU, D. Two Novel Azadirachtin Derivatives from *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 7, p. 1022-1024, 1999.
- MACEDO JUNIOR, F. C. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{13}C no estudo de rotas biossintéticas de produtos naturais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 116-124, 2007.
- MOHAMED, A. K. A. AND NELSON, F. R. S. Toxic effects of *Nomuraea rileyi* extract on *Heliothis* spp. **Journal of Agricultural Entomology**, v. 1, p. 349-353, 1984.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.
- MYOKEI, R.; SAKURAI, A.; CHANG, C. F.; KODAIRA, Y.; TAKAHASHI, N.; TAMURA, S. Structure of aspochracin, na insecticidal metabolite of *Aspergillus ochraceus*. **Tetrahedron**, v. 9, p. 695-698, 1969.
- NAKATANI, M.; IWASHITA, T.; NAOKI, H.; HASE, T.; Structure of a limonoid antifeedant from *Trichilia roka*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 1, p. 195-196, 1985.
- NETO, J. M.M. **Ressonância Magnética Nuclear**, Fundação de amparo à pesquisa do Piauí, 2006.
- OKI, Y.; FERNANDES, G. W.; CORREA, A.J. Fungos: amigos ou inimigos? **Ciência Hoje**. v. 42, n. 252, 2008.
- ONOFRE, S. B.; GONZALEZ, R. R.; MESSIAS, C. L.; AZEVEDO, J. L.; BARROS, N. M. LC₅₀ of the Peptide Produced by the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson Active Against Third Instar Larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Lep.: Noctuidae). **Brazilian Archive of Biology and Technology**, v. 45, n. 3, p. 269-275, 2002.

PAOLI, A. A. S.; SANTOS, M. R. O. Caracterização Morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sapindus saponaria* L. (SAPINDACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p.147-153, 1998.

PAMPHILE, J. A., ROCHA, C. L. M. S. C. da, AZEVEDO, J. L. Co-transformation of a tropical maize endophytic isolate of *Fusarium verticillioides* (synonym *f. Moniliforme*) with *gusA* and *niaA* genes. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 2, p. 253-258, 2004.

PAXTON, J.D. Phytoalexins - a working redefinition. **Phytopathology**, v. 101, p. 106-209, 1981.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L. ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: Status atual e perspectivas. Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. **Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica**. v. 3, n. 4, p. 69-72. Chile, 2004.

PEROTTI, R. On the limits of biological enquiry in soil science **Proceedings in International Society Soil Science**, v. 2, p. 146-161, 1926.

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J.; VAN DEN, J. **Microbiology of Phyllosphere**. Cambridge University Press, London, U.K, p.175-187, 1986.

POTT, A.; POTT, V.; **Plantas do Pantanal**. Brasília: Empresa Brasileira Agropecuária, p. 204, 1994.

PIO-CORREA, M. Dicionário das plantas úteis e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura Serviço de Informação**. v. 6, p. 246, 1984.

PYROZYNSKI, K. A.; HAWKSWORTH, D. L. Introduction and overview. In: PYROZYNSKI, K. A.; HAWKSWORTH, D. L. **Coevolution of fungi with plants and animals**. London: Academic Press, p. 1-29, 1988.

RAVEN, P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 5ª edição. Editora Guanabara Koogan S. A. – Rio de Janeiro, 1992.

REYES, A. E. L. Árvores Medicinais. Retirado em: 14 de Dezembro de 2010. Em <http://www.esalq.usp.br/trilhas/medicina/>.

RICHARD, J. L.; BENNETT, G. A.; MARACOS, C. M. Detection, identification, and surveillance of mycotoxins in cereals and other foods. **Fedrip database**, v. 3, p. 45-49, 1995.

RICHARDSON, M.D.; CABRERA, R.I.; MURPHY, J.A.; ZAUROV, D.E.. Nitrogen form and endophyte-infection effects on growth, nitrogen uptake and alkaloid content of Chewings fescue turfgrass. **Journal of Plant Nutrition**, v. 22, p. 67-79, 1999.

SAIKKONEN, K. WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, S. H. Evolution of the endophyte-plant Symbioses. **TRENDS in Plant Science**. v.9, n.6, 2004.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S. H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T. J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

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

SCHULZ, B; BOYLE, C. **The endophytic continuum**. The British Mycological Society, Cambridge, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, v. 6. ,p. 711-740. 2007.

SILVA, H. H. G., SILVA, I. G., SANTOS, R. M. G., FILHO, E. R., & ELIAS, C. N. Atividade larvicida de taninos isolados de *Magonia pubescens* St. Hil. (Sapindaceae) sobre *Aedes aegypti* (Díptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 396-399, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S. A., 1979.

SIVANESAN, A. **The bitunicate ascomycetes and their anamorphus**. J. Cramer, Germany, p.701, 1984.

SIVANESAN, A. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. **Mycological Papers**. v.158, p. 1-261, 1987.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed. São Paulo: Artmed, p. 836, 2002.

SOUZA, L. A. D. *et al.* Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazonica**. v. 2, 185-195, 2004.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência Tecnológica de Alimentos**, v. 18, p. 382-385, 1998.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D.; GROTHAUS, P.; BIGNAMI, G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 9, p. 1315 - 1324, 1995.

STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.

TAKAHASHI, J. A.; FERREIRA-LUCAS, E. M. Ocorrência e Diversidade Estrutural de Metabólitos Fúngicos com Atividade Antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TEODORO, J.C. Influencia das condições de alimentação por meio suplementar na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em batelada alimentada. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de São Carlos, p. 89, 2004.

TILLEY A.M.; WALKER H.L, Evaluation of *Curvularia intermedia* (*Cochliobolus Intermedius*) as a potential microbial herbicide for large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). **Academic Press: Biology Control**, p. 13-16, 2002.

TINLINE, R.D. Studies on the perfect stage of *Helminthosporium sativum*. **Canadian Journal of Botany**, v.29, p.467-478, 1951.

TINLINE, R.D.; DICKSON, J.G. *Cochliobolus sativus*. I. Perithecial development and inheritance of spore color and mating type. **Mycologia**. v.50, p.697-706, 1958.

TSUZUK, J. K., SVIDZINSKI, T. I. E., SHINOBU, C. S., SILVA, L. F. A., RODRIGUES-FILHO, E., CORTEZ, D. A. G., & FERREIRA, I. C. P. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79. n. 4, p. 577-583. 2007.

VARMA, J.; DUBEY, N. K. Efficacy of essential oils of *Caesulia axilaris* and *Mentha arvensis* against some storage pests causing biodeterioration of food commodities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 207-210, 2001.

VIEGAS, J. C., Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química. Nova.** v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VIVANCO, J. M.; COSIO, E.; LOYOLA-VARGAS. V. M.; FLORES, H. E. Mecanismos químicos de defesa en las plantas, **Investigación y Ciencia**, v. 341 p. 68–75, 2005.

VOLKSCH, B.; ULLRICH, M.; FRITSCH, W. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. **Microbial Ecology**, v. 24, p. 305-311, 1992.

WHITE Jr., J. F.; MORROW, A. C. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**. Lawrence. v.82, p.218-226, 1990.

WORAPATTAMASRI, J.; NINSUWAN, N.; CHUENCHIT, S.; PETCHARAT, V. Anamorphs of *Cochliobolus* on disease plants in Southern Thailand. **Journal of Agricultural Technology**, v. 5, n. 1, p. 143-155, 2009.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Reports**, v.23, p. 753-771, 2006.

Capítulo II

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO
FUNGO ENDOFÍTICO *Cochliobolus intermedius* ISOLADO DE *Sapindus*
saponaria: Teste de Antagonismo

Artigo elaborado e formatado conforme as
normas para publicação científica no periódico
Phytochemistry.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO FUNGO ENDOFÍTICO *Cochliobolus intermedius* ISOLADO DE SABONETEIRA (*Sapindus saponaria* L.) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

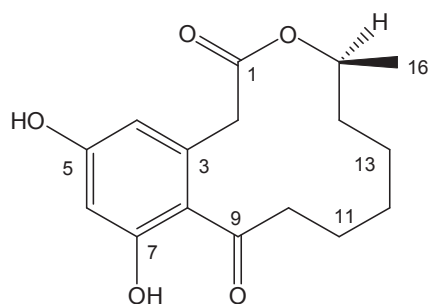
Daniel Ataides ^a, João Alencar Pamphile ^a, Maria Helena Sarragiotto ^b, Edmar Clemente ^{b,*}

^a Laboratory of Microbial Biotechnology - Department of Cell Biology, State University of Maringá, Paraná, Brazil;

^b Department of chemistry, State University of Maringá, Paraná, Brazil;

Graphical abstract

A curvularina é um composto derivado originalmente de *Curvularia lunata*, foi indicado como um composto de ação antimicrobiana.



Research Highlights

Isolamento e caracterização da curvularina derivado originalmente de *Curvularia lunata*, endófito de *Sapindus saponaria* L.

Composto bioativo curvularina, isolado de fungo endofítico, com atividade antimicrobiana.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS DO FUNGO ENDOFÍTICO *Cochliobolus intermedius* ISOLADO DE SABONETEIRA (*Sapindus saponaria* L.) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

Daniel Ataides ^a, João Alencar Pamphile ^a, Maria Helena Sarragiotto ^b, Edmar Clemente ^{b,*}

^a Laboratório de Biotecnologia Microbiana – Departamento de Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil;

^b DQI - Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil;

*Autor para correspondência. Tel.: +55 3011 3659; Endereço de email: eclemente@uem.br (E. Clemente).

Resumo

Os fungos endofíticos são organismos que vivem em plantas saudáveis, dentro de seus tecidos intercelulares, apresentam, dentre muitas características, a capacidade de produzir uma enorme variedade de metabólitos secundários com um amplo espectro de utilização. O fungo endofítico *Cochliobolus intermedius* ainda pouco conhecido, pode efetivamente ser um bom produtor de compostos bioativos e foi isolado de *Sapindus saponaria* L. descrito na literatura, onde apresentou efeitos antimicrobianos, além de ser encontrado em ervas daninhas doentes. O objetivo deste trabalho foi o de obter metabólitos secundários produzidos a partir do fungo *C. intermedius*, a caracterização química desses compostos e a avaliação da atividade antimicrobiana. Para tanto, o endofítico foi cultivado em caldo BD durante 7 dias, sem agitação e a uma temperatura de 28 °C. Posteriormente foi realizada a separação do caldo do micélio através de filtração seguida de centrifugação. O sobrenadante foi particionado com AcOEt resultando em um extrato que foi fracionado e utilizado para a identificação do composto. Após procedimentos cromatográficos (CCD e CC) seguidos, as frações foram devidamente submetidas à análise por RMN de ¹H (300 MHz) e ¹³C (75,5 MHz) para demonstração dos componentes químicos que resultou na identificação da curvularina, a partir da fração D. Testes de atividade antibacteriana e antifúngica foram realizados demonstrando que a curvularina é a substância principal produzida por *C. intermedius*, com efeito inibitório ao crescimento dos fungos *Monilophthora perniciososa*, *Didymella bryoniae* e *Fusarium solani* f sp *glycines*, nas bactérias *Micrococcus luteus*, *Xanthomonas ax.pv. phaseoli*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus hyrae*. Os resultados permitem concluir que *C. intermedius* é um fungo endofítico que apresenta capacidade de agir contra o ataque de patógenos comprovando desta forma sua aplicação biotecnológica e como controle biológico.

Palavras-chave: identificação química, metabólitos secundários, endófito, teste de antagonismo.

