

**ATIVIDADE DE EXTRATOS VEGETAIS E SEUS DERIVADOS  
SOBRE O CRESCIMENTO DO FUNGO SIMBIONTE DE *Atta  
sexdens L.* E OUTROS MICRORGANISMOS**

**MARIZETE DE FÁTIMA PIMENTEL GODOY**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Janeiro de 2003

**ATIVIDADE DE EXTRATOS VEGETAIS E SEUS DERIVADOS  
SOBRE O CRESCIMENTO DO FUNGO SIMBIONTE DE *Atta  
sexdens L.* E OUTROS MICRORGANISMOS**

**MARIZETE DE FÁTIMA PIMENTEL GODOY**

**Orientador : Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração: Microbiologia Aplicada).

Rio Claro  
Estado de São Paulo – Brasil  
Janeiro de 2003

**À minha família, pelo apoio e compreensão,  
em especial ao meu filho, Fernando, pela inspiração e pelos momentos de  
alegria.**

## **Agradecimentos**

Ao Professor Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela confiança, pelos ensinamentos e pelo exemplo profissional.

Aos professores e colegas do Centro de Estudos de Insetos Sociais, em especial à amiga Elissena, pela alegria constante.

À secretária Necis Miranda, sempre muito prestativa.

Aos professores e pós-graduandos do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, por possibilitarem a execução desse trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca da UNESP, pela orientação na elaboração da dissertação.

À Daisy Nakamura Sato, pelo auxílio técnico e pelo carinho a mim dispensado.

Aos amigos da Universidade Metodista de Piracicaba, pelo incentivo e pela amizade.

Aos meus pais, pela minha formação e pelo companheirismo.

A todos que de alguma forma contribuíram pela realização deste trabalho.

## CONSELHOS PARA A VIDA

“A vida e as suas imagens:

Chão, campos, matas, cachoeiras ...

Vá entre flores e folhagens,

Fuja de urtigas e aroeiras.

Não só o verão, mas a vida

Inteira viva com garra.

Trabalhe como a formiga,

Cantando como a cigarra.

...”

**GABRIEL RUBENS**

## RESUMO

Esse trabalho dá continuidade a um estudo que vem sendo desenvolvido há alguns anos pelo grupo Temático “Plantas tóxicas, formigas cortadeiras e microrganismos associados“. A pesquisa está voltada para o estudo de plantas potencialmente tóxicas para o controle de formigas-cortadeiras, seja por ação direta sobre os insetos, seja por inibição de seu fungo simbiote. Para tanto, extratos brutos, frações e substâncias puras foram incorporados ao meio de cultura e o crescimento do fungo simbiote foi comparado com um controle. Os melhores resultados foram obtidos com os seguintes compostos : **policetídeos** provenientes do extrato diclorometânico de *Cedrela fissilis* (raiz), **ácidos palmítico e oleico** provenientes de uma fração do extrato hexânico (frutos) de *Trichilia sp.*, **furanocumarinas** obtidas dos extratos hexânico e diclorometânico (pecíolo) de *Conchocarpus longifolius*, **siringaldeído e ácido vanílico** obtidos do extrato bruto diclorometânico (caule) de *Pilocarpus grandiflorus*, **dictamina, isopimpinellina e esquimianina** obtidas do extrato metanólico (raiz) de *Adiscantus fusciflorus*, **xantoxiletina e a suberosina** isoladas do extrato diclorometânico (raiz) de *Citrus limoneae*. Extratos brutos hexânico e diclorometânico (galhos) da espécie *Protium heptaphyllum* apresentaram um alto potencial de inibição, bem como algumas frações resultantes, mas as substâncias puras ativas ainda não foram isoladas.

A atividade dos extratos vegetais e seus derivados sobre outros microrganismos também foi determinada. Os testes foram realizados pelo método de difusão em ágar e pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Embora a maioria dos extratos e/ou derivados das plantas tenham inibido pelo menos um dos microrganismos testados, essa inibição sempre foi fraca ou moderada e restrita apenas as bactérias Gram-positivas. Nesse sentido, merecem destaque o **ácido palmítico**, obtido de uma fração do extrato hexânico (frutos) de *Trichilia sp.* e quatro furanocumarinas (**3-metoxiangelicina, esfodina,**

**cianocumarina-D e pimpinelina)** obtidas de frações dos extratos hexano e diclorometano (pecíolo) de *C. longifolius*.

Palavras-chave: Formigas-cortadeiras; fungo simbiote; extratos de plantas.

## ABSTRACT

This work is an ongoing study that has been continuing for some years, on the subject “Toxic plants, leaf-cutting ants and associated microorganisms”. The research is on the effect of potentially toxic plants (and its derivatives) for the control of the leaf-cutting ants as a direct action against the insect, or as an inhibitor of the symbiotic fungus. For this objective the crude plant extract, fractions and pure substances were added to the medium cultures of the symbiotic fungus and compared to a control. The best results were obtained with the following compounds: **polyketides** present in dichloromethane extract of *Cedrela fissilis* (roots), **the palmitic and oleic acid** isolated from a fraction of hexane extract (fruits) of *Trichilia sp.*, **furanocoumarins** obtained from hexane and dichloromethane (twigs) of *Conchocarpus longifolius*, **syringaldehyde** and **vanillic acid** isolated from crude extract dichloromethane (stem) of *Pilocarpus grandiflorus*, **dictamine**, **isopimpinellin** and **skimmianine** obtained from methanol extract (roots) of *Adiscanthus fusciflorus*, **xanthoxyletin** and **suberosin** isolated from dichloromethane extract (roots) of *Citrus limonea*. Crude extract hexane and dichloromethane (branches) of the specie *Protium heptaphyllum* presented a high potential of inhibition as well as some resulting fractions but the active pure substances were still not isolated. The activity of vegetable extracts and their derivatives also was determined on other microorganisms. Tests were done by the disk diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for some pure substances. Although the majority of the extracts and/or derivatives of the plants had a minimal inhibitory effect on the microorganisms tested, the level of inhibition was low to moderate and was restricted almost exclusively to the Gram-positive bacteria. Therefore the main compounds to be highlighted were **palmitic acid**, obtained from a fraction of hexane extract (fruits) of *Trichilia sp.* and four furanocoumarins (**3-methoxyangelicin**, **sphondin**,

**cyanocoumarin-D** and **pimpinellin**) obtained from fractions of hexane and dichloromethane (twigs) extracts of *C. longifolius*.

Keywords: Leaf-cutting ants; symbiotic fungus; plant extracts.

## SUMÁRIO

|  | Página |
|--|--------|
| 1.INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA .....   | 10     |
| 1.1.As formigas cortadeiras .....  | 10     |
| 1.2.O fungo simbionte .....  | 13     |
| 1.3.Simbiose .....   | 14     |
| 1.4. <i>Streptomyces</i> .....   | 17     |
| 1.5. Métodos de controle das formigas-cortadeiras .....  | 17     |
| 1.6. Os vegetais e as aplicações de seus compostos secundários .....                               | 20     |
| 1.6.1. Inseticidas .....   | 20     |
| 1.6.2 Antibióticos .....   | 25     |
| 2. OBJETIVOS .....   | 29     |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 30     |
| 3.1. Isolamento do fungo simbionte linhagem MP2001 .....   | 30     |
| 3.2.Extratos vegetais e demais substâncias testadas sobre o fungo e outros<br>microrganismos ..... | 31     |
| 3.3. Preparo dos extratos vegetais .....   | 33     |
| 3.4.Preparo do meio para ensaio com o fungo simbionte .....  | 34     |
| 3.5.Preparo do inóculo .....   | 34     |
| 3.6.Determinação do peso seco .....  | 34     |
| 3.7.Avaliação do crescimento do fungo simbionte .....  | 35     |
| 3.8.Outros microrganismos testados com extratos vegetais .....                                     | 35     |
| 3.9.Método de difusão em ágar utilizando discos de papel de filtro .....                           | 36     |
| 3.9.1.Aplicação dos extratos brutos e demais substâncias nos discos de papel de filtro             | 36     |
| 3.9.2. Procedimento do ensaio .....  | 36     |
| 3.10.Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) pelo método da<br>microdiluição.....     | 37     |
| 3.10.1.Utilizando o indicador Alamar Blue (MABA) .....   | 37     |
| 3.10.2.Utilizando o indicador Cloreto de Trifenil Tetrazolium (TTC) .....                          | 38     |
| 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 39     |
| 4.1.Família Meliaceae .....  | 39     |
| 4.1.1. <i>Cedrela fissilis</i> .....   | 39     |
| 4.1.2. <i>Cipadessa fruticosa</i> .....  | 50     |
| 4.1.3. <i>Trichilia sp.</i> , <i>T. pallida</i> e <i>T. Rubra</i> .....                            | 54     |
| 4.2. Família Burseraceae .....   | 60     |
| 4.2.1. <i>Protium heptaphyllum</i> .....   | 60     |
| 4.3. Família Rutaceae .....  | 63     |
| 4.3.1. <i>Conchocarpus longifolius</i> .....   | 63     |
| 4.4.Substâncias puras .....  | 70     |
| 4.4.1 Substâncias puras isoladas de <i>Pilocarpus grandiflorus</i> (Rutaceae) .....                | 70     |
| 4.4.2. Substâncias puras isoladas de <i>Adiscanthus fusciflorus</i> (Rutaceae) .....               | 73     |
| 4.4.3. Substâncias puras isoladas de <i>Trichilia rubra</i> (Meliaceae) .....                      | 76     |
| 4.4.4. Substâncias puras isoladas de <i>Citrus limonea</i> (Rutaceae) .....                        | 76     |
| 4.4.5. Mexicanolídeo, Astilbina e Flavona .....  | 78     |
| 5. CONCLUSÕES .....  | 79     |
| 6. REFERÊNCIAS .....   | 83     |