Abstract

Endophytic fungi are organisms that live in healthy plants, inside of their intercellular tissues, presenting, among many features, the ability to produce a wide variety of secondary metabolites with a broad spectrum of use. The endophytic fungus *Cochliobolus intermedius* still little known, it may be a good producer of bioactive compounds, and it was isolated from *Sapindus saponaria* L. described in the literature because previous studies showed antimicrobial effects as well as being identified in sick weeds. The aim of this paper is to obtain secondary metabolites from *C. intermedius* the chemical characterization of these compounds and antimicrobial activity. For this, the endophyte was grown in broth PDA (Potato Dextrose) for 7 days without agitation and a temperature of 28 ° C. Afterwards it was done the separation of the mycelium broth by filtration followed by centrifugation. The supernatant was partitioned with EtOAc resulting in an extract that was fractionated and used to identify compounds. After chromatographic procedures (TLC and CC) one after the other, the parts were analyzed by ¹H NMR (300 MHz) and ¹³C (75.5 MHz) to demonstrate the chemical components that result in the identification of Curvularin, from part D. Antibacterial and antifungal activities tests were done showing that *curvularin* is the main substance produced by *C. intermedius*, with inhibitory effect on growth of fungi *Moniliphthora pernicioso*, *Didymella bryoniae* e *Fusarium solani* f sp *glycines*, and bacteria *Micrococcus luteus*, *Xanthomonas ax.pv. phaseoli*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus hyrae*. The results indicate that *C. intermedius* is an endophytic fungus that has the capacity to act against the attack of pathogens, and thus proving their biotechnological applications and as a biological control.

Keywords: chemical identification, secondary metabolites, endophyte, antagonism test.

CAPÍTULO 2

1- Introdução

Os fungos endofíticos recebem este nome pelo fato de viverem em tecidos internos de vegetais de seus hospedeiros sem, contudo causar-lhes danos aparentes (Peixoto - Neto et al., 2002; Pamphile & Azevedo, 2004).

Estudos tem indicado que a presença destes microrganismos influenciam várias características presentes nas plantas, conferindo as mesmas, determinados benefícios como, por exemplo, a produção de substâncias de ação antibiótica, além da produção de metabólitos secundários, que são de suma importância para a sua sobrevivência, levando a um aumento na capacidade de desenvolvimento e desempenho destas (Clay, 1987) aumentando consideravelmente sua área foliar e bem como seu número de ramificações, concedendo também a estas, uma maior tolerância ao ataque de insetos (Azevedo, 2000; Peixoto - Neto et al., 2002); além é claro, da resistência a doenças e parasitas (Stone; Bacon & White, 2000) e antiherbivoria pela produção de toxinas (Stone; Bacon & White, 2000).

O *Cochliobolus intermedius*, foi isolado pela primeira vez da planta conhecida popularmente como capim-colchão que apresentava aspectos de doenças: a *Digitaria* sp. Esta planta foi avaliada em culturas controladas, afim de indicar o verdadeiro potencial como herbicida ou ainda de controle microbiano do fungo previamente identificado. Tais estudos realizados indicaram que *C. intermedius*, poderia apresentar potencial herbicida e antimicrobiano, com capacidade para ser utilizado para o controle de capim-colchão, bem como, em grandes culturas como soja, algodão e amendoim (Tilley & Walker, 2002), posteriormente, a espécie do fungo endofítico utilizado neste estudo foi isolada da espécie *Sapindus saponaria* L. uma árvore que compõem a vegetação do Pantanal, por Garcia (2009) com avaliação positiva de sua ação antimicrobiana. Os extratos metabólicos fracionados do fungo foram testados no presente trabalho, visando à detecção do composto químico majoritário presente neste extrato fúngico, bem como, a detecção de sua possível atividade antimicrobiana.

A atividade antimicrobiana dos metabólitos produzidos pelas espécies do gênero *Cochliobolus* é pouco conhecida, porém a interação desta espécie endofítica com o seu hospedeiro vegetal pode proporcionar uma variabilidade na composição dos metabólitos secundários induzido pela presença de um ou outro patógeno. Portanto, testes de atividade antibacteriana e antifúngica são costumeiramente realizados visando identificar o potencial

biológico deste endófito no controle de patógenos conhecidos, tanto de plantas quanto de humanos (Azevedo, 1998; Azevedo et al., 2002).

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo, realizar o isolamento seguido de identificação dos componentes químicos do extrato metabólico produzido por *Cochliobolus intermedius*, além de avaliar o potencial destes componentes isolados em testes de atividade antifúngica e antibacteriana de patógenos humanos ou de plantas.

2. Resultados e discussão

Um trabalho que apresenta o potencial biotecnológico da espécie fúngica em análise, no controle biológico foi o de Tilley et al. (2002).

Os processos de cromatografia tiveram como resultados a obtenção de 11 frações finais a partir do extrato de acetato de etila do fungo endofítico *Cochliobolus intermedius*. Destas frações, a análise em cromatografia de camada delgada demonstrou que algumas frações como a C e D, apresentaram um grau de mistura menor e similaridades no padrão de cromatografia em camada delgada, possibilitando o isolamento e a identificação da substância curvularina, podendo assim ser considerada majoritária, dentre o conjunto de metabólitos secundários produzidos por *C. intermedius*.

A fração D revelou um espectro de RMN ^1H característico. As análises dos dados de RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 1; Figura 2) comparados com dados publicados na literatura (Zhan e Gunatilaka, 2005), permitiram à identificação do composto majoritário como a curvularina (Figura 1).

A Curvularina é um macrolídeo produzido por um número de espécies de fungos espalhados por diversos gêneros, dentre eles a *Curvularia*, *Penicillium* e *Alternaria*, foram recentemente encontrados como inibidores da proteína 90 - HSP 90, uma chaperona que é envolvida no processo de sinalização, proliferação e sobrevivência celular (Aly et al., 2010), representando assim um alvo promissor para o tratamento de câncer, além de exibir um perfil biológico bem variado, podendo agir também como antibiótico, e de grande potencial herbicida (Jiang et al., 2007; Tilley & Walker, 2002).

Este importante macrolídeo foi primeiramente isolado de *Curvularia spp.* e posteriormente, a partir de *Penicillium steckii* (Vesonder et al., 1976).

Jiang et al. (2007), isolou um composto similar chamado de b-dehidrocurvularina, a partir do fungo endofítico conhecido como *Curvularia eragrostidis*, de interesse devido ao seu potencial como controle biológico da erva daninha *Digitaria sanguinalis*.

De acordo ainda com Jiang e seus colaboradores (2007), a fitotoxina teve ação inibitória significativa na germinação de sementes de *D. sanguinalis*, além de causar intensa necrose em folhas de muitas ervas daninhas conhecidas, enquanto milho e soja não apresentaram sensibilidade a ela, portanto, b-dehidrocurvularina foi considerado como um bioherbicida natural.

As demais frações obtidas, identificadas pelas siglas C_{Cristal}, EF e I, embora tenham sido testadas, após vários fracionamentos cromatográficos encontravam-se com pouca massa para a purificação, permanecendo as mesmas em estado de mistura e inviabilizando, portanto, a identificação das espécies químicas por RMN. Tais frações e compostos podem ser estudadas com mais detalhes em trabalhos futuros.

Embora a Curvularina seja isolada de um grande número de plantas e fungos endofíticos, inclusive do gênero *Curvularia* ainda não existem relatos da produção deste composto pelo gênero *Curvularia*, que é a fase anamórfica do *Cochiliobolus intermedius* isolado de *Sapindus saponaria* L. (Tilley e Walker, 2002).

2.1. Teste de atividade antifúngica

A avaliação do potencial biotecnológico das frações metabólicas C_{crystal}, D, EF e I obtidas a partir do endófito *C. intermedius*, contra diferentes fungos fitopatogênicos (Tabela 2), apresentaram resultados relevantes contra *Moniliphtora perniciosa* (figura 6), *Didymella bryonae* (figura 7) e *Fusarium solani* f sp *glycines* (Figura 8).

A curvularina é o principal constituinte da fração D e pode ser o responsável pela atividade inibitória contra os fungos patogênicos *M. perniciosa*, *D. bryonae* e *F. solani* f sp *glycines*. No caso das frações C_{crystal}, EF e I, observaram-se uma atividade inibitória muito parecida com a atividade da fração D, contra esses mesmos fitopatógenos. A análise estatística apresentou resultados estatisticamente significativos, em relação aos controles. Os resultados também mostraram que não houve inibição contra *S. sclerotiorum* e *Colletotrichum* sp. Tanto com *S. sclerotiorum*, como com *Colletotrichum* sp., houve crescimento padrão do micélio por toda a extensão da placa com exceção do controle positivo, uma das possíveis explicações pode ser o rápido crescimento rápido dos fitopatógenos.

Similarmente, Zhang e seus colaboradores (2008) trabalhando com o endófito *Microdochium bolleyi* isolado de *Fagonia cretica*, identificaram 4 metabólitos: monocerinas, hidroximonocerinas e fusarentinas. Tais metabólitos foram testados afim de detectar suas

propriedades antifúngica, antibacteriana e algicida contro os organismos, *Microbotryum violaceum*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, e *Chlorella fusca*. Os resultados obtidos demonstraram que os compostos isolados revelaram potencial de inibição aos 4 organismos.

Cafêu et al., (2005) identificaram a partir do extrato bruto produzido pelo fungo endofítico *Xylaria* sp., 5 compostos identificados como, ácido 2-hexilideno-3-metilbutanodióico, citocalasina D, 7-declorogriseofulvina, citocalasina B e griseofulvina. Estes compostos foram então selecionados para estudos graças à atividade apresentada por seu extrato bruto contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, indicando a produção de metabólitos com atividade antifúngica em potencial.

2.2. Teste de atividade antibacteriana

Nos testes contra as bactérias, foram usadas seis espécies patogênicas (*Micrococcus luteus*, *Salmonella typhi*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*). Foi observada uma ação das frações metabólicas contra cada uma delas, com uma diferença estatisticamente significativa em relação aos controles, de acordo com o tipo de fração (Tabela 3).

Garcia (2009) observou uma ação inibitória, significativamente positiva, dos compostos bioativos produzidos pelo endófito *C. intermedius* contra as bactérias, *Micrococcus luteus*, *Xanthomonas ax .pv. phaseoli*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Enterococcus hyrae*. Contudo, no presente trabalho, quando analisadas as frações metabólicas obtidas desse endófito de forma isolada, foram observados resultados característicos: A bactéria da espécie *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, nos resultados inicialmente observados por Garcia (2009) foi inibida pelo extrato metabólico de *C. intermedius*. No presente trabalho, houve inibição significativa da bactéria fitopatogênica pelas frações D e EF (Tabela 3), contudo, na ação da fração I, não foi detectada uma ação antibacteriana significativamente diferente dos controles negativos (Tabela 3). Com relação à fração C_{crystal} não foi observada a formação de halo de inibição. Contra a espécie *Micrococcus luteus*, todas as frações analisadas apresentaram atividade antibacteriana. Com relação à espécie *Staphylococcus aureus*, as frações C_{crystal}, D e EF, apresentaram atividade antimicrobiana. A fração I não apresentou a formação de halo de inibição. Contra a espécie *Escherichia coli*, somente a fração D apresentou atividade antibacteriana. Com relação à espécie *Enterococcus*

hyrae, nenhuma fração metabólica apresentou atividade antimicrobiana. As frações I e C_{cristal} apresentaram atividade inibitória contra a *Salmonella typhi*. O controle positivo empregado foi a tetraciclina, na concentração de 50 µg.mL⁻¹. Esses resultados, indicam um potencial de capacidade inibitória dos metabólitos fúngicos do endófito *C. intermedius* contra as seis espécies bacterianas analisadas.

É importante se destacar que quanto às avaliações da ação de frações metabólicas fúngicas e também de toxinas de uma forma geral, na natureza, tais toxinas raramente estão presentes isoladamente, uma vez que podem e devem interagir com outras substâncias promovendo um efeito potencializado, que possivelmente não ocorreria caso estas fossem empregadas de forma separada. Tal efeito de sinergia química pode ser a chave para o entendimento de resultados que são aparentemente contraditórios, em que a ação antimicrobiana dos extratos metabólicos fúngicos para determinadas frações se apresentam de forma divergente umas das outras (Cappelletty & Rybak, 1996, Corning, 2000).

Trabalhando com o *Cochliobolus intermedius*, utilizaram este endófito para o controle biológico de pragas de gramíneas, como o capim-colchão. Onde o fungo foi aplicado, observou-se sintomas de doenças típicas, a morte ou até mesmo o impedimento do crescimento deste tipo de erva daninha. Seus estudos indicaram que este fungo pode ser aplicado diretamente sobre as folhas, podendo até mesmo incluir aditivos tais como surfactantes de glicose, amido ou fécula, afim de melhorar a ação do fungo. Contudo, pouco acrescentaram sobre a capacidade desse endófito de agir contra fungos e bactérias patogênicas.