## **Introdução e Revisão da literatura.**

### **1.1 As formigas-cortadeiras.**

As formigas representam uma das sociedades mais complexas da ordem Hymenoptera, família Formicidae e sua existência data de cerca de 100 milhões de anos, desde o período Cretáceo (WILSON, 1987). A maioria das espécies de formigas se alimentam de outros insetos. A tribo Attini está no ápice da maior subfamília (Myrmicinae) (WEBER, 1982), cujos membros caracterizam-se por serem simbiotes obrigatórios de um fungo utilizado por eles como alimento (WEBER, 1972). O fungo é cultivado no interior dos ninhos, nas chamadas “panelas” subterrâneas ou jardins de fungo (MARICONI, 1985) que podem ser um amplo jardim (50 cm de diâmetro) ou um número de pequenos jardins (25 a 30 cm) (WEBER, 1966), conforme a espécie de formiga considerada.

Segundo Currie (2001), a tribo Attini abrange 12 gêneros e cerca de 210 espécies. Os gêneros primitivos *Cyphomyrmex*, *Mycetophylax*, *Mycocepurus*, *Myrmicocrypta*, *Apterostigma*, *Mycetosoritis* e *Mycetarotes* utilizam fezes e carcaças de insetos ou matéria

vegetal em decomposição como substrato para o fungo. O gênero *Pseudoatta* abrange espécies parasitas e são destituídas de operárias. Os gêneros *Trachymyrmex*, *Sericomyrmex*, *Acromyrmex* (quenquéns) e *Atta* (saúvas) pertencem ao grupo chamado Attini superiores.

Recentemente, Brandão e Mayhe-Nunes (2001) descreveram um novo gênero, *Mycetagroicus*, o qual abrange três novas espécies.

Somente as formigas do gênero *Acromyrmex* e *Atta* são conhecidas como cortadoras de folhas, pois cultivam seu fungo predominantemente sobre fragmentos frescos de origem vegetal (folhas e flores, principalmente) (WEBER, 1972; HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Segundo Wilson (1980), *Acromyrmex* e *Atta* são também os gêneros mais evoluídos, apresentando polimorfismo e ninhos complexos. Vilela et al. (1987) relataram ainda a presença de castas distintas, ou seja, divisão de tarefas, na qual a rainha desempenha a função exclusiva de reprodução, os soldados protegem o formigueiro, as operárias são responsáveis pelo forrageamento e as jardineiras cuidam dos jardins de fungo.

Em certas épocas do ano (geralmente entre outubro e dezembro), os formigueiros adultos produzem formas aladas e férteis (DELLA LUCIA; VILELLA, 1993). Durante o vôo nupcial (revoada), ocorre a fecundação das fêmeas (popularmente conhecidas como içás) pelos machos (conhecidos como bitus) (MARICONI, 1985).

Ao deixar o ninho para iniciar o vôo nupcial, a rainha virgem leva uma pequena parte do micélio do fungo simbiote na cavidade posterior à boca (cavidade infrabucal) para com ele iniciar um novo jardim de fungo no futuro formigueiro (MARICONI, 1985).

Ao iniciar a nova colônia, esta pequena porção de fungo recebe muita atenção, sendo “lambido” e “adubado” com gotículas fecais. No quarto ou quinto dia, já se notam filamentos na cultura do fungo sobre a qual, iniciada a postura, são depositados os ovos, que em 45-60 dias darão origem à diferentes castas de formigas operárias (MARICONI, 1985). Quando o fungo está desenvolvido, as jardineiras continuamente retiram pedaços, os quais são utilizados

para a alimentação, principalmente das larvas. Pelo trabalho contínuo das forrageadoras, o fungo tem sempre substância com que se renovar e expandir. Por outro lado, a matéria vegetal esgotada pelo fungo é retirada e conduzida às “panelas” de lixo (onde são também depositadas as formigas mortas) (MARICONI, 1985).

As formigas da tribo Attini ocorrem exclusivamente no continente Americano (aproximadamente 40° Latitude Norte à 44° Latitude Sul), mas espécies economicamente importantes (*Atta*) distribuem-se em faixas menores (WEBER, 1966), não havendo relatos de sua ocorrência no Chile e em algumas ilhas das Antilhas (MARICONI, 1970). Este gênero possui colônias que chegam a milhões de operárias e podem viver mais de 10 anos (WEBER, 1966). Seu prejuízo à agricultura deve-se à derrubada das florestas naturais para as práticas de monocultura (especialmente de citros, cana de açúcar, café, cacau, entre outros) o que acarretou um desequilíbrio ecológico proporcionando condições ideais para o estabelecimento e proliferação de colônias das formigas cortadeiras (CRUZ; BATISTA FILHO, 1993). Das quinze espécies de *Atta* existentes, ocorrem no Brasil (HÖLLDOBLER ; WILSON, 1990): *A. bisphaerica*, *A. capiguara*, *A. cephalotes*, *A. goiana*, *A. laevigata*, *A. opaciceps*, *A. robusta*, *A. silvae*, *A. vollenweideri* e *A. sexdens* (representada pelas subespécies *A. sexdens rubropilosa*, *A. sexdens piriventris* e *A. sexdens sexdens*). A distribuição geográfica abrange todo o território nacional, exceto Fernando de Noronha (MARICONI, 1970, 1976; DELLA LUCIA; VILELLA, 1993). A espécie mais conhecida e economicamente mais importante da América do Sul é *Atta sexdens*, causando maiores prejuízos à lavoura (GONÇALVES, 1942). Particularmente, a espécie *A. sexdens rubropilosa*, conhecida como "saúva limão", ocorre nos estados de São Paulo, sul e centro de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, sul do Mato Grosso, sul de Goiás e norte e oeste do Paraná (DELLA LUCIA; VILELLA, 1993). Devido à dificuldade do seu controle, caracteriza-se como uma das pragas que mais danos causam a agricultura nacional (MARICONI, 1985).

## 1.2. O fungo simbiote.

A grande maioria dos fungos cultivados pelas formigas da tribo *Attini* pertencem a dois gêneros, *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus* (tribo *Leucocoprinae*, Família Lepiotaceae (MUELLER et al., 1998), com exceção do gênero *Apterostigma*, a qual cultiva um fungo da família Tricholomataceae (CHAPELA et al., 1994).

Trabalhos recentes envolvendo formigas cultivadoras de fungo, concluíram que sua evolução é muito mais abrangente do que se esperava, sendo que, em algumas espécies de *Attini* inferiores, a transmissão do fungo simbiote não ocorre apenas por “transmissão vertical” mas também por “transmissão lateral” (entre espécies) (MUELLER et al, 1998; MUELLER et al., 2001; GREEN et al., 2002).

O fungo foi visto pela primeira vez em seu estado perfeito por Möller (1893), em ninho de *Acromyrmex disciger* Mayr., sendo classificado como Basidiomiceto e denominado *Rozites gongylophora*. Weber (1957) reclassificou-o em outro gênero, *Lepiota*, analisando material de ninhos de *Cyphomyrmex costatus* Mayr. Heim (1957) relacionou-o à *Leucocoprinus* e *Leucoagaricus* e Weber (1979) denominou-o *Leucocoprinus gongylophorus*, fato confirmado por Bononi et al. (1981).

Uma das dificuldades na identificação do fungo simbiote se deve ao fato de que a fase sexuada não é muito comum de ocorrer, pois as formigas limitam o seu desenvolvimento a uma fase vegetativa (BONONI et al, 1981) resultando na ausência das estruturas de frutificação, dificultando sua taxonomia. No entanto, alguns casos já foram observados (BONONI et al, 1981; MUCHOVEJ et al., 1991; CRUZ; BATISTA-FILHO, 1993; PAGNOCCA et al, 2001).