3. Parte Experimental

3.1. Material fúngico

O fungo endofítico *Cochliobolus intermedius* foi isolado do interior do tecido foliar da angiosperma pertencente à família Sapindaceae, *Sapindus saponaria* L., por Garcia (2009).

Este endofítico pertence ao laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Depois de purificada, a linhagem foi mantida em meio BDA suplementado com 1% (p/v) de extrato de levedura e caseína ajustado em pH 6,6.

3.2. Fermentação e extração de compostos

O *C. intermedius* foi inicialmente repicado em placas de petri com o meio BDA sob temperatura de 28 °C por 7 dias, antes da passagem para o meio líquido (BD).

A metodologia utilizada para obtenção dos metabólitos foi proposta por Rukachaisirikul e seus colaboradores (2008), onde 3 a 4 pedaços (aproximadamente 1 cm²) do meio de cultura sólido, contendo o micélio do fungo endofítico, foi inoculado em erlenmeyers contendo 250 mL do meio BD e deixados em câmara B.O.D. por 25 dias, sob temperatura de 28 °C, em condição estacionária. Após esse período, filtrou-se o conteúdo dos frascos, através de uma gaze dobrada quatro vezes e autoclavada, para separação do micélio do meio líquido fermentado, sendo o micélio descartado em seguida. O meio fermentado passou ainda por uma centrifugação à 3000xg durante 20 minutos para uma separação de outros resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para funis de separação para a realização, da partição líquido-líquido com o solvente, acetato de etila. A partição foi repetida duas vezes numa proporção de 1:1 (100 mL de solvente para 100 mL de meio fermentado). Em cada repetição utilizou-se agitação manual leve, para não formar mistura, os solventes foram coletados e evaporados em evaporador rotativo Marconi MA 120 à 40°C. O material concentrado resultou no extrato: acetato de etila.

3.3. Purificação e identificação dos constituintes químicos

O extrato de acetato de etila, foi analisado previamente por cromatografia em camada delgada (CCD), permitindo a visualização do perfil químico dos metabólitos presentes neste extrato. Posteriormente, foi utilizado outro método cromatográfico para a separação das substâncias. Foi então realizada uma cromatografia em coluna líquida (CCL) com a utilização de uma coluna de sílica gel como fase estacionária, LH-20 e do metanol (MeOH) como fase móvel, resultando em 80 frações (numeradas de 1-80).

Essas frações também foram analisadas em CCD para o agrupamento das semelhantes e daquelas que ainda apresentavam certo grau de mistura, o que resultou em 11 frações finais, nomeadas de A (0,0069g), B (0,0046g), C_{crystal} (0,0072g), C_s (0,1011g), D_s (0,0625g), D (0,0077g), EF (0,0435g), H (0,0428g), I (0,0151g) JK (0,0102g). Dentre as frações obtidas as Frações D, EF e I foram escolhidas para serem analisadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H (300 MHz) e de ¹³C (75,5 MHz) para elucidação das estruturas químicas presentes nas frações, a escolha destas frações se deu pelo fato de apresentarem um maior grau de pureza.

3.4. Teste de atividade antifúngica

Os fungos fitopatogênicos utilizados foram: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solani* f. sp. *glycines*, *Moniliophthora perniciosa*, *Colletotricum gloesporioides* e *Didymella bryoniae*, que pertencem também à coleção de microrganismos do (Biomic) laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá.

O teste de inibição dos fitopatógenos foi realizado de acordo com Gomes-Figueiredo (2004), com modificações. Os fungos cresceram em meio BDA durante sete dias à 28°C. Discos com diâmetro de Ø 6mm do micélio das colônias dos fitopatógenos foram inoculados em placa de petri e, em posição oposta com 4 cm de distância, foi colocado um disco de papel filtro esterilizado com diâmetro de Ø 6mm, onde inoculou-se 10 µL das frações: C_{crystal}, D, EF e I. As placas foram incubadas à 37 °C durante sete dias.

Foi avaliado o potencial de inibição medindo-se a distância percorrida pelo micélio, a partir do disco micelial inoculado na direção do disco de papel tratado. As medições ocorreram aos sete dias de crescimento, comparando-se os resultados com o controle negativo (água e MeOH) e positivo. No controle positivo foi utilizado o fungicida Derosal plus®, com diluição de 10⁻¹.

3.5. Teste de atividade antibacteriana

Durante a análise antibacteriana foi utilizada a técnica denominada “cup plate” ou difusão em disco. As frações purificadas da extração com acetato de etila foram inoculadas em discos de papel. As bactérias utilizadas no teste pertencem à coleção de microrganismos do laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Maringá (Biomic) e são as espécies patogênicas: *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhi*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*. As bactérias cresceram por 24 horas em meio Luria-Bertani (LB) de acordo com o trabalho descrito por Sambrook e Russel (2001), ajustadas a uma concentração de 10⁶ células por mL.

As bactérias foram semeadas (100 µL) em placas de petri com meio LB, sendo espalhadas com alça de Drigalsky, posteriormente, foi colocado quatro discos de papel Whatman n° 4 esterilizados com diâmetro de Ø 6mm, equidistantes e embebidos com 10 µL das frações: C_{crystal}, D, EF, e I, que foram previamente diluídas em MeOH na mesma concentração do antibiótico utilizado como controle. As placas permaneceram incubadas a uma temperatura de 37°C durante 24 horas. A atividade bacteriana foi avaliada pela formação

do halo de inibição de acordo com Souza e colaboradores (2004). Foi utilizado como controle positivo o antibiótico Tetraciclina (Sigma), na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, diluído em etanol absoluto. Os controles negativos utilizados foram a água destilada autoclavada e o MeOH. O teste foi sempre realizado em triplicata.

3.6. Análise Estatística

Todos os experimentos de análise da atividade inibitória das frações do extrato metabólico contra patógenos foram analisados utilizando-se o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 3 repetições. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias, com auxílio do programa Statistical Analysis System (SAS, 2001).

4. Conclusões

Conclui-se que o fungo endofítico *Cochliobolus intermedius* isolado da planta *Sapindus saponaria* L. apresenta uma produção metabólica cuja composição majoritária é de curvularina, conhecido já como uma toxina vegetal e fúngica produzida inclusive por fungos endofíticos do gênero *Curvularia*. Entretanto, este é o primeiro relato desta toxina produzida pela espécie do gênero *Cochliobolus*, endofítico de *S. saponaria* L.

A fração D que revelou a identificação da curvularina apresentou um bom potencial biotecnológico, com atividades antifúngica e antibacteriana.

5. Agradecimentos

Agradeço a meus orientadores Edmar Clemente e João Pamphile de Alencar, ao programa de Pós Graduação em Biologia Comparada na pessoa da Professora Dra, Carmem Lucia pelo voto de confiança e ensinamentos acima do científico.

6. Referências

Abdou, R., Scherlach, K., Dahse, H.M., Sattler, I., Hertweck, C. 2010. Botryorhodines A-D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, and endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. *Phytochemistry*, 71, 110-116.

Alves, S.B., Padua, L.E.M., Azevedo, E.M.V.M., Almeida, L.C. 1985. Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 20, 4, 403-406.

Alves, S.B., Rossi, L.S., Lopes, R.B., Tamai, M.A., Pereira, R.M. 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Journal of Invertebrate Pathology, 81, 2, 70-77.

Aly, A.H., Debbab, A., Edrada-Ebel, R.A., Müller, W.E.G., Kubbutat M.H.G., Wray, V., Ebel, R. & Proksch, P. 2010. Protein kinase inhibitors and other cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Stemphylium botryosum* isolated from *Chenopodium album*. Mycosphere, 1, 2, 153-162.

Azevedo, J.L. Microorganismos Endofíticos. 1998. In: Melo, I.S.E, Azevedo, J.L. Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Editora Embrapa, 117-137.

Azevedo, J.L.; Maccheroni, J.R.; Pereira, J.O. Araujo, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electronic Journal of Biotechnology, 3, 40-65.

Azevedo, J.L.; Maccheroni Jr,W.; Araújo, W.L.; Pereira, J.O. Microorganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. 2002 (Eds.). Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria. Caxias do Sul: EDUSC. p. 235-268.

Bernardi-Wenzel, J., García, A., Rubin filho, C.J., Prioli, A.J., Pamphile, J.A. 2010. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). Biological Research, 43, 375-384.

Bogorni, P.C. & Vendramim, J.D. 2005. Efeito subletal de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho. Neotropical Entomology, 34, 2, 311-317.

Cafêu, M.C., Silva, G.H., Teles, H.L., Bolzani, V.S., Araújo, A. R., Young, M.C.M, Pfenning, L.H. 2005. Substancias antifúngicas de *Xylaria* sp., Um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (RUBIACEAE). Quimica Nova. 28, 6, 991-995.

Cappelletty, D.M., Rybak, M.J. 1996. Comparison of Methodologies for Synergism Testing of Drug Combinations against Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40, 3, 677-683.

Carroll, G.C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkema, N.J., Heavel, J.V. (eds.). Microbiology of the phyllosphere. Cambridge: Cambridge University Press, 205-222.

Cole, R.J., Cox, R.H. Handbook of toxic fungal metabolites. 1981. New York: Academic press, 755.

Chomeheon, P., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Isarangkul, D., Kittakoop, P. 2005. 3-nitropropionic acid (3-NPA), a potent antimycobacterial agent from

endophytic fungi: is 3-NPA in some plants produced by endophytes? *Journal of Natural Products*, 68, 103-1105.

Culvenor, C.C.J., Edgar, L.A., Mackay, M. 1989. Structure elucidation and absolute configuration of phomopsin A, a hexapeptide mycotoxin produced by *Phomopsis leptostromiformis*, *tetrahedron*, 45, 8, 2351-2372.

Elsasser, B., Krohn, K., Florke, U., Root, N., Aut, H.J., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S., Kurtán, T. 2005. X-ray structure determination, absolute configuration and biological activity of phomoxanthone A. *European Journal of Organic Chemistry*, 21, 4563-4570.

Garcia, A. 2009. Atividade antagonística *in vitro* de fungos endofíticos isolados de folhas de *Sapindus saponaria* L. contra fungos fitopatogênicos e bactérias patogênicas. Dissertação (Mestrado em Biologia Comparada) Universidade Estadual de Maringá, Paraná.

Gomes-Figueiredo, J.A. 2004. Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp. Dissertação. 136f. (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná.

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

Horn, W.S., Schwartz, R.E., Simmonds, M.S.J., Blaney, W.M. 1994. Isolation and characterization of Phomodiol, a new antifungal from *Phomopsis*. *Tetrahedron Letters*, 35, 33, 6037-6040.

Horn, W.S., Simmonds, M.S.J., Schwartz, R.E., Blaney, W.M. 1995. Phomopsichalasin, a novel antimicrobial agent from an endophytic *Phomopsis* sp. *Tetrahedron*, 51, 14, 3969-3978.

Ignoffo, C.M., Garcia, C. and Hostetter, D.L. 1976. Effects of temperature on growth and sporulation of the entomopathogenous fungus *Nomuraea rileyi*. *Environmental Entomology*, 5, 935-936.

Jiang, S.J., Qiang, S., Zhu, Y.Z. & Dong, Y.F. 2007 Isolation and phytotoxicity of a,b-dehydrocurvularin. *Annals of Applied Biology*. 152 103–111.

Kenfield, D., Bunkers, G., Strobel, G.A., Sugawara, F. 1989. Fungal phytotoxins potential new herbicides. In: Graniti, A., Durbin, D.R., Ballio, A. *Phytotoxins and plant pathogenesis*. Berlin: Springer-verlag, 319.

Krohn, K., Michel, A., Roemer, E., Floerke, U., Aust, H.J., Draeger, S., Schultz, B., Wray, V. 1995. Biologically active metabolites from fungi Phomosines A–C. Three new biaryl ethers from *Phomopsis* sp. *Nat. Prod. Lett.*, 6, 309–314.

Martinez, S.S. 2002. O nim – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Instituto Agrônômico do Paraná, Londrina.