Após análises das descrições morfológicas de basidiomas fúngicos realizadas anteriormente, Singer (1986) renomeou o fungo das formigas *Attini* como *Leucoagaricus gongylophorus*, denominação bastante aceita atualmente. Como todas essas descrições foram

baseadas em aspectos morfológicos e muitas vezes em ninhos mortos ou em processo de regressão, a suspeita de que tais estruturas poderiam pertencer a contaminantes nunca foi completamente descartada. Entretanto, Pagnocca et al. (2001), descreveram a ocorrência da fase sexuada do fungo em um ninho natural de *Acromyrmex fallax* Santschi comprovando pela primeira vez, através de técnicas moleculares (RAPD), tratar-se do *Leucoagaricus gongylophorus* e não de um eventual contaminante.

O fungo produz estruturas especializadas chamadas gongilídeos, que são um entumescimento da porção terminal das hifas, ricos em lipídeos e carboidratos (QUINLAN; CHERRET, 1979) e que são fornecidos diretamente na boca das larvas pelas operárias que as alimentam.

### **1.3. Simbiose.**

Mutualismo é definido como uma interação benéfica recíproca entre diferentes organismos. No caso dos insetos, é estimado que 15 à 20% vivem em simbiose com microrganismos (BUCHNER, 1965 apud BORSAUX-EUDE; GROSS, 2000).

A associação formiga-fungo é muito antiga, datando de 45 - 60 milhões de anos atrás (MUELLER et al., 2001), mas até hoje não está totalmente desvendada. Para alguns autores, o fungo serve como principal fonte de alimento das operárias adultas bem como as larvas (WEBER, 1966; ANGELI-PAPA, 1984), sendo que as adultas preferem o estáfilo (conjunto de gongilídeos), ao invés da hifa para sua alimentação (QUINLAN ; CHERRET, 1979). Esta escolha pode ser explicada pelo acúmulo de nutrientes do gongilídeo, tornando disponível para as formigas um material biológico pré-digerido, o que não ocorreria em uma hifa normal (ANGELI-PAPA ; EYME, 1985).

Por outro lado, Bass e Cherret (1995) concluíram que o fungo participa como alimento para as operárias apenas na ordem de 9,0%, sendo o restante obtido das seivas das plantas ainda durante o corte.

Algumas enzimas proteolíticas produzidas pelo fungo são ingeridas e concentradas pelas formigas e depois excretadas através do líquido fecal para otimizar a utilização do substrato vegetal (BOYD ; MARTIN, 1975).

Silva (2000), utilizando análises enzimáticas, concluiu que as formigas servem de “reservatório” de pectinases para o fungo e este contribui com fonte nutricional e enzimas necessárias para a manutenção das mesmas. Tal associação se justifica também pela capacidade metabólica do fungo de converter celulose e outros polímeros vegetais em produtos que poderiam ser metabolizados pelas formigas (SIQUEIRA et al., 1998).

O fungo também possui a habilidade de detoxificar certos metabólitos secundários vegetais, os quais podem ter propriedades inseticidas (DOWD, 1992) e assim podem oferecer uma vantagem adicional às formigas.

Cherret (1980) descreveu que o mutualismo entre as formigas cortadeiras de folhas e o fungo simbiote aumenta o grau de polifagia através da degradação desses compostos químicos que promovem a defesa das plantas, aumentando assim o nicho alimentar de ambos. Nesta relação mutualística, as formigas beneficiam seu fungo pela remoção das barreiras físicas como pêlos e ceras, além de outras que a planta possui para se prevenir contra a entrada de fungos patogênicos (CHERRET et al., 1989).

É sabido também que esse fungo não é encontrado na forma livre na natureza, ou seja, sem a presença das formigas, pois o fungo não consegue competir com outros microrganismos, principalmente outros fungos (QUINLAN; CHERRETT, 1978).

O tratamento dado pelas formigas ao material vegetal que serve como substrato para o fungo tem como objetivo aparente eliminar microrganismos presentes nas folhas, eliminar barreiras físicas e aumentar a superfície de contato. Mas como são eliminados ou inibidos todos os microrganismos que são trazidos para o formigueiro?

As formigas produzem substâncias com propriedades antibióticas em suas glândulas metapleurais (ácido fenilacético, ácido 3-hydroxidecanóico ou mirmicacina e ácido indolacético) (CHAPELLA et al, 1994; NASCIMENTO et al., 1996), mas nenhum desses compostos são tão potentes a ponto de garantir a estabilidade do formigueiro (HOLLDOBLER; ENGEL-SIEGHEL, 1984).

Angeli-Papa (1984) sugeriu que o fungo também pode ser uma fonte de antibióticos que complementaria a ação das formigas, mas este é um assunto controverso, pois segundo Martin et al. (1969) isto não deve ocorrer.

A verificação de uma possível propriedade antimicrobiana do fungo simbiote de *Atta sexdens* foi realizada por Ribeiro (2000) através do cultivo do fungo por 42 dias, seguindo-se da centrifugação para obtenção de um sobrenadante, ao qual foi incorporado ágar nutriente e sementeas bactérias isoladas de formigueiros e outras comumente utilizadas em ensaios de laboratório. Os resultados mostraram que não houve inibição das bactérias testadas quando a concentração final do sobrenadante ficou entre 150 µg/mL a 200 µg/mL.

É fato que existem muitos microrganismos nos jardins de fungo além do fungo simbiote (CRAVEN et al, 1970; PAGNOCCA et al., 1996b; CARREIRO et al., 1997) e tanto as possíveis interações microbianas quanto as interações microrganismo-inseto são ainda pouco conhecidas. Recentemente, Currie et al, (1999b) relatou a ocorrência de um fungo filamentos do gênero *Escovopsis* (Ascomycota) que foi considerado como parasita especialista de jardins de fungo de *Attini*. O mecanismo de patogenicidade do *Escovopsis* permanece obscuro. Segundo os autores, este ascomiceto pode ser um micoparasita, obtendo nutrientes somente do micélio do fungo cultivado pela formiga, ao invés do material vegetal do jardim de fungo. Uma outra hipótese seria que o *Escovopsis* inibiria competitivamente o fungo simbiote após a colonização do substrato vegetal presente na esponja.

#### 1.4. Streptomyces

Currie et al. (1999a) observaram ainda a existência de um terceiro mutualista na simbiose formiga cortadeira-fungo. Trata-se de uma bactéria filamentosa do gênero *Streptomyces*. Nos gêneros mais primitivos, *Apterostigma* e *Myrmicocrypta*, a bactéria se encontra nas pernas dianteiras, enquanto que nas *Attini* superiores, *Trachymyrmex* e *Acromyrmex*, é mais concentrada na propleura. Nestas duas últimas espécies pelo menos, a bactéria não é encontrada nos machos e está abundante nas rainhas virgens, sugerindo uma “transmissão vertical” (CURRIE, 2001). Segundo Currie et al. (1999a), a função desta bactéria seria de produzir uma substância com potencial antibiótico capaz de evitar infecções microbianas nos ninhos, especialmente em relação ao *Escovopsis*. Além disso, nesses estudos conduzidos pelo autor, o filtrado das culturas dessa bactéria promoveu um aumento do crescimento do fungo simbionte de *Apterostigma* ( $47,9 \pm 7,6$  mg de peso seco contra  $5,3 \pm 2,4$  mg de peso seco do controle). Dessa forma, os autores concluíram que alguma substância produzida pela bactéria pode também estimular o crescimento do fungo, beneficiando assim as formigas. No entanto, o fungo utilizado para o experimento não é da mesma família dos fungos cultivados pelas demais formigas da tribo Attini, podendo então, esse resultado ser exclusivo desse gênero. Um outro benefício para as formigas descrito por Currie (2001) é que esta bactéria pode também protegê-las de insetos patógenos que penetram no esqueleto das operárias e fungos entomopatógenos. Em contra-partida, as formigas dispersam os *Streptomyces* e lhes propiciam um nicho especial, além de lhes fornecer nutrientes para seu crescimento.

#### 1.5. Métodos de controle das formigas-cortadeiras

As formigas cortadeiras têm sido alvo de várias tentativas de controle que incluem desde receitas caseiras, que passam de geração em geração, até recursos de alta tecnologia. O

primeiro registro de combate à saúva ocorreu em 1587 e consistia em proteger as árvores atacadas isolando-as com água (AUTUORI, 1949).

Atualmente, essas formigas podem ser controladas com barreiras físicas, métodos culturais, biológicos e químicos. Entretanto, o controle químico é o mais empregado e disponível comercialmente, embora apresente algumas limitações (VILELA,1986). As estratégias de controle químico diferem, principalmente, pelo tipo de formulação, modo de aplicação e princípios ativos de diversos grupos químicos (BENDECK & NAKANO, 1998; NAKANO, 1998; RAETANO ; WILCKEN, 1998). Entre tais estratégias, as iscas tóxicas destacam-se por oferecerem maior segurança ao aplicador, dispensarem mão-de-obra e equipamentos especializados e permitirem o tratamento de formigueiros em locais de difícil acesso (LOECK; NAKANO, 1984).

Os inseticidas utilizados para o controle das formigas muitas vezes não produzem bons resultados. Isso ocorre devido a alguns fatores, tais como: emprego de formicidas não eficazes, emprego em dosagens erradas, distribuição parcial do formicida, entre outros. Mesmo quando empregados de maneira correta, os inseticidas utilizados no controle de formigas cortadeiras e outras pragas podem causar vários problemas, como: a) sua toxicidade, a qual não se restringe apenas aos insetos nocivos, mas também atinge outros insetos inócuos ou benéficos, devido ao seu amplo espectro de ação, causando um desequilíbrio ecológico no ecossistema; b) devido ao fato desses inseticidas serem utilizados em grande escala e associado às suas altas persistências no meio ambiente, eles incorporam-se na cadeia alimentar do homem apresentando efeito cumulativo no organismo humano com prejuízos fatais para a saúde; c) um grande número de insetos apresenta resistência a esses inseticidas (LARA ; BATISTA, 1992).

Até pouco tempo atrás, o controle das saúvas e quenquéns era realizado basicamente através do uso de produtos organoclorados, em diferentes tipos de formulação e técnicas de aplicação.

O sucesso do produto comercial Mirex® (dodecacloro), segundo Cherret (1986), foi atribuído à falta de repelência das iscas, ação lenta do tóxico possibilitando uma completa incorporação nos jardins de fungo (PEREGRINE ; CHERRET, 1974), além da estabilidade química e persistência que permitiram ao composto resistir ao metabolismo do fungo. Além de ser eficiente, apresentava baixo custo no mercado brasileiro.

Provavelmente, a propriedade mais desastrosa do dodecacloro é a extrema persistência e estabilidade em ambiente natural, além do poder de se acumular nos tecidos adiposos de animais.

Com a proibição do uso dos organoclorados no Brasil em 1985 e, principalmente, do dodecacloro em 1992 surgiu a necessidade de se testar novas substâncias em iscas granuladas para o controle de formigas cortadeiras. Desde então têm sido introduzidos novos compostos, dentre eles a sulfluramida, que atua no organismo no processo de fosforilação oxidativa, em nível mitocondrial, interrompendo a produção de ATP. Também tem sido utilizados o diflubenzuron, que é um regulador de crescimento, o fenoxicarbe, que não possui efeito inibitório para *Atta sexdens*, a avermectina B1, que é facilmente fotodegradável, entre outros. Dos novos grupos químicos, merecem destaque pelas boas qualidades formicidas, os inseticidas fipronil e hidrametilona, que atuam no sistema nervoso central (BOARETTO ; FORTI, 1997).

A termonebulização é outro método que tem sido empregado no controle de formigas-cortadeiras, principalmente a base de inseticidas piretróides e fosforados. No entanto, ele traz desvantagens operacionais e econômicas, tais como: o custo para aquisição e manutenção do

equipamento, transporte do equipamento, formulação especial do inseticida, tempo para tratar cada formigueiro e risco de intoxicação dos operadores (LARANJEIRO ; LOUZADA, 2000).

A relação de mutualismo que existe entre o fungo e a formiga sugere uma alternativa para o controle dessa espécie, sendo que novas técnicas têm sido estudadas na expectativa de um combate não apenas unilateral, reduzindo o impacto causado ao homem e ao meio ambiente.

## **1.6. Os vegetais e as aplicações de seus metabólitos secundários**

### **1.6.1 Inseticidas**

Algumas plantas são naturalmente resistentes aos danos provocados pelos insetos, pois produzem compostos que são tóxicos ou que rompem o ciclo de vida desses organismos (ARNASON et al., 1989). Essas substâncias, denominadas compostos secundários, ou aleloquímicos (WHITTAKER, 1972), são compostos biossinteticamente derivados de metabólitos primários e não tem função aparente, mas tem importante papel ecológico servindo, entre outros, como defesa química contra microrganismos, insetos e predadores (HARBORNE, 1972).

A maioria destes metabólitos pode ser obtida de partes de plantas por destilação ou por extração com solventes orgânicos ou aquosos e, com algumas exceções, eles tendem a ser de baixo peso molecular (geralmente menor que 2000) (TYLER,1981).

A evolução das preferências alimentares em insetos fitófagos é bastante influenciada pelo desenvolvimento desses metabólitos secundários (PANIZZI-PARRA, 1991). Alguns podem ser **repelentes** (agem a distância), **supressantes** (inibem o ato de provar o alimento), **deterrentes** (inibem a alimentação ou ovoposição), **intoxicantes** (causam intoxicações crônicas ou agudas) e **redutores da digestão** (inibem a utilização dos alimentos) (KOGAN, 1986 apud PANIZZI-PARRA, 1991).

A utilização de plantas inseticidas no controle de pragas não é uma técnica recente. Dentre os primeiros inseticidas botânicos conhecidos destacam-se a piretrina, princípio ativo extraído das flores do gênero *Chrysanthemum* (família Compositae), precursora dos inseticidas piretróides. Merecem também destaque a nicotina, alcalóide extraído principalmente das folhas do tabaco, *Nicotiana tabacum* (família Solanaceae), precursora do inseticida imidacloprida. A rotenona, extraída de raízes, folhas, ramos ou sementes de *Tephrosia*, *Derris*, *Lonchocarpus*, *Millettia*, *Mundulea*, *Spatholobus* e *Pachyrhizus*, todas plantas da família Leguminosae (DECKER, 1940; MARICONI, 1963; COATS, 1994). Estes produtos naturais praticamente deixaram de ser utilizados com o surgimento dos produtos organossintéticos. Outros inseticidas naturais enumerados por Mariconi (1963) foram os alcalóides: anabasina, extraído da planta *Anabasis aphylla* (família Chenopodiaceae); estricnina, obtida de plantas do gênero *Sttrychnos* (família Loganiaceae); rianodina, extraída de plantas do gênero *Ryania* (família Flacourtiaceae) e sabadina (LAGUNES; RODRÍGUEZ, 1992 apud ROEL et al., 2000) obtida da planta *Schoenocaulon officinale* (família Liliaceae).

Em revisão realizada por Jacobson (1989) é citado que os derivados botânicos mais promissores pertencem às famílias Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Annonaceae, Malvaceae, Labiatae e Canellaceae. Dentre estas, as famílias Meliaceae e Rutaceae, da ordem Rutales, são as mais estudadas devido a presença de limonóides com atividade biológica contra uma grande variedade de insetos (CHAMPAGNE et al., 1989).

O nim (*Azadirachta indica*) é uma Meliaceae considerada, atualmente, a mais importante planta inseticida, apresentando uma série de compostos químicos dos quais a azadiractina é a que apresenta maior atividade (VENDRAMIN, 2000). Os bons resultados obtidos têm estimulado a pesquisa de limonóides com outras meliaceas: *Melia azedarach* (CHIU, 1989; SCHMUTTERER, 1989; ABO EL-GHAR et al., 1996), *Trichilia* spp (XIE et

al., 1994; ROEL et al., 2000), *Cedrela toona* e *C. odorata* (KOUL ; ISMAN, 1992), *Toona ciliata* (AGOSTINHO et al., 1994) e *Aglaia* spp (SATASOOK et al., 1994).

Muitos fatores tem sido sugeridos para explicar o processo de seleção de plantas pelas formigas cortadeiras e Hubbel e Wiemer (1983) relacionaram os seguintes: presença de compostos secundários tóxicos para as formigas, para o fungo ou para ambos; presença de compostos secundários que possivelmente reduzem a digestibilidade do material vegetal (ex: taninos); valor nutritivo, incluindo proteínas, carboidratos e constituintes lipídicos necessários à formiga e ao fungo; mecanismos de defesa da planta, tais como dureza das folhas, densidade de pêlos e presença de látex e teor de umidade das folhas.

O comportamento forrageiro também tem um papel importante no processo de seleção. Assim, os fatores comportamentais que podem influenciar no forrageamento são: a disponibilidade de plantas hospedeiras; o sistema de trilha desenvolvida e a experiência prévia da formiga com certas plantas e não com outras; gastos energéticos maiores (distância das plantas); competição com colônias rivais em territórios adjacentes e a presença de espécies de formigas agressivas (HUBBEL; WIEMER, 1983). Bueno et al. (1990) acrescentaram também a alteração no balanço químico das plantas (provocado por mudanças sazonais) e fases diferentes na atividade forrageira das colônias.