- Mohamed, A.K.A. and Nelson, F.R.S. 1984. Toxic effects of *Nomuraea rileyi* extract on *Heliothis* spp. *Journal of Agricultural Entomology*, 1, 349-353.
- Onofre, S.B., Gonzalez, R.R., Messias, C.L., Azevedo, J.L., Barros, N.M. 2004. LC_{50} of the peptide produced by the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) samson active against third instar larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Lep.: Noctuidae). *Brazilian Archive of Biology and Technology*, 45, 3, 269-275.
- Pamphile, J.A., Rocha, C.L.M.S.C. da, Azevedo, J.L. 2004. Co-transformation of a tropical maize endophytic isolate of *Fusarium verticillioides* (synonym *f. Moniliforme*) with *gusA* and *niA* genes. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 2, 253-258.
- Peixoto neto, P.A.S.; Azevedo, J.L. Araújo, W.L. 2002. Microrganismos endofíticos. *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*, 29, 62-76.
- Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., Rukachaisirikul, V., Sakayaroj, J. 2006. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. *Fems immunol. Med. Microbiol.*, 48, 367-372.
- Rukachaisirikul, V., Sommart U., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J. and Kirtikara K. 2008. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. PSU-D15. 68, 783-787.
- Sambrook, J. Russel, L.D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SAS. *Statistical Analysis System*. 2001. SAS Institute inc., Cary, NC, USA.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A., Krohn, K. 2002. Endophytic Fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, Cambridge, 106, 996-1004.
- Souza, L. A. D. et al., Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Bentham. **Acta Amazonica**. v. 2, 185-195, 2004.
- Stone, J. K.; Bacon, C. W.; White, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon, C. W.; White, J. F. (eds.) *Microbial endophytes*. New York: Marcel Dekker, Inc, 3-30.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67, 2, 257-268.
- Tilley, A.M., Walker, H.L. 2002. Evaluation of *Curvularia intermedia* (*Cochliobolus Intermedius*) as a potential microbial herbicide for large crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). *Academic Press: Biology Control*, 13-16.
- Vesonder, R.F., Ciegler, A., Fennell, D., Tjarks, W., and Jensen, A.H., 1976. Curvularin From *Penicillium baradicum*, and Biological Effects. *Journey Environment Sci Health*, 11, 4, 289-297.

Viegas Junior, C. 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química nova*, 26, 3, 390-400.

White, J. F.; Reddy, P. V.; Bacon, C. W. (2000) Biotrophic endophytes of grasses: a systemic appraisal. In: Bacon, C. W.; White, J. F. *Microbial endophytes*. (Eds.). New York: Marcel Dekker, 2000. p. 49-62.

Ye, M.Z., Han, G.Y., Fu, C.L. and Bao, J.R. 1993. Insecticidal toxin produced by the entomogenous fungus *Nomuraea rileyi*. *Acta Agricultural Zhejiangensis*, 19, 76-79.

Zhang, H.W., Song, Y.C., Tan, R.X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Products Reports*, 23, 753-771.

Zhang, W., Krohn, K., Draeger, S., Schulz, B. 2008. Bioactive Isocoumarins Isolated from the Endophytic Fungus *Microdochium bolleyi*. *Journal of Natural Products*. 71, 6, 1078–1081

Zhan, J., Gunatilaka, A. A. L. 2005. Microbial transformation of curvularin. *Journal of Natural Products*, 68, 1271-1273.

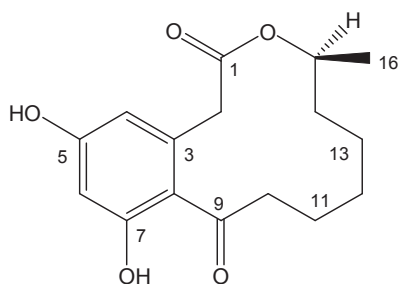


Figura 1. Curvularina de Fórmula molecular: $C_{16}H_{20}O_5$ e Peso Molecular: 292

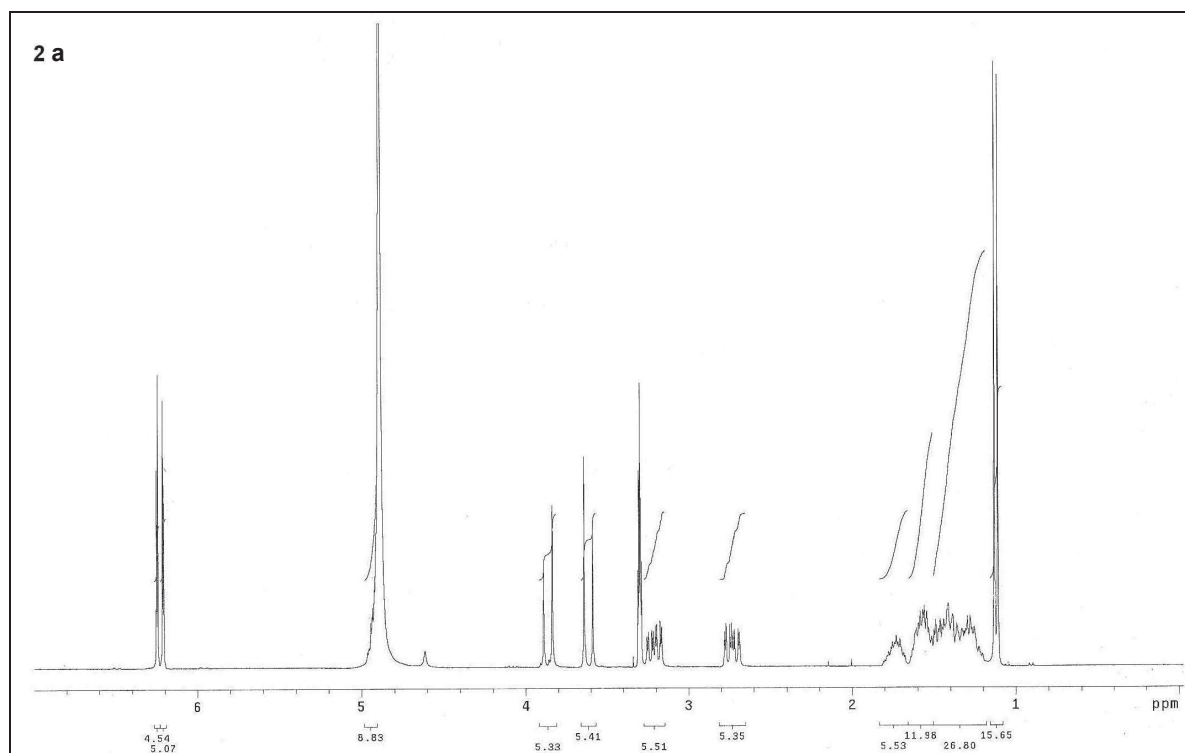


Figura 2a. Espectro de RMN de 1H (δCD_3OD ; 300MHz) da fração D.

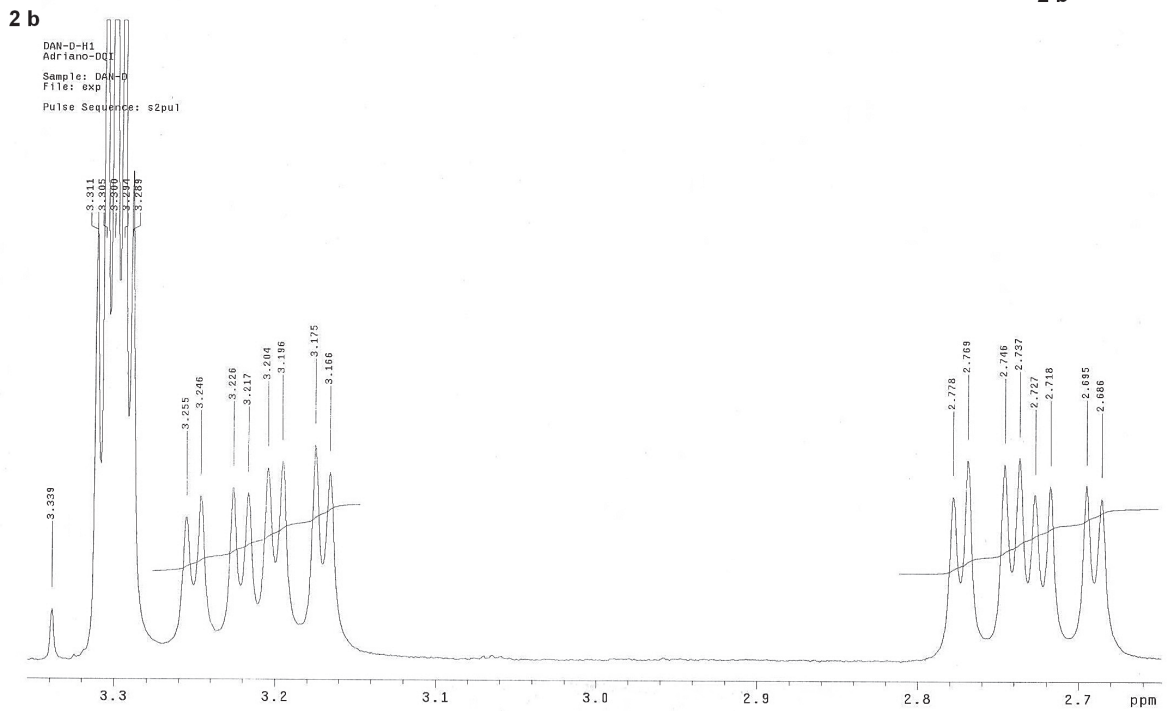


Figura 2b. Expansão do Espectro de RMN de ^1H (Região 2,50 a 3,50 ppm) da fração D.

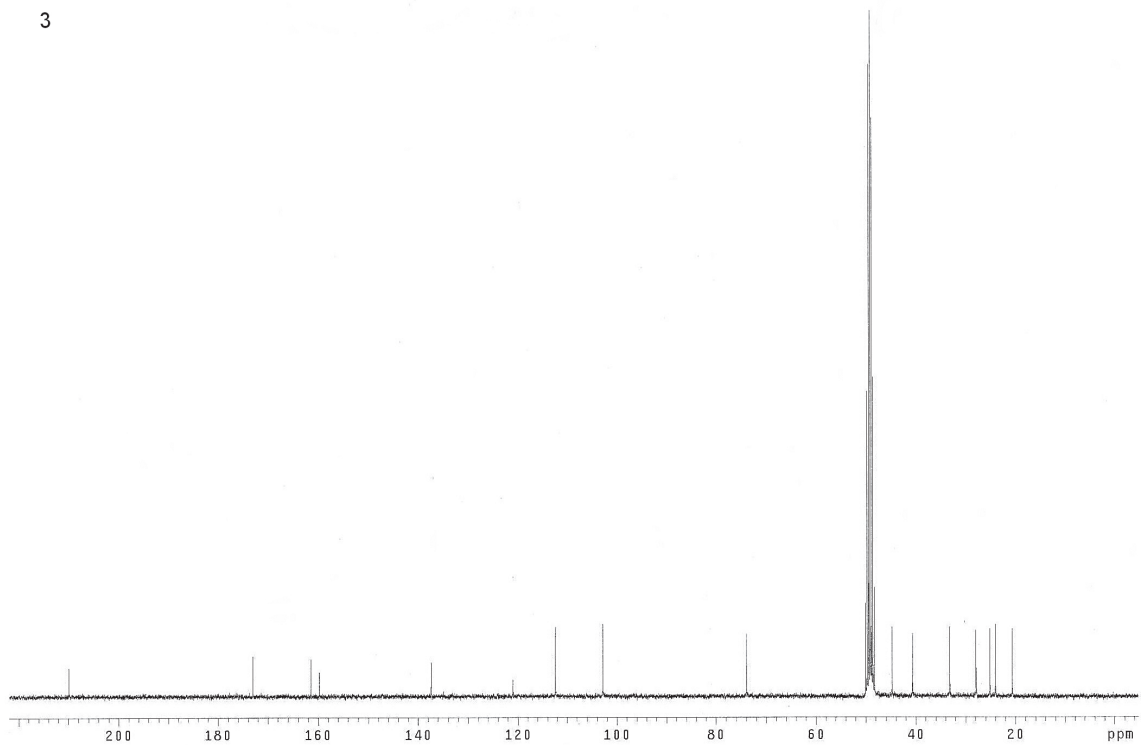


Figura 3. Espectro de RMN de ^{13}C ($\delta\text{CD}_3\text{OD}$; 75,5mHz) da fração D.