Esse comportamento seletivo foi primeiramente investigado por Cherret (1968), o qual observou que uma colônia de *Atta cephalotes* na Guiana corta algumas espécies de plantas mais freqüentemente que outras, independente da quantidade da planta. As espécies introduzidas e/ou cultivadas são mais susceptíveis à predação (LITTLEDYKE ; CHERRET, 1975; CHERRET, 1981). Por outro lado, há ainda aquelas espécies que são praticamente imunes ao ataque das formigas (ROCKWOOD, 1975, 1976; HOWARD ; WIEMER, 1986).

Bueno et al. (1989) informaram que as plantas que são bastante atacadas no campo são também preferidas em laboratório e plantas não procuradas no campo são pouco cortadas em

laboratório. A hipótese de que os aleloquímicos vegetais determinam a escolha do material de forrageamento é uma área de pesquisa bastante interessante para o conhecimento da biologia das formigas cortadeiras.

Em geral, as pesquisas realizadas com substâncias vegetais tóxicas às formigas cortadeiras têm se concentrado em plantas usualmente não atacadas, e tem fornecido subsídios para identificar os compostos químicos como deterrentes ou repelentes. Assim, Hubbell et al. (1983) mostraram que numerosas espécies de plantas tropicais são imunes ao ataque das formigas devido a presença de terpenóides específicos em seus tecidos foliares. Esses autores verificaram que as formigas do gênero *Atta* não atacam folhas de *Hymenaea courbaril* por causa da presença do epóxido de cariofileno, o qual, além de repelente, também é fungicida.

Howard et al. (1988) estudaram a toxicidade das substâncias epóxido de cariofileno e nerolidol, terpenóides isolados da planta nativa *Vismea baceifera*, verificando efeitos deletérios para operárias de *A. cephalotes* isoladas do formigueiro. Essas substâncias, quando incorporadas em meio de cultura, inibiram o crescimento do fungo simbiote.

Mullenax (1979) descreveu o efeito deletério provocado por folhas de *Canavalia ensiformis* à ninhos de *Atta spp* em condições naturais. Febvay et al. (1985) notaram que formigas da espécie *A. octospinosus* desfolharam severamente plantações de inhame, mas a variedade *Dioscorea cayenensis sp cayenensis* não foi atacada. Este comportamento, verificado no campo e confirmado em laboratório, é de origem química e o composto responsável por essa resistência parece pertencer ao grupo das saponinas - sapogeninas.

Outras substâncias que vem sendo estudadas são as lignanas (grupo de substâncias ao qual pertence a sesamina), como as isoladas por Fraga (1987) de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). Em 1989, Bueno et al., verificaram que as folhas desta planta são pouco transportadas pelas saúvas *Atta sexdens* e, posteriormente Pagnocca et al. (1996b) analisaram o efeito de oito lignanas extraídas de *V. sebifera*, *Virola sp.* e *Otoba parvifolia* sobre o

desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote. Ao lado de moléculas inócuas, a sesamina foi a que mostrou maior potencial, inibindo completamente o crescimento do fungo à concentração de 70 µg/ml.

O gergelim, *Sesamum indicum* (Pedaliaceae) é uma planta exótica que já foi utilizada, empiricamente, no controle de saúveiros de campo (SANTOS, 1925; BORGES, 1926; BARRETO, 1930 e 1936), mas é considerada aceitável por *A. sexdens* (SOUZA, 1965; BUENO et al., 1989). Bueno et al. (1995) verificaram uma regressão gradual no número de formigas e na massa fúngica até a completa extinção dos formigueiros mantidos em laboratório e tratados com folhas de sesame. Paralelamente aos estudos realizados com os formigueiros e com as formigas isoladas, Pagnocca et al. (1990) verificaram que extratos de diferentes órgãos desta planta inibiram o crescimento *in vitro* do fungo simbiote, fato este atribuído a uma complexa mistura de ácidos graxos (PAGNOCCA et al., 1996a).

Hebling et al. (1996) verificaram, em laboratório, que formigueiros de *A. sexdens* tratados com folhas de *Ricinus communis* (Euphorbiaceae), apresentaram decréscimo gradual no volume do jardim de fungo, aumento na mortalidade das formigas e extinção após a sexta semana de tratamento. Além disso, os autores também relataram que operárias retiradas de formigueiros tratados com folhas dessa planta apresentaram um aumento no metabolismo respiratório.

Torkomian (1994) já havia relatado efeitos inibidores no desenvolvimento do fungo isolado, após a incorporação dos extratos foliares brutos hexânico e metanólico de *R. communis* no meio de cultura. A autora verificou que a fração metanólica do extrato bruto hexânico foi a principal responsável pela inibição observada.

Testes de toxicidade para as operárias de *A. sexdens*, realizados por Acácio-Bigi (1997) e Acácio-Bigi et al. (1998), levaram à identificação do alcalóide ricinina nos extratos foliares da mamona, como o princípio ativo.

De acordo com Rodríguez-Gamboa et al. (2000) duas subfrações provenientes da fração aquosa do extrato hidroalcoólico de *Picramnia teapensis* (Simaroubaceae) inibiram o crescimento do fungo simbionte. As substâncias antifúngicas identificadas foram oxantrona (mayosídeo) e uma mistura de antraquinona (emodina) e cumarina (umbeliferona). Victor (2001) verificou que, na mistura, a umbeliferona foi a substância responsável pela inibição.

Hebling et al. (2000) analisaram o efeito de *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) em formigueiros de *Atta sexdens* L., sugerindo uma ação tóxica dos metabólitos secundários da planta por contato ou ingestão da seiva, ocasionando aumento da mortalidade entre as formigas e inibição no jardim do fungo.

Com base nesses resultados, uma série de substâncias de estrutura química análogas à sesamina foram sintetizadas e algumas delas mostraram boa atividade formicida e inseticida, simultaneamente (VICTOR, 2001; VICTOR et al., 2001).

Nessa linha de pesquisa, visamos explorar o potencial dos compostos vegetais a fim de obtermos substâncias com potencial fungicida e formicida.

### **1.6.2. Antibióticos**

As plantas têm desempenhado um papel muito importante na evolução humana, fornecendo alimentos, abrigo, roupas, meios de transporte, fertilizantes, fragrâncias, inseticidas e também remédios. Em revisão descrita por Cragg e Newman (2001), apontou-se os primeiros registros de plantas utilizadas como medicamento na região da Mesopotâmia há cerca de 2600 anos A.C., onde eram utilizados óleos de espécies de *Cedrus*, *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, espécies de *Commiphora* e *Papaver somniferum*.

Em seguida (1500 A.C), um documento egípcio descrevia 700 drogas, sendo a maioria obtidas de plantas. Depois disso, vieram os chineses, os gregos e os romanos, todos descrevendo propriedades farmacológicas das plantas, contribuindo para os nossos conhecimentos atuais.

Até hoje, muitas dessas plantas são utilizadas, sendo que países como a China e a Índia mantêm esses conhecimentos em sua cultura através de gerações (CHANG; BUTT, 1986; KAPOOR, 1990).

Vários compostos já foram isolados de vegetais e identificados de acordo com sua atividade biológica e muitos deles são ainda utilizados na medicina, como a emetina, da espécie *Cephaelis ipecacuanha* e a morfina, da planta *Papaver somniferum*, entre outras (DI STASI, 1996).

A importância dessa fonte rica em compostos com atividade biológica tem aumentado o interesse de pesquisadores. Nos Estados Unidos, em pesquisa abrangendo os anos de 1959 à 1980, cerca de 119 substâncias químicas, derivadas de 90 espécies de plantas podem ser consideradas como importantes drogas em uso em um ou mais países, sendo que dessas 119 drogas, 74% foram descobertas como um resultado de estudos químicos direcionados ao isolamento de substâncias ativas de plantas utilizadas na medicina tradicional (FARNSWORTH et al., 1985).

Algumas famílias de plantas são caracterizadas por possuírem metabólitos secundários de grupos químicos específicos (SIMÕES et al., 2002). Sabendo que, os alcalóides e terpenos parecem ter maior potencial para fornecer compostos com atividade farmacológica, vindo a seguir as lignanas, flavonóides e cumarinas (DI STASI, 1996), famílias de plantas que produzem tais substâncias tornam-se o alvo de pesquisas visando o isolamento de compostos com propriedades farmacológicas.

O Brasil tem uma grande biodiversidade de plantas tropicais mas somente algumas foram estudadas com relação a farmacologia, toxicologia e aspectos químicos visando a descoberta de novas drogas (DI STASI et al., 2002). Dentre algumas das espécies estudadas, podemos destacar a *Vernonia brasiliensis* (com propriedades antimaláricas) (CARVALHO et al., 1991), *Psidium guajava* (GNAN; DEMELLO, 1999) e outras espécies do cerrado

brasileiro (com atividades antimoluscidal e antibiótica) (ALVES et al., 2000; BEZERRA et al., 2002), *Trixis praestans* e *Cunila spicata* (com atividade antiviral) (SIMÕES et al., 1999), *Conchocarpus inopinatus* e *Almeidea coerulea* (com atividade antitripanossomicida) (MAFEZOLI et al., 2000).