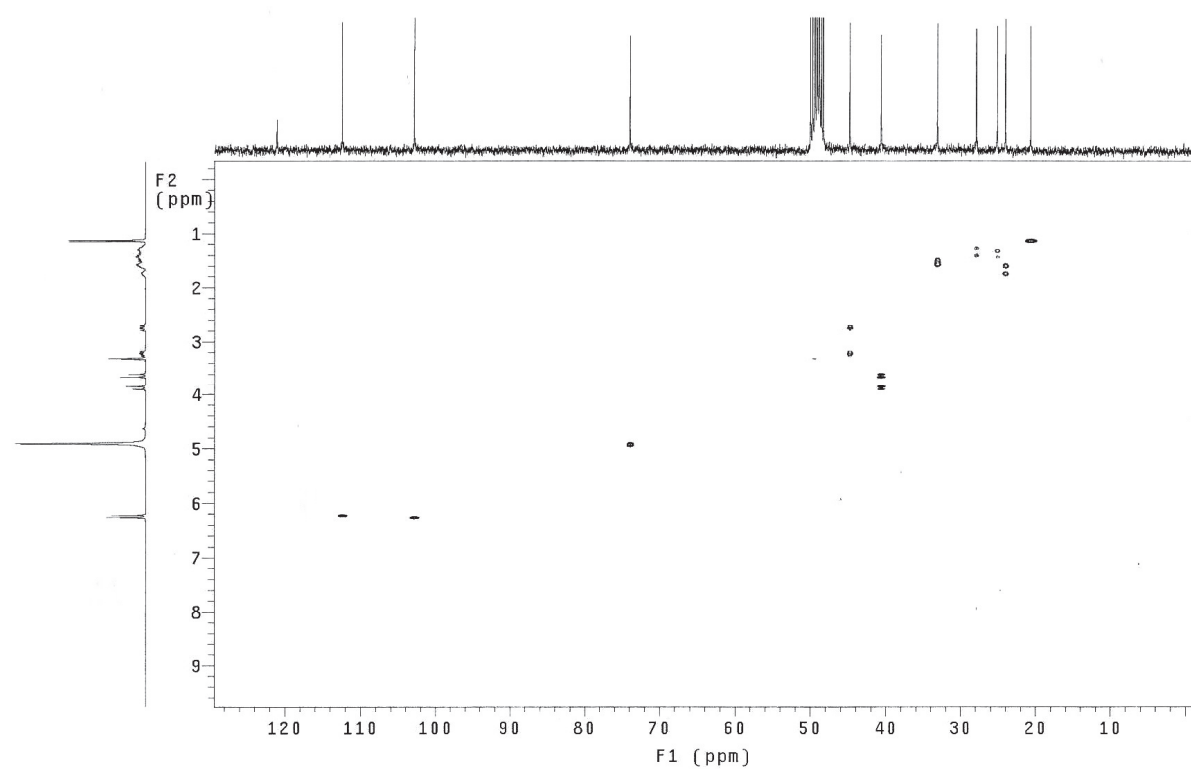


Figura 4a. Espectro de HSQC ($\delta\text{CD}_3\text{OD}$) da fração D.

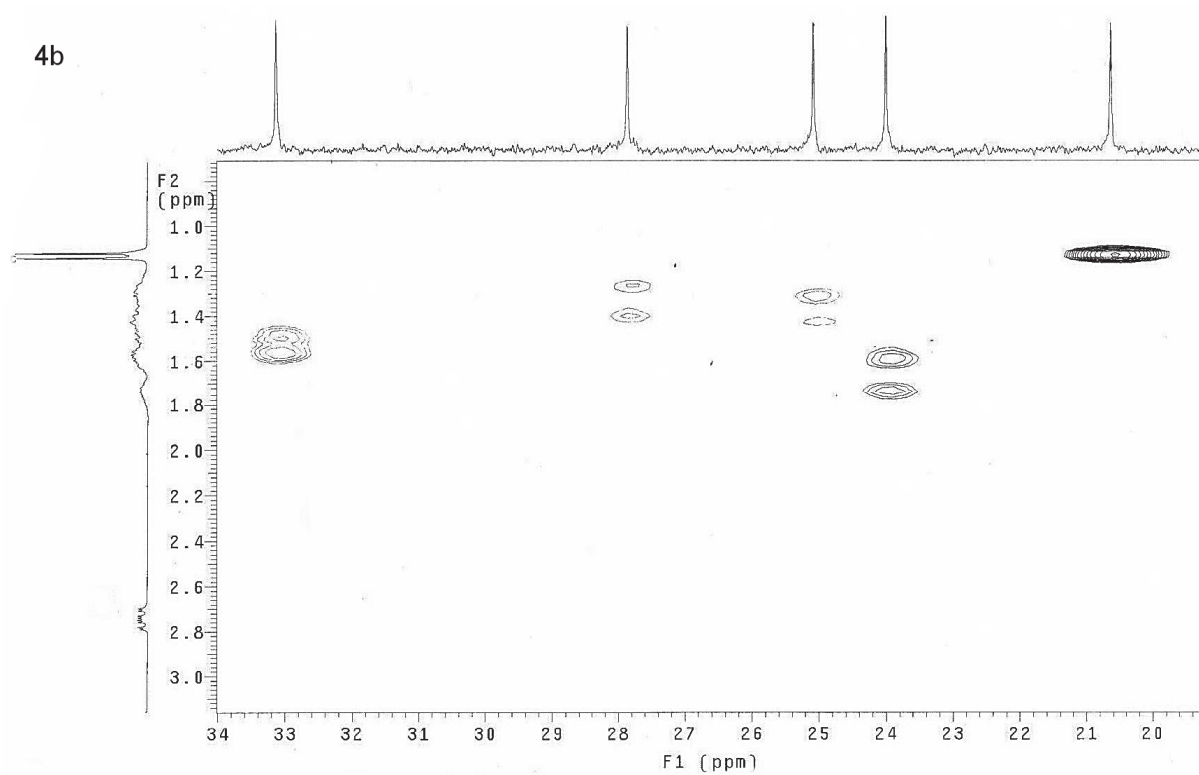


Figura 4b. Expansão de espectro de HSQC (região de 20 – 34 ppm) da fração D.

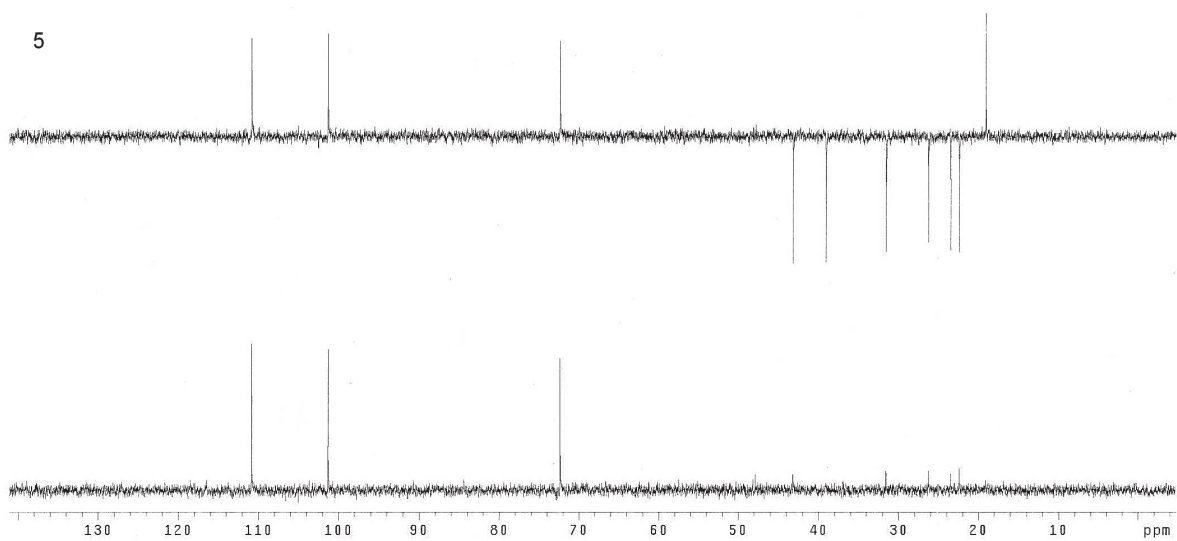


Figura 5. Espectro de DEPT ($\delta\text{CD}_3\text{OD}$) da fração D.

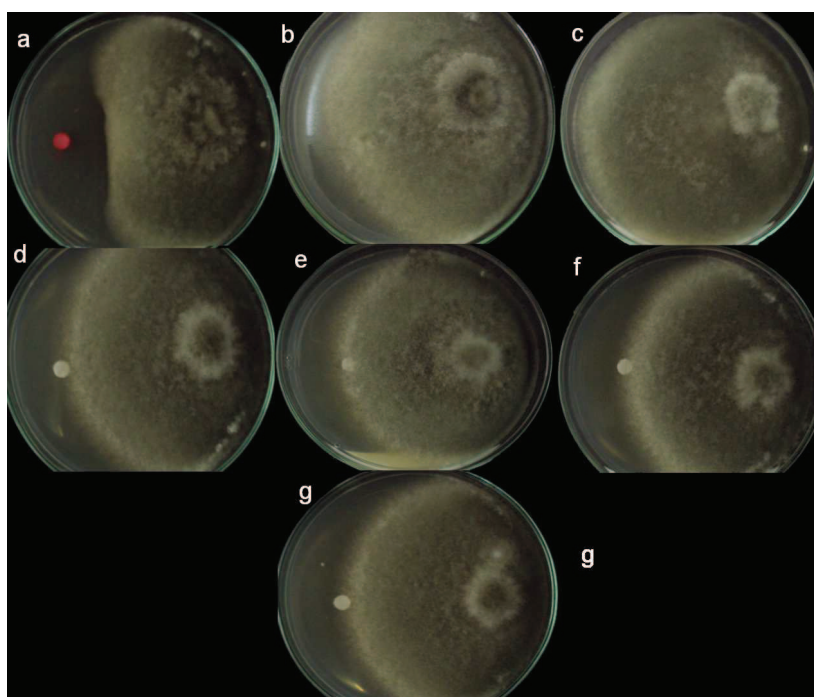


Figura 6. Teste de antagonismo e crescimento micelial de fungo fitopatogênico da espécie *M. perniciosa*.
Legenda: **a)** *M. perniciosa* x Dersal; **b)** *M. perniciosa* x água; **c)** *M. perniciosa* x MeOH; **d)** *M. perniciosa* x Fração C_{Cristal}; **e)** *M. perniciosa* x Fração D; **f)** *M. perniciosa* x Fração I; **g)** *M. perniciosa* x Fração EF;

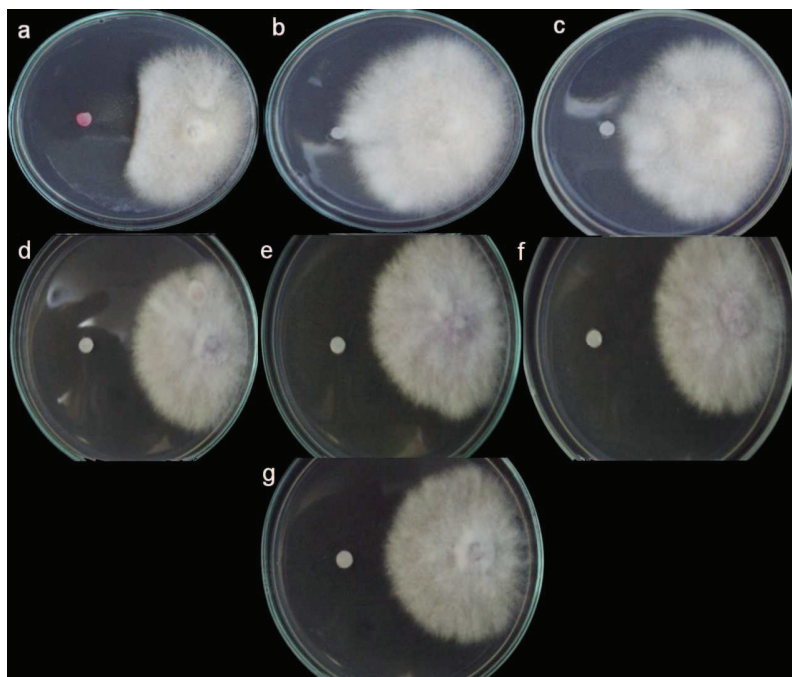


Figura 7. Teste de antagonismo e crescimento micelial de fungo fitopatogéno da espécie *F. solani* f sp *glycines*.
Legenda: **a)** *F. solani* f sp *glycines* x Derosal; **b)** *F. solani* f sp *glycines* x água; **c)** *F. solani* f sp *glycines* x MeOH; **d)** *F. solani* f sp *glycines* x Fração C_{Cristal}; **e)** *F. solani* f sp *glycines* x Fração D; **f)** *F. solani* f sp *glycines* x Fração I; **g)** *F. solani* f sp *glycines* x Fração EF;

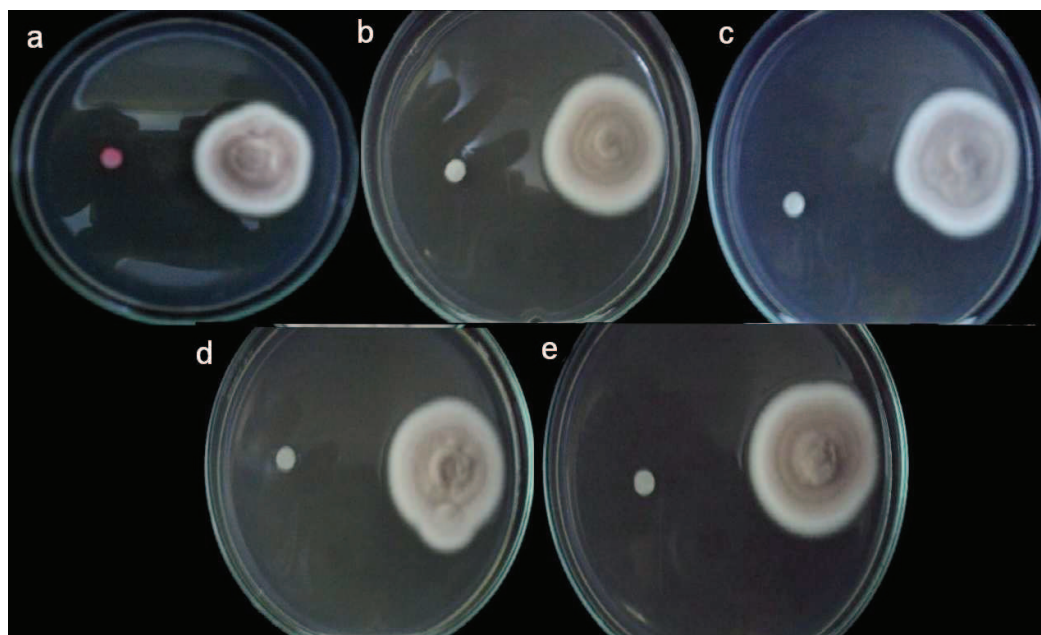


Figura 8. Teste de antagonismo e crescimento micelial de fungo fitopatogéno da espécie *D. bryonae*.
Legenda: **a)** *D. bryonae* x Derosal; **b)** *D. bryonae* x Fração C_{Cristal}; **c)** *D. bryonae* x Fração D; **d)** *D. bryonae* x Fração I; **e)** *D. bryonae* x Fração EF;

Tabela 01: Dados de RMN ^1H e ^{13}C ($\delta\text{CD}_3\text{OD}$) da fração D e da curvularina-7-O- β -D-glucopranosídeo (Referencia)

H/C	Fração D			Curvularina-7-O- β -D-glucopranosídeo	
	DEPT	δ_{H} (mult.; J em Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult.; J em Hz)	δ_{C}
1	C ₀	-	172,9	-	171,0
2	CH ₂	3,86 (d; 15,6 Hz) 3,61 (d; 15,9 Hz)	40,86	3,72 (m)	39,1
3	C ₀	-	137,40	-	135,5
4	CH	6,10 (d; 2,1 Hz)	112,38	6,51 (d; 2,1 Hz)	113,9
5	C ₀	-	161,41	-	159,8
6	CH	6,24 (d; 2,4 Hz)	102,84	6,68 (d; 2,1 Hz)	102,7
7	C ₀	-	159,69	-	157,4
8	C ₀	-	121,01	-	124,7
9	C ₀	-	209,91	-	207,0
10	CH ₂	3,23 (dd; 2,7 Hz) 3,18 (dd; 2,5 Hz)	44,79	3,15 (m) 2,86 (m)	44,0
11	CH ₂	1,58 (m) 1,45 (m)	24,00	1,79 (m) 1,35 (m)	23,4
12	CH ₂	1,30 (m) 1,20 (m)	27,87	1,43 (m) 1,26 (m)	27,8
13	CH ₂	1,42 (m) 1,28 (m)	25,80	1,44 (m) 1,27 (m)	24,7
14	CH ₂	1,56 (m) 1,46 (m)	33,13	1,65 (m) 1,41 (m)	33,4
15	CH	4,82 (m)	73,94	4,97 (m)	72,8
CH₃-15	CH ₃	1,12 (d; 6,3 Hz)	20,64	1,13 (d; 6,3 Hz)	20,7

Tabela 2 – Crescimento micelial em direção ao disco (média ± desvio padrão).

Metabólito	<i>C. gloesporioides</i>	<i>M. pernicioso</i>	<i>D. bryonae</i>	<i>F. solani</i> f sp <i>glycines</i>	<i>S. sclerotiorum</i>
Água	4,50±0,66a	5,00±0,00a	4,37±0,14a	4,10±0,10a	4,63±0,15a
MeOH	4,40±0,60a	5,00±0,00a	4,30±0,00a	4,20±0,00a	4,60±0,00a
Derosal	3,10±0,25b	3,47±0,12d	3,00±0,10b	2,47±0,15c	3,00±0,10b
Fração D	4,40±0,36a	4,40±0,17bc	2,97±1,14b	2,73±0,64bc	4,50±0,10a
Fração EF	4,23±0,25a	4,23±0,07c	1,63±0,07c	3,03±0,25bc	4,50±0,00a
Fração I	4,50±0,00a	4,40±0,17bc	1,33±0,07c	2,83±0,12bc	4,60±0,10a
Fração C _{crystal}	4,47±0,06a	4,50±0,00b	1,57±0,15c	2,70±0,00c	4,57±0,06a
CV(%)	26,51	1,99	15,84	9,14	2,55

Água e MeOH: controle negativo, Derosal: controle positivo, CV: coeficiente de variação.

* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05)

Tabela 3 – Formação de halo (mm) de inibição de desenvolvimento bacteriano (média ± desvio padrão).

Fração do metabólito	<i>Xanthomonas</i> <i>ax.pv. phaseoli</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Micrococcus</i> <i>luteus</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Enterococcus</i> <i>hyrae</i>
Fração C _{crystal}	0,00±0,00c	1,17±2,02bc	1,25±2,17b	1,17±2,02bc	1,17±2,02c	0,00±0,00b
Fração I	1,33±2,31c	4,83±3,09b	1,17±1,04b	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00b
Fração EF	3,08±2,74bc	0,00±0,00c	2,58±0,00b	4,00±1,73b	0,00±0,00c	0,92±1,59b
Fração D	6,75±0,87b	0,00±0,00c	2,83±0,00b	1,33±1,38bc	6,80±2,02b	2,42±2,27b
Tetraciclina	25,41±1,46a	36,75±1,75a	34,67±0,00a	34,92±0,29a	35,50±0,25a	33,75±1,25a
Água	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00b
MeOH	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00c	0,00±0,00b

* Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05)

Legenda: água e MeOH: controle negativo, Tetraciclina: controle positivo.

ANEXO

NORMAS DO PERIÓDICO PARA SUBMISSÃO DE TRABALHOS



PHYTOCHEMISTRY

The International Journal of Plant Chemistry, Plant Biochemistry and Molecular Biology.

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.3
●	Impact Factor	p.3
●	Abstracting and Indexing	p.3
●	Editorial Board	p.3
●	Guide for Authors	p.5



ISSN: 0031-9422

DESCRIPTION

Phytochemistry is the international journal of pure and applied plant chemistry, plant biochemistry and molecular biology, published 18 times per annum by Elsevier. The majority of these publications will be *Regular Issues* covering research on all aspects of pure and applied plant biochemistry, especially that which leads to a deeper understanding of the factors underlying the growth, development and metabolism of plants and the chemistry of plant constituents. *Phytochemistry* is a primary source for papers dealing with plant secondary compounds, especially with regard to their biosynthesis and diverse properties. *Phytochemistry* is the official organ of 'The Phytochemical Society of Europe' and 'The Phytochemical Society of North America'. The Journal is currently divided into several sections as indicated below, but papers which cut across these sections or which are on any other aspect of plant biochemistry will also be considered.

Review articles are published at regular intervals, ranging in scope from primary metabolism and regulation of plant growth, through plant enzymology to natural product chemistry and the biological activity of plant products. They deal with significant new areas of research and are intended to command the interest of the general reader. Authors should consult the Editors before preparing such articles, by submitting an outline of their proposed review.

Molecules of Interest are invited short reviews (3-4 printed pages) of individual compounds or macromolecules of plant, fungal or algal origin, which are currently attracting significant applied, commercial or biological interest. These can be novel compounds or newly discovered properties of familiar compounds.

The *Chemotaxonomy* section contains papers on the comparative biochemistry of plants. These may range from distributional studies on low molecular weight compounds in a group of fungi, algae or higher plants to the comparative amino acid sequences of related proteins within groups of species. Papers on infraspecific chemical variation are also included here.

Editorial Comment will be an occasional series where Regional Editors, Board Members or other scientists will be invited to comment on phytochemistry topics of global interest and debate.

The *Protein Biochemistry* section will contain reports on the purification of proteins directly from the organism or by heterologous expression. These will preferentially include information on enzymological properties, macromolecular structure and exploration of function, by site-directed mutagenesis and/or subcellular localisation. Reports of work that employ proteomics will be particularly welcome and are intended to complement the next section.

The *Molecular Genetics and Genomics* section contains papers on nucleic acid biochemistry, function and expression. This section will contain reports of genes and their analysis and expression, which demonstrate novelty and/or biological significance. Papers and communications that contain only sequence data or which duplicate studies of gene expression in other species will not generally be acceptable. Gene discovery using mutants and reverse genetics or exploration of functionality of genes in transgenic organisms will however be encouraged, if this provides new insight into unknown or previously known sequences.

The *Metabolism* section focuses on work in primary, intermediary and secondary metabolism. Contributions are particularly encouraged on the biosynthesis of macromolecules such as polysaccharides, lipids and other polymers such as lignin and their assembly in higher orders of structure such as membranes and cell walls. This section will also contain papers describing the further elucidation of known pathways and of newly discovered alternatives, as well as all aspects of metabolic regulation including regulatory molecules and proteins such as protein kinases and transcription factors. Studies directed toward understanding the regulation and possible cross-talk between pathways through the use of transgenic organisms are also strongly encouraged, as are those describing aspects of biochemistry regulated during growth and development at any stage of the organism.

The *Ecological Biochemistry* section contains papers on biochemical adaptations in plants to environmental stress; pollination biochemistry; plant toxins and their effects on animals, phytoecdysones, antifeedants; herbivory, plant defence and insect feeding preferences; utilization of plant substances by animals; and all aspects of biochemical plant pathology, including the production of phytotoxins and phytoalexin elicitation. Contributions on various symbiotic interactions are also welcomed. Also of considerable interest is the elucidation of the signalling molecules that govern the nature of the responses involved in the interaction between two or more organisms.