Os compostos vegetais têm sido amplamente estudados também quanto à propriedades antimicrobianas de alguns de seus metabólitos secundários (DI STASI, 1996). É muito provável que os derivados vegetais alcancem um lugar de destaque na antibioticoterapia, já que os custos na produção de um antibiótico tradicional é muito alto, além da resistência crescente pelos microrganismos aos antibióticos atuais (COWAN, 1999).

Além disso, alguns desses compostos podem ter propriedades antifúngicas (GRAYER; HARBORNE, 1994), tornando sua pesquisa indispensável, uma vez que tem havido um aumento da frequência e diversidade de infecções causadas por fungos oportunistas (PERFECT; SCHELL, 1996). Assim, Lemos et al. (1992) confirmaram o potencial de inibição dos óleos essenciais de folhas de *Lippi gracilis* H.B.K. (Verbenaceae), *Croton mucronifolius* Muell.-Arg. (Euphorbiaceae), *Cymbopogon nardus* Rendle (Gramineae) e frutos de *Xylopia sericea* St. Hil. (Anonaceae) tanto sobre bactérias quanto para fungos.

Segundo Martínez-Vázquez et al. (1999) o estudo de *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. (Malpighiaceae), mostrou que tanto os extratos de raízes quanto de caule, quando obtidos com acetato de etila, tiveram efeito inibitório ao crescimento de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*.

Tomesi et al. (1986) com pequenas concentrações de extratos extraídos com éter de petróleo de *Wedelia glauca* (Compositae) obteve resultados de Concentração Inibitória Mínima (MIC) de *Streptococcus faecalis* (250µg/ml), *Micrococcus luteus* (<50 µg/ml),

*Bacillus subtilis* (<50 µg/ml) e *Mycobacterium phlei* (<50 µg/ml) provavelmente devido à presença de ácido caurênico e derivados.

Esses e outros estudos em andamento têm mostrado que no futuro, talvez possamos usufruir de antibióticos de origem vegetal, tentando minimizar a incidência de infecções, os riscos de resistência e as doses, melhorando também o seu potencial.

## **2. Objetivos**

- 2.1. Verificar o efeito de substâncias de origem vegetal sobre o desenvolvimento *in vitro* do fungo simbiote *Leucoagaricus gongylophorus*.
- 2.2. Verificar a atividade inibitória desses produtos sobre outros fungos e bactérias, ampliando-se assim as informações sobre o espectro de ação desses produtos naturais.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS:**

#### **3.1. Isolamento do fungo simbiote linhagem MP 2001.**

O fungo utilizado foi retirado de um formigueiro da espécie *Atta sexdens* L. o qual foi coletado em uma fazenda na cidade de Corumbataí – SP no dia 01/04/95 e transferido para o laboratório do Centro de Estudos de Insetos Sociais – Unesp (formigueiro AT103). Foram retirados assepticamente pedaços da esponja os quais foram semeados em placas de Pétri contendo meio A (PAGNOCCA et al., 1990) com 0,02% de cloranfenicol. Após 4 dias de crescimento foram transferidos para tubos inclinados contendo 18 mL de meio A e incubados por 30 dias/25 °C.

### 3.2. Extratos vegetais e demais substâncias testadas sobre o fungo e outros microrganismos:

Família Meliaceae:

- *Cedrela fissilis* Vell. (synon. *Surenus fissilis* Kuntze) – Nome popular: Cedro, Cedro real (LORENZI, 1992), Cedro batata (PIOCORREA, 1978)

Partes utilizadas: Raízes, frutos, galhos, caule e folhas.

Data da coleta: 06 de janeiro de 2001 Local: Campus da Universidade Federal de São Carlos

- *Cipadessa fruticosa* Blume - sinonímia *Cipadessa baccifera* (LUO et al.,2000)

Partes utilizadas: Frutos, galhos, folhas, sementes e casca dos frutos.

Data da coleta: frutos (fevereiro de 1992), folhas e galhos (fevereiro de 2000) – Local: Universidade Federal de Viçosa – MG.

- *Trichilia sp.* P. Browne .

Partes utilizadas: Frutos, galhos e folhas.

Data da coleta: 14/05/2000 – Local : Rio Mucurizinho em Mucuri- BA, exsicata depositada no Jardim Botânico de São Paulo sob número 476178.

- *Trichilia pallida* Sw. e *Trichilia rubra* C.DC .- Nome Popular: carrapeta, catiguá, quebramachado (LORENZI, 1992).

Partes utilizadas: Folhas e galhos.

Data da coleta: dezembro/2000 - Local : Manaus – AM, exsicata depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob os números: 188343 e 178677, respectivamente.

Família Burseraceae:

- *Protium heptaphyllum* March - Nome popular: Almecegueira-cheirosa (LORENZI, 1992).

Partes utilizadas: Folhas e galhos.

Data da Coleta: 13/05/2000 – Local: Estrada para Mucuri em Nova Viçosa - BA

Família Rutaceae:

- *Conchocarpus longifolius* (A. St-Hil) (Synon. *Galipea longifolia* A. St-Hil)

Partes utilizadas : Pecíolo e galhos.

Data da coleta : 14/05/2000 – Local : Mucuri – BA, exsicata depositada no Jardim Botânico de São Paulo sob número 568958.

Substâncias puras:

- **Flavona** – Flavonóide obtido comercialmente, cujo similar obtido de *Pilocarpus sp.* apresentou atividade contra o fungo simbionte (VICTOR, 2001).
- **Astilbina (dihidroquercetina 3-raminosídeo)** – Flavonóide com propriedades antioxidantes e inibidor da aldose redutase encontrado em várias espécies vegetais, como caule de alguns tipos de uva (SOUQUET et al., 2000) e folhas de árvores subtropicais chinesas (HARAGUCHI et al., 1996).
- **Mexicanolídeo** - Limonóide presente principalmente nas plantas da família Meliaceae e com atividade antifúngica à alguns fitopatógenos (GOVINDACHARI et al., 1999).
- Compostos aromáticos isolados do extrato diclorometânico (caule) de *Pilocarpus grandiflorus* Engl. (coletado em 25/01/1993 em Poço D'anta - Município de Murici – AL, cuja exsicata foi depositada no Jardim Botânico de São Paulo sob número 568961) : **siringaldeído, ácido vanílico e Ar1 (ainda não identificado)**
- Esteróides e alcalóides isolados do extrato diclorometânico (galho) de *P. grandiflorus* Engl.: **3b-hidroxi-stigmast-5-en-7-ona, Esteróide 5 (ainda não identificado), 4-metoxi-2-quinolona e ácido N',N'-dimetilantranílico.**
- Cumarinas isoladas de extrato diclorometânico (raiz) de *Citrus limoneae* - nome popular: Limão cravo (coletado em fevereiro de 1999 no Instituto Agronômico de Campinas): **angelical, cumarina 02 (estrutura não identificada), suberosina, xantoxiletina e clausarina.**

- Substâncias isoladas do extrato metanólico da raiz de *Adiscanthus fusciflorus* Ducke (coletada em dezembro de 2000 e janeiro de 2001 em Manaus – AM, cuja exsicata foi depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob o número 189859): **A1 (ainda não identificado), esquimianina, isopimpinolina e dictamina.**
- **T11, T12 e T13 (substâncias derivadas do ácido dihidrocinâmico)** – Isolados do extrato hexânico da raiz de *A. fusciflorus*
- **TR2** – Substância isolada do extrato hexânico (folha) de *T. rubra*
- **Lupeol e Fridelina** - Isolados do extrato metanólico (folha) de *T. rubra*

### 3.3. Preparo dos extratos vegetais:

Os extratos vegetais foram preparados no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos procedendo-se da seguinte maneira:

- Secagem das partes das plantas em estufa a 40°C, por aproximadamente 24 horas e pulverização em moinho elétrico. Os pulverizados foram extraídos à temperatura ambiente e em repouso com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e metanol) durante 3 dias por 3 vezes e concentrados em evaporadores rotativos.
- Os extratos com melhor atividade foram fracionados através de cromatografia rápida sob vácuo em funil de placa sinterizada ( $\phi$  x h = 6,0 x 18,0 cm), utilizando-se sílica gel (70-230 mesh – 200 g) como fase estacionária e solventes em ordem crescente de polaridade como eluentes (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol – 1,5 L cada).
- As subfrações foram obtidas por cromatografia em coluna de sílica, sílica flash ou Sephadex (conforme o tipo de substância) utilizando diferentes solventes, com exceção das frações do extrato metanólico (fruto e folhas) de *Cedrela fissilis* e frações do extrato hexano (folhas e galhos) de *T. rubra*, as quais foram obtidas através de partição líquido-líquido.