The *Bioactive Products* section contains papers on novel plant chemistry, where the biological activities of one or more of the new plant compounds are described. Descriptions of possible pharmacological, medical or therapeutic use or of dietary significance are encouraged if known. This section may also contain analysis of genetically modified plants that have been analysed for changes in their profiles of bioactive plant products. Such bioassay data should include comparable results for a known agent, so that the reader can judge the relative importance of any new finding. Full experimental details of the biological tests should be provided, and studies judged significant by the Editors may be invited to be discussed in the *Molecules of Interest* section before publication. In such cases, this review will appear in the same issue as the publication.

The *Chemistry* section contains papers on: growth substances, macromolecules, primary metabolites, terpenoids, polyketides, phenylpropanoids, flavonoids, alkaloids and compounds of mixed biosynthetic origin. Authors investigating the chemistry of a given plant species should aim to publish their results in a single manuscript rather than in a series of papers which describe each new compound as it is found. The structural analysis of new plant substances is now so routine that papers reporting a single novel compound of expectable structure (e.g. a new triterpene fatty acid ester) are rarely acceptable, unless other novel information on the plant is included.

Symposia and Society announcements will be published, at the discretion of the Publisher. Preliminary communications will not, however, be considered.

Authors should consult the latest instructions to authors (see *Phytochemistry* Volume 66, Issue 1) before preparing their manuscripts. All contributions must be in English and should be submitted online (www.ees.elsevier.com/phytochem) to the appropriate Regional Editor for their geographical region. For U.K., Africa, The Commonwealth & Rest of the World: Professor G. P. Bolwell, Division of Biochemistry, School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham, Surrey, U.K. For the Americas and East Asia: Professor N. G. Lewis, Institute of Biological Chemistry, Washington State University, Pullman, WA, U.S.A. For Continental Europe and Russia: Professor D. Strack, Institut für Pflanzenbiochemie, Weinberg 3, Halle (Saale), Germany.

[organ2if.gif](#)

AUDIENCE

Organic Chemists, Plant Chemists, Plant Biochemists, Plant Molecular Biologists, Chemical Ecologists and Natural Product Chemists.

IMPACT FACTOR

2009: 3.104 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2010

ABSTRACTING AND INDEXING

AGRICOLA
BIOSIS
Cambridge Scientific Abstracts
Chemical Abstracts
Commonwealth Agricultural Bureau (CAB) Abstracts
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
Current Contents/Life Sciences
EMBASE
Elsevier BIOBASE
MEDLINE®
Medicinal and Aromatic Plant Abstracts
PASCAL/CNRS
Plant Science Database (Elsevier)
Reference Update
Science Citation Index
Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors

Regional Editor for: UK, Africa, The Commonwealth & Rest of the World

G.P. Bolwell, School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham Hill, Egham, TW20 0EX, UK

Regional Editor for: The Americas & East Asia

N.G. Lewis, Inst. of Biological Chemistry, Washington State University, PO Box 646340, Pullman, WA 99164-6340, USA

Regional Editor for: Continental Europe & Russia

Editorial Board

Y. Asakawa, Tokushima, Japan
J. Bohlmann, Vancouver, Canada
W. Boland, Jena, Germany
J.D. Connolly, Glasgow, UK
G.A. Cordell, Evanston, IL, USA
R. Croteau, Pullman, WA, USA
A. Crozier, Glasgow, UK
V. De Luca, Toronto, ON, Canada
R.A. Dixon, Ardmore, OK, USA
R. Edwards, Durham, UK
W.H. Fenical, La Jolla, CA, USA
A. Fernie, Potsdam-Golm, Germany
D. Ferreira, University, MS, USA
D. Gang, Tucson, AZ, USA
M. Garson, St Lucia, QLD, Australia
J. Gershenzon, Jena, Germany
T. Hartmann, Braunschweig, Germany
J.L. Harwood, Cardiff, UK
P. Hedden, Bristol, UK

R. Jetter, Vancouver, BC, Canada
J.V. Jorrin-Novo, Córdoba, Spain
M.J. Kato, Sao Paulo, Brazil
A.D. Kinghorn, Columbus, OH, USA
S. Komatsu, Tsukuba, Japan
N. Kruger, Oxford, UK
T.M. Kutchan, St. Louis, USA
U. Matern, Marburg, Germany
Y. Mimaki, Tokyo, Japan
B.L. Møller, Frederiksberg C, Denmark
M.S.C. Pedras, Saskatoon, Canada
R. Peters, Ames, IA, USA
J.A. Pickett, Swindon, England, UK
R. Robins, Nantes Cedex 03, France
M. Rohmer, Strasbourg, France
M.S.J. Simmonds, Richmond, England, UK
A.R. Slabas, Durham, UK
D. Strack, Halle, Germany
D. Werck-Reichhart, Strasbourg, France
V. Wray, Braunschweig, Germany

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Phytochemistry invites research articles on all aspects of pure and applied plant chemistry, plant biochemistry, plant molecular biology and chemical ecology. The Journal is currently divided up into the following sections:

Editorial Comment, Molecules of Interest, Review Articles, Structural Elucidation and Full Papers.

Editorial Comment will be an occasional series where Regional Editors, Board Members or other scientists will be invited to comment on phytochemistry topics of global interest and debate.

Molecules of Interest will consist of invited short reviews (3-4) printed pages of individual compounds or macromolecules of plant, fungal or algal origin. These can be novel compounds or newly discovered properties of familiar compounds. Please contact Professor Bolwell if you wish to prepare a Molecules of Interest paper.

Review Articles are published at regular intervals, ranging in scope from primary metabolism and regulation of plant growth, through plant enzymology to natural product chemistry and the biological activity of plant products. They deal with significant new areas of research and are intended to command the interest of the general reader. Authors should consult their Regional Editors with an outline of their proposed Review before preparing such articles. Published Reviews include a biography and picture of each author.

Structure Elucidation papers, accepted as full papers in the Chemistry section, should include either a substantial description of several new compounds without any conclusion as to their significance, or a description of the study of new compounds with expected structures incorporating conclusions. These papers with a minimum of 16 pages of double-spaced manuscript should follow the general style of Full Papers although the Introduction, Results and Discussion may be combined as a single narrative. Brief abstracts must be included, containing significant facts derived from the work. Reports of known compounds, however rare, from new plant sources will not generally be accepted unless they have real chemotaxonomic or other biological significance. Authors are specifically discouraged from submitting papers as fragmented analyses of particular plant constituents.

Full Papers: Full journal articles will be drawn from areas described in the Aims and Scope:

Bioactive Products

Chemotaxonomy

Chemistry

Ecological Biochemistry

Metabolism

Molecular Genetics & Genomics

Protein Biochemistry & Proteomics

Update in Bioinformatics

They are comprehensive papers, typically 6-8 printed pages in length (a minimum of 20 pages of double-spaced manuscript). Papers on plant chemistry must be substantial and contain convincing justification for undertaking the study, as well as having conclusions (e.g. on the biology, chemotaxonomy, new biosynthetic pathways etc.). Papers submitted under the Bioactive Products area are unlikely to be accepted if the bioactivity is measured on a mixture of compounds without further resolution.

Link to full Guide for Authors

Some of the notes shown here do not include all special characters. The full instructions to authors, including all special characters are available for download as a pdf file. [pdf link](#)

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://www.ees.elsevier.com/phytochem>) you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 4 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Additional Information

Please submit regular articles to the appropriate Regional Editor for your geographical region.

For UK, Africa, The Commonwealth and Rest of the World: Professor G. P. Bolwell.

For the Americas and East Asia: Professor N. G. Lewis.

For Continental Europe and Russia: Professor D. Strack.

- Regular articles go to the appropriate geographical editor.
- MOIs go to Professor Bolwell.
- Special Issue Papers go to the Organizing Editor/Editors.
- Solicited/Commissioned Reviews go to the editor who commissioned them.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article Structure

The content of manuscripts **must** be arranged as follows: (1) a *Graphical Abstract*; (2) a *Title Page* with authors name(s) and address(es); (3) and *Abstract*, in which contents are briefly stated; (4) *Keywords*; (5) *Introduction*, and (6) the *Results* and *Discussion* (preferably combined). Although each section may be separated by headings, they should form one continuous narrative and only include details essential to the arguments presented. If a discussion is separately provided, it should not include a repetition of the results, but only indicate conclusions reached on the basis of them, and those from other referred works; (7) *Conclusions* or *Concluding Remarks*; (8) the *Experimental* should include brief details of the methods used such that a competent researcher in the field may be able to repeat the work; (9) *Acknowledgments*; (10) *Figures* and *Legends*, *Formulae*, *Tables* and *References*. Authors have to include pagination.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1. (then 1.1.1., 1.1.2., ...), 1.2., etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Specific names (genus, species, authority for the binomial) of all experimental plants must be given at first mention according to the *Index Kewensis* (searchable online at <http://www.ipni.org>) or similar authority (The Plant-Book: A Portable Dictionary of the Vascular Plants, by D.J. Mabberley, 2nd ed., June 1997, Cambridge University Press; ISBN: 0521414210), and preferably be in the form recommended by the [International Code of Botanical Nomenclature](#). Named varieties of cultivars are given, e.g. *Lactuca sativa* cv. Grand Rapids. (The official printed version of the International Code of Botanical Nomenclature has been published as International Code of Botanical Nomenclature {Tokyo Code}. Regnum Vegetabile 131. Koeltz Scientific Books, Königstein. ISBN 3-87429-367-X or 1-878762-66-4 or 80-901699-1-0.)

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Subsections on the Experimental Procedures should be italicized and inserted as part of the first line of the text to which they apply. *Phytochemistry* encourages an extensive use of abbreviations (these are listed at the back of the Instructions to Authors, or the reader is referred to other sources). The Experimental should begin with a subsection entitled General Experimental Procedures. This subsection will typically contain brief details of instruments used, and identification of sources of specialized chemicals, biochemicals and molecular biology kits.

The next subsection describes the source(s) and documentation of biological materials used, whether in reference to whole plants or parts therefrom, crude drugs, or any other plant material from which identifiable chemical substances are obtained for the first time. Documentation must also include a reference to voucher specimen(s) and voucher number(s) of the plants or other material examined. If available, authors should quote the name and address of the authority who identified each non-cultivated plant investigated. Specimens should preferentially be deposited in a major regional herbarium where the collection is maintained by state or private institution and which permits loan of such materials.

With other microorganisms, the culture collection from which they were either accessed and/or deposited should be included, together with identification of the strain designation code. The Experimental Procedures employed should be concise but sufficiently detailed that a qualified researcher will be able to repeat the studies undertaken, and these should emphasize either truly new procedures or essential modifications of existing procedures. Experimental details normally omitted include: (1) method of preparation of common chemical and biochemical derivatives, (2) excessive details of separation of compounds, proteins and enzymes, e.g. preparation of columns, TLC plates, column and fraction size.

Compound characterization: Physical and spectroscopic data for new compounds must be comprehensive, and follow the order shown below: compound name (and assigned number in text); physical state of compound (e.g. oil, crystal, liquid, etc.), melting and/or boiling point; optical rotation and/or circular dichroism measurements, if optically active; UV; IR, ¹H NMR; ¹³C NMR; MS. For all new compounds, either high-resolution mass spectral or elemental analysis data are required.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. "New" and "novel" are not allowed within title and abstract.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate (marked by an asterisk) who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. The abstract should not contain compound numbers which refer to other parts of the manuscript, full chemical or known trivial names of compounds should be given.

Graphical abstract

Please provide, when submitting your article, a graphical abstract. This comprises the title, authors, identical to the article itself, a summary of about 25 words, and a pictogram: one figure representative of the work described. Maximum final dimensions of the pictogram are 5 x 5 cm: bear in mind readability after reduction, especially if using one of the figures from the article itself. Compound numbers can be given in the graphical abstract if they refer to a graphic also shown there. Graphical abstracts will be collated to provide a contents list for rapid scanning. For an example of recent graphical abstracts please download this pdf file. [pdf link](#)

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters per bullet point including spaces). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Authors must give 3-10 keywords or phrases, which identify the most important subjects covered by the paper. They should be placed at the beginning of the manuscript in the following order: name of plant species examined (Latin binomial); plant family; common epithet (where applicable); type of investigation; class of compound; protein or gene; name of compound(s); protein(s) and gene(s).