### **3.4.Preparo do meio para ensaio com o fungo simbiote.**

Tanto os extratos brutos e frações, bem como as substâncias puras, foram incorporados ao meio de cultura nas concentrações desejadas através da dissolução prévia em solvente. O volume correspondente a 1,0 mL foi adicionado em tubos de ensaio contendo 9,0 mL de meio A (PAGNOCCA et al., 1990). Para os controles dos ensaios, aos 9,0 mL de meio A foram acrescentados 1,0 mL dos solventes usados para a preparação dos extratos vegetais.

Os materiais foram autoclavados a 120° C/ 15 minutos e homogeneizados com auxílio de um agitador tipo Vortex para propiciar uma boa distribuição e incorporação dos extratos no meio de cultura. Em seguida, os tubos foram inclinados para resfriamento.

### **3.5.Preparo do inóculo**

Para obtenção do inóculo utilizou-se culturas com trinta dias de desenvolvimento. O micélio presente em três ou quatro tubos foi transferido assepticamente para um homogeneizador de Potter contendo cerca de 3,0 mL de água peptonada 0,1 % (p/v) e triturado de modo brando, visando a obtenção de uma suspensão micelial homogênea. Em seguida, a suspensão micelial foi transferida para um frasco tipo Erlenmeyer contendo 100 mL de água peptonada 0,1% estéril e 1,0 mL foi utilizado como inóculo. Ao final da preparação e antes de sua utilização, uma amostra da suspensão micelial foi observada ao microscópio para constatação de que o material desagregado sofreu um mínimo de danos e também para checagem da pureza da cultura.

### **3.6.Determinação do peso seco**

Alíquotas de 5,0 mL de inóculo foram empregadas para determinação do peso seco em cada série de experimentos. Os materiais, colocados em vidro de relógio, foram secos em estufa de esterilização a uma temperatura de 70°C por 24 horas ou até peso constante.

### 3.7. Avaliação do crescimento do fungo simbiote

Após receber o inóculo, os tubos foram cuidadosamente manuseados visando uma distribuição uniforme dos fragmentos de micélio na superfície do ágar e foram mantidos inclinados em sala climatizada à temperatura de 25°C. Após 30 dias de incubação foi realizada a leitura com base na quantidade e densidade do micélio, conforme padrão pré-estabelecido, a saber:

5+ = crescimento idêntico ao do controle = 100%

4+ = crescimento equivalente a 80% do controle

3+ = crescimento equivalente a 60% do controle

2+ = crescimento equivalente a 40% do controle

1+ = crescimento equivalente a 20% do controle ou inferior

0 = ausência de crescimento

Os resultados foram baseados no valor modal entre 5 tubos (repetição).

### 3.8. Outros microrganismos testados com os extratos vegetais.

Além do fungo simbiote das formigas, outros microrganismos foram testados quanto ao potencial antimicrobiano dos compostos vegetais:

- a) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
- b) *Bacillus cereus* (CCT 1436)
- c) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442)
- d) *Escherichia coli* (CCT 1457)
- e) *Candida albicans* (RJ/50008)
- f) *Cryptococcus laurentii* (RJ/50359)
- g) *Saccharomyces cerevisiae* (CCT 0758)
- h) *Trichosporon cutaneum* (UCD 121)

Excepcionalmente, os fungos *Rodothorula rubra* (RJ 50008), *Cândida Krusei* (RJ P/007) e *Geotrichum sp.* (RJ003) foram incluídos nos bioensaios com a flavona e com a dictamina. O mesmo com as bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) e *Micrococcus roseus* (CCT 1469) em presença destas e das seguintes substâncias puras: **A1, Isopimpineline, Esquimianina, T11, T12, TR2, lupeol, fridelina, angelical, cumarina 02, suberosina e xantoxiletina** (substâncias puras descritas nas páginas 32 e 33).

**3.9.Método de difusão em ágar utilizando discos de papel de filtro (BAUER et al.,1966).**

**3.9.1.Aplicação dos extratos brutos e demais substâncias nos discos de papel de filtro.**

Os extratos brutos e demais substâncias foram dissolvidos conforme a concentração desejada em solventes de melhor compatibilidade. Alíquotas (não superiores a 10 µL) deste material foram aplicadas aos discos aguardando a evaporação do solvente entre as aplicações. Os discos foram colocados em estufa a 45 °C durante uma noite para a secagem final.

**3.9.2. Procedimento do ensaio.**

Em placas de Pétri contendo 15 mL de meio (Ágar Mueller-Hinton para bactérias e Ágar Sabouraud para fungos) foram espalhados por meio de um “swab” estéril uma suspensão de microrganismos recentemente preparados (24 horas para bactérias e 48 horas para fungos) e diluídos em solução salina 0,9% correspondente à escala McFarland 0,5. Aguardou-se um período de 10 a 15 minutos, e então os discos (até doze discos/placa) foram regularmente distribuídos na superfície das placas com pinça e pressionados levemente sobre o ágar. Foi mantida uma distância de 1,5 cm entre os discos e de 1 cm da borda para evitar interferência entre os halos de inibição. Quinze minutos após a semeadura, as placas foram invertidas e incubadas.

Após 24 horas de incubação foi realizada uma leitura dos resultados das bactérias, enquanto que para os fungos foram realizadas leituras após 48 horas.

Os microrganismos cujo diâmetro dos halos de inibição formados foram iguais ou superiores a 8 mm foram considerados sensíveis. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

Discos controle foram preparados da mesma maneira contendo quantidades conhecidas de antibióticos, inclusive antifúngicos e o solvente de uso.

### **3.10. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo Método da microdiluição .**

Existem muitas técnicas empregadas para a determinação de susceptibilidade dos microrganismos. Sem dúvida as mais utilizadas são o teste de difusão em ágar (BAUER et al., 1966) e a concentração inibitória mínima (CIM) (FLEMING, 1929), mas, por apresentarem alguns inconvenientes, principalmente com relação ao tempo necessário para o resultado dos testes, novos métodos tem sido desenvolvidos, principalmente utilizando densidade ótica, substratos fluorescentes, corantes indicadores e métodos automatizados (PIDDOCK, 1990).

#### **3.10.1. Utilizando o indicador Alamar blue (MABA) (SALVAT et al., 2001).**

Em uma microplaca estéril de 96 pocinhos, foram depositados 100 µL de meio Mueller-Hinton, com exceção da coluna A (controle das amostras), que recebeu 150µL. Nesta coluna, foram acrescentados 50 µL da substância pura a ser testada (uma substância diferente para cada número); na coluna B, 100 µL do mesmo extrato foram homogeneizados com o meio e transferidos para o pocinho da coluna seguinte, repetindo-se esse procedimento até a coluna H, de modo a obter uma concentração decrescente do extrato. Os 100 µL finais foram desprezados. Então, foram adicionados aos pocinhos (com exceção da coluna A), 100 µL de uma suspensão de cultura recente (24 horas) do microrganismo-teste, cuja turvação foi ajustada à escala de McFarland nº 0,5 e diluídos na proporção de 1:100. Por último, foi adicionado 20 µL de Alamar Blue (um indicador de oxido-redução). As placas foram seladas

com parafilm e incubadas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  /24 horas. A CIM foi definida como a menor concentração da substância teste capaz de impedir a mudança de cor de azul para róseo.

Uma das colunas (a n° 1) sempre foi utilizada para um controle com antibiótico conhecido (tetraciclina ou cloranfenicol) e em outra coluna (geralmente a n° 12) os pocinhos foram utilizados para os seguintes controles : do microrganismo, do solvente e do meio de cultura.

### **3.10.2. Utilizando o indicador Cloreto de Trifenil Tetrazolium (TTC) (ELOFF, 1998, modificado).**

Esta técnica foi utilizada para comparação com a técnica anterior (principalmente pelo fato do TTC ser mais acessível) e o procedimento de preenchimento dos pocinhos da microplaca foram idênticos alterando apenas o corante utilizado (TTC à 0,5%) e o tempo de incubação (após 24 horas de incubação adiciona-se 20  $\mu\text{L}$  do corante e incuba-se por mais 2 horas). A CIM foi definida como a menor concentração da substância teste capaz de impedir o aparecimento da coloração vermelha.

## **4.RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Família Meliaceae**

A família Meliaceae é constituída por 51 gêneros de plantas lenhosas distribuídos pelos trópicos e subtropicais de ambos os hemisférios. No Brasil, são encontrados os gêneros *Cedrela*, *Carapa*, *Swietenia*, *Trichilia*, *Cabralea* e *Guarea*. Os gêneros *Cedrela*, *Swietenia* e *Cabralea* são exclusivamente americanos (PENNINGTON; STYLES, 1975).