Abbreviations

About, approximately: ca.
Anhydrous: dry (not anhyd.)
Aqueous: aq.
Circular dichroism: CD
Concentrated (or mineral acids): conc.
Concentrations: ppm (never ppb!), μM , mM, M, %
Dry weight: dry wt; fresh weight: fr. wt
Electricity: V, mA, eV
Force due to gravity (centrifugation): *g*; rpm (revolutions/min)
Gas chromatography: GC

Gas chromatography-mass spectrometry: GC-MS
trimethylsilyl derivative: TMSi (TMS cannot be used as this refers to the internal standard tetramethylsilane used in ^1H NMR)
High performance liquid chromatography: HPLC
Infrared spectroscopy: IR
Length: nm, μm , mm, cm, m
Literature: lit.
Mass: pg, ng, μg , mg, g, kg
Mass spectrometry: m/z [M]⁺ (molecular ion, parent ion)
Melting points: uncorr. (uncorrected)
Molecular mass: Da (daltons), kDa
Molecular weight: M_r
Nuclear magnetic resonance: ^1H NMR, ^{13}C NMR, Hz, δ
Numbers: e.g. 1, 10, 100, 1000, 10,000: per or -1
Optical rotatory dispersion: ORD
Paper chromatography: PC
Precipitate: ppt.
Preparative thin-layer chromatography: prep. TLC
Radioactivity: dpm (disintegrations per min), Ci (curie), sp. act (specific activity), Bq (1 becquerel = 1 nuclear transformation/sec)
Repetitive manipulations: once, twice, $\times 3$, $\times 4$, etc.
 RR_t (relative retention time), R_t (Kovat's retention index), ECL (equivalent chain length - term frequently used in fatty acid work)
Saturated: satd.
Solution: soln.
Solvent mixtures including chromatographic solvents: abbreviate as follows $n\text{-BuOH-HOAc-H}_2\text{O}$ (4:1:5)
Statistics: LSD (least significant difference), s.d. (standard deviation), s.e. (standard error)
Temperature: (with centigrade), mp, mps, mmp, bp
Temperature: temp.
Thin-layer chromatography: TLC, R_f
Time: s, min, h, day, week, month, year
Ultraviolet spectrophotometry: UV, A (absorbance, not OD - optical density)
Volume: l (litre), μl , ml
Weight: wt

For preparation of *Inorganics* and *Organics* please see the full instructions to authors, including all special characters, available for download as a pdf file. [pdf link](#)

For further terms used in biochemistry and molecular biology the authors should see the websites of the nomenclature committees. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and Units

Chemical nomenclature, abbreviations and symbols must follow IUPAC rules. Whenever possible, avoid coining new trivial names; every effort should be made to modify an existing name. For example, when a new compound is described, it should be given a full systematic name according to IUPAC nomenclature and this should be cited in the Abstract or in the Experimental section. Isotopically-labeled substances should be written with the correct chemical name of the compound. The symbol for the isotope should be placed in square brackets and should precede that part of the name to which it refers, e.g. sodium [^{14}C]formate.

In Table headings and legends on graph axes numerical data should be identified in the form data name/units.

For **Presentation of Data** please see the full instructions to authors, including all special characters, available for download as a pdf file. [pdf link](#)

Mass spectral data should be presented in full as Supplementary Information for all newly identified compounds. If the data are already published elsewhere then relevant references should be quoted. Presentation of mass spectral data should in general follow the recommendations given in Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 142, 211-240 (1995), and must indicate the method used (EIMS, CIMS, GC-MS, TOFMS, FABMS, SIMS, APCI etc.) and the relevant experimental details (ionizing energy, voltages etc). The data should give only diagnostically important ions, the character of the fragmentation ions in relation to the molecular ion and the intensity relative to the major ion. For example-EIMS (probe) 70 eV, m/z (rel. int.): 386 [M]⁺ (36), 368 [M - H₂O]⁺ (100), 353 [M - H₂O - Me]⁺ (23), 275 [M - 111]⁺ (35), etc. CIMS (*iso*-butane, probe), 200 eV, m/z (rel. int.): 387 [M + H]⁺ (100), 369 [(M + H) - H₂O]⁺ (23), etc. High-resolution spectra can be given in more detail if necessary for [M]⁺ and the more important fragment ions.

X-ray crystallography

Only essential data (e.g. a three-dimensional structural drawing with bond distances) should be included in manuscripts. A complete list of data in CIF (Crystallographic Information File) format should be prepared separately and deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (see <http://www.ccdc.cam.ac.uk> for further information) before the paper is submitted. A footnote indicating this fact is to be included in the manuscript. "CCDC...contains the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html> (or from the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: +44 1223 336033; e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)". Crystal structures of proteins should be submitted to the Protein Data Bank (see <http://www.rcsb.org/pdb>; e-mail: info@rcsb.org). Please submit a copy of the CIF data when you submit your manuscript.

Elemental analysis results for compounds which have been adequately described in the literature must be given in the form: (Found: C, 62.9; H, 5.4. Calc. for C₁₃H₁₃O₄N: C, 63.2; H, 5.3%). New compounds must be indicated by giving analytical results in the form: (Found: C, 62.9; H, 5.4. C₁₃H₁₃O₄N requires: C, 63.2; H, 5.3%).

Thin-layer chromatography

- For analytical TLC, dimensions of the plates can be deleted if layer thickness is 0.25 mm.
- Abbreviate common adsorbents: (but use silica gel, not SiO₂ as this does not describe the material accurately), Al₂O₃ (alumina).
- Preparative forms of the technique should include details of (i) layer thickness (preparative TLC only), (ii) amount of sample applied to the layer, (iii) method of detection used to locate the bands and (iv) the solvent used to recover the compounds from the adsorbent after development.
- Special forms of TLC on impregnated adsorbents can be abbreviated, e.g. AgNO₃-silica gel (1:9), by wt can be assumed.
- Solvent mixtures should be specified as under **Abbreviations** above.

Gas chromatography

- Detector used should be specified, e.g. dual FID, EC, etc.
- Carrier gas and flow rate or inlet pressure should be given, e.g. N₂ at 3 ml min⁻¹/10 psi.
- Operating conditions, such as injector and detector heater temperatures, oven temperature programme, should be included.
- Packed columns, e.g. 6 m x 3 mm (i.d. measurement only) packed with 1% SE-30 (support material and mesh size can be omitted unless unusual).
- Capillary columns the type (e.g. WCOT, SCOT), manufacturer's designation (e.g. DB5) and dimensions (length, internal/external diameter, film thickness) should be specified.

High performance liquid chromatography

- Solvent or solvent gradients used together with flow rate should be given.
- Column dimensions (length x i.d. only) and packing used.
- Method of detection employed, e.g. UV or refractive index.

Biochemical conventions

Unless a common biochemical term (e.g. ATP, NADH), biochemicals that are abbreviated should be spelled out in full (in brackets) immediately following their first usage in the text.

Enzyme names are typically not abbreviated, unless there are accepted abbreviations, such as ATPase. Where possible, E.C. numbers should be used for enzymes, and the recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) should be used (see below).

Enzyme characterization

(a) Enzyme activity is expressed in units of katal (symbol kat), the conversion of one mol of substrate per sec. It should be made clear that the measurements were made under specified optimum conditions and were not seriously affected by losses during extraction and analysis.

(b) pH optima should be given together with pH values for half maximal activity.

(c) Kinetic parameters should be expressed as V_{max} , K_m etc.

(d) Enzyme inhibitors-effectiveness should be expressed as K_i or concentration for half-maximal activity.

(e) Optimal temperature of enzymes should not be given. This should be expressed in terms of "Energy of Activation" and "Energy of Activation for Denaturation".

(f) Enzyme nomenclature is now given in "Enzyme Nomenclature, Recommendations", Academic Press (1992) (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>).

(g) Labeling of proteins and nucleic acids-use of labeled precursors in assessing the rate of synthesis of macromolecules must be validated by evidence of real, direct incorporation. The possibility of occlusion or adsorption of isotopic material should be noted and it should be shown that the labeled precursor is incorporated without prior catabolism.

Protein and nucleotide sequences

The Experimental must contain explicit documentation of the ends of nucleotide probes used in the study if previously unpublished, or by appropriate reference to published nucleotide numbers and/or restriction map. In manuscripts to be published in Phytochemistry, any new protein and/or nucleotide sequence must have been submitted to EMBL, GenBank™ or DNA Data Bank of Japan databases, with designated accession number(s) obtained prior to paper acceptance by the Regional Editor. The Author(s) must ensure access to this database information by timely release of data prior to publication, as well as providing necessary documentation to those already in the databases.

Nucleotide sequence data can be submitted either electronically (e-mail) or in computer-readable format, GenBank™, EMBL and the DNA Data Bank of Japan addresses are:

GenBank Submissions, National Center for Biotechnology Information, Building 38A, Room 8N-803, Bethesda, MD 20894. Tel.: +1 301 496-2475; e-mail (submissions): gb-sub@ncbi.nlm.nih.gov; e-mail (information): info@ncbi.nlm.nih.gov

EMBL Nucleotide Sequence Submissions, European Bioinformatics Institute, Hinxton Hall, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK. Tel.: +44 (0) 1223-494401; fax: +44 (0) 1223-494472; e-mail: datasubs@ebi.ac.uk; world wide web: <http://www.ebi.ac.uk/embl>

DNA Data Bank of Japan, Center for Information Biology, National Institute of Genetics, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan. Tel.: (+81) 559-81-6853; fax: (+81) 559-81-6849; e-mail: ddbjsub@ddbj.nig.ac.jp (for data submissions); world wide web: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>.

Contributors must obtain the designated accession number, which will be incorporated into the paper, prior to printing.

Only novel DNA sequences will be published. Sequences that show close similarity to known coding or other sequences such as promoters will not be published and will be cited by accession number. Translated protein sequence information should be published as alignments against other gene family members. Papers containing such information about genes already known in other species should have sufficient novelty and biological significance. Sequence only papers or papers which duplicate work in another species will not be published.

Genes known by three letter names should be written in italics. The corresponding cognate protein should be written in capital, non-italic text.

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- **GenBank**: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- **PDB**: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- **CCDC**: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- **TAIR**: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- **NCT**: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- **OMIM**: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- **MINT**: Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)
- **MI**: EMBL-EBI IntAct database for Molecular Interactions (MI ID: 0218)
- **UniProt**: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color Artwork

Colour in print: The charge for printed colour will be given on request by contacting authors@elsevier.com.

Colour on the web: Any figure can appear free of charge in colour in the web version of your article, regardless of whether or not this is reproduced in colour in the printed version. Please note that if you do not opt for colour in print, you should submit relevant figures in both colour (for the web) and black-and-white (for print).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal Abbreviations Source

Journal titles should be abbreviated (e.g. Carbohydr. Res.) following the Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) style (a list of abbreviated journal titles is available online at <http://www.cas.org/sent.html>).

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Additional Information

Is the subject matter really appropriate to *Phytochemistry*–

Is the work described both new and significant?

Have you supplied a *Graphical Abstract*–

Is the *Title* both *short* and *informative*–

Does the *Abstract* fully represent your scientific contribution? Is it self-contained? (Avoid formulae, numbers and abbreviations given in the text.)

Have you avoided repeating yourself? Have you avoided presenting the same data more than once?

Can you really justify writing separate 'Results' and 'Discussion' sections?

Have you checked plant names? Are you sure of the identity of the plants examined? Have you indicated the *part* of the plant you extracted? Have you deposited a voucher specimen and given access information?

Have you remembered to add the accepted IUPAC systematic names for new plant products?

Have you used all the suggested abbreviations in the Experimental?

Have you remembered to enclose with (or cite in) your manuscript and other relevant papers (e.g. reprint of previous paper in a series, any manuscripts of papers in press referred to in the paper, etc.)?

Is your manuscript double-spaced throughout with adequate margins and consists of one file containing all your text, figures and tables with a file name extension, plus separate original graphic files ready for online submission?

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/systemreqs>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

© Copyright 2010 Elsevier | <http://www.elsevier.com>