#### **4.1.1. *Cedrela fissilis***

*Cedrela fissilis*, conhecida popularmente como cedro ou cedro real, apresenta grande importância econômica na indústria madeireira. No Brasil, esta árvore é encontrada do Rio Grande do Sul até Minas Gerais, principalmente nas florestas semidecídua e pluvial atlântica. Ocorre também em menor intensidade em todo o país (LORENZI, 1992). De grande porte (chegando até 30 metros de altura ou mais), sua madeira submetida à destilação por arraste à vapor, foi relatada originar um tipo de óleo essencial, o qual, possivelmente a protegeria de ataques de cupins e outros insetos (PIOCORREA, 1978). Extratos brutos de diversas partes

desta planta foram analisados quanto à atividade sobre o fungo simbiote e sobre outros microrganismos. Na tabela 1 podemos observar os resultados dos extratos brutos (raiz, fruto, galho, caule e folha) sobre o crescimento do fungo simbiote. Assim, dos extratos brutos de fruto, galho, caule e folha, alguns foram inativos e outros inibiram no máximo 40% o desenvolvimento do fungo (extratos brutos hexânico, ambos de galho e folha). Devido a baixa atividade, estes extratos deixaram de ser analisados. Dos extratos brutos da raiz, os que apresentaram melhor atividade foram o hexânico e o diclorometânico, ambos inibindo em 100% o crescimento do fungo simbiote na concentração de 1000 µg/mL. Estes extratos foram fracionados, dando continuidade aos nossos testes.

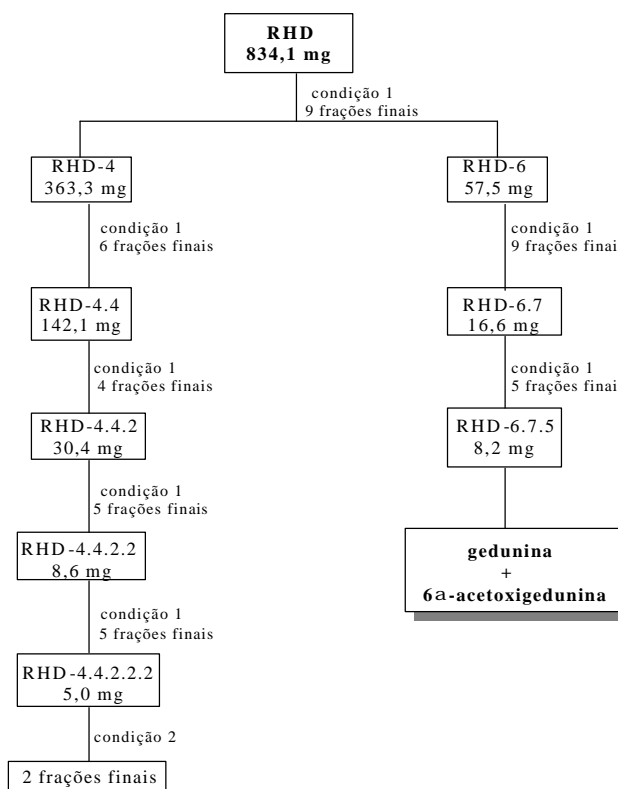
Tabela1. Efeito de extratos brutos de diferentes partes de *Cedrela fissilis* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote

| Órgão | Extrato bruto | % de inibição do fungo |
|-------|---------------|------------------------|
| Raiz  | Hexano        | 100                    |
|       | Dicloro       | 100                    |
|       | Metanol       | 40                     |
| Fruto | Hexano        | 0                      |
|       | Dicloro       | 0                      |
|       | Metanol       | 0                      |
| Galho | Hexano        | 40                     |
|       | Dicloro       | 20                     |
|       | Metanol       | 20                     |
| Caule | Hexano        | 20                     |
|       | Dicloro       | 0                      |
|       | Metanol       | 0                      |
| Folha | Hexano        | 40                     |
|       | Dicloro       | 0                      |
|       | Metanol       | 20                     |

Controle = 0% de inibição  
 Concentração = 1000 µg/mL  
 Peso seco do inóculo (7,0 ± 0,2 mg/mL)

O fracionamento do extrato bruto hexânico (raiz) resultou nas frações RHH, RHD, RHA e RHM. Todas essas frações, com exceção da fração RHM, tiveram, em maior ou menor intensidade, efeito sobre o fungo simbiote (tabela 2). A fração RHH, apesar da inibição total do fungo simbiote, não foi purificada devido a pouca quantidade da massa obtida. As restantes foram purificadas utilizando os procedimentos descritos nos fluxogramas 1 e 2 e identificadas através de análises de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN<sup>1</sup>H), Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN<sup>13</sup>C), infravermelho ou cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. O extrato bruto diclorometânico de raiz (RD) foi fracionado conforme representado no fluxograma 3 e a atividade das suas subfrações sobre o desenvolvimento do fungo simbiote também estão expressos na tabela 2.

#### Fluxograma 1 REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO RHD



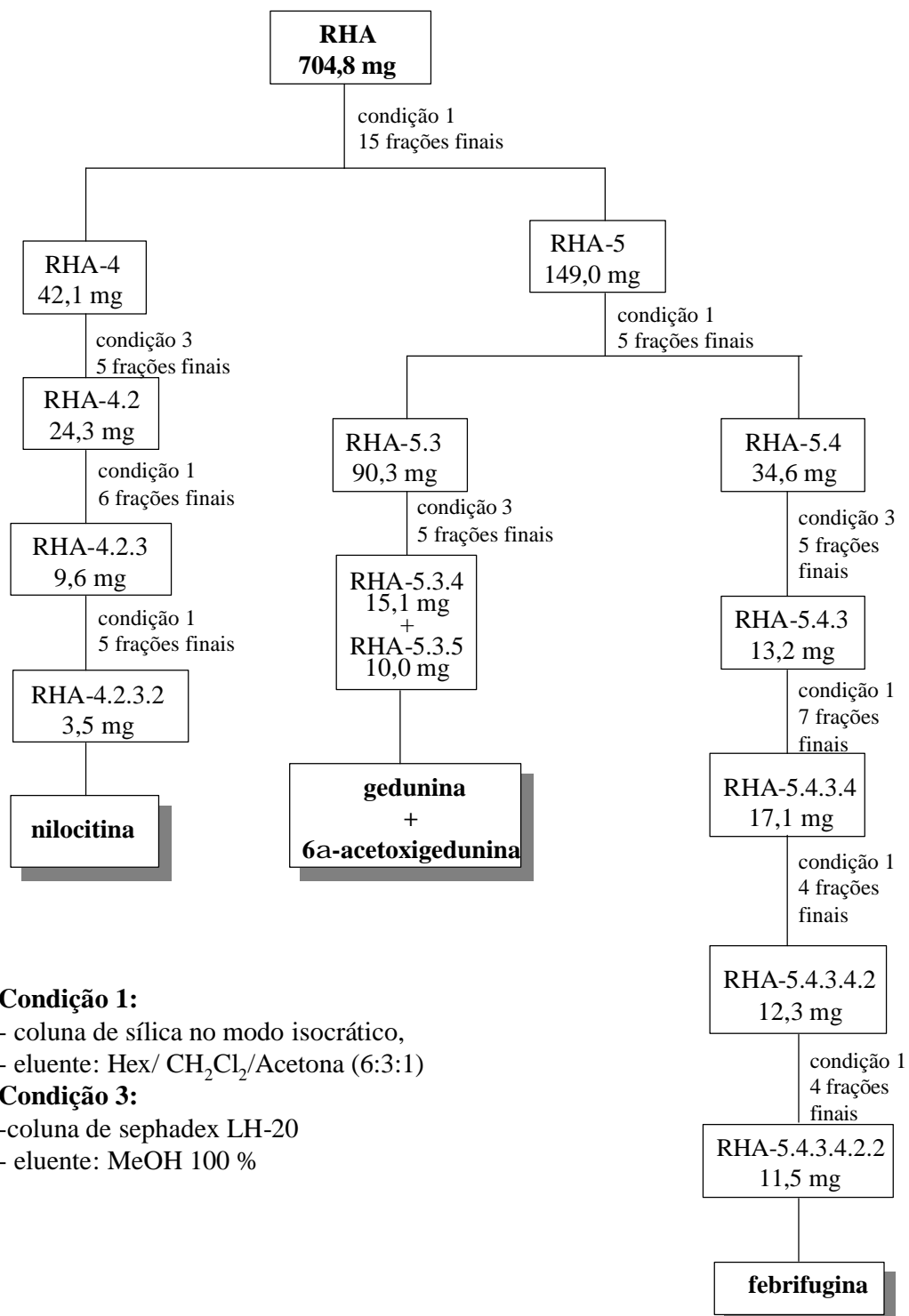
Condição 1:

- coluna de sílica no modo isocrático,
- eluente: Hex/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acetona (6:3:1)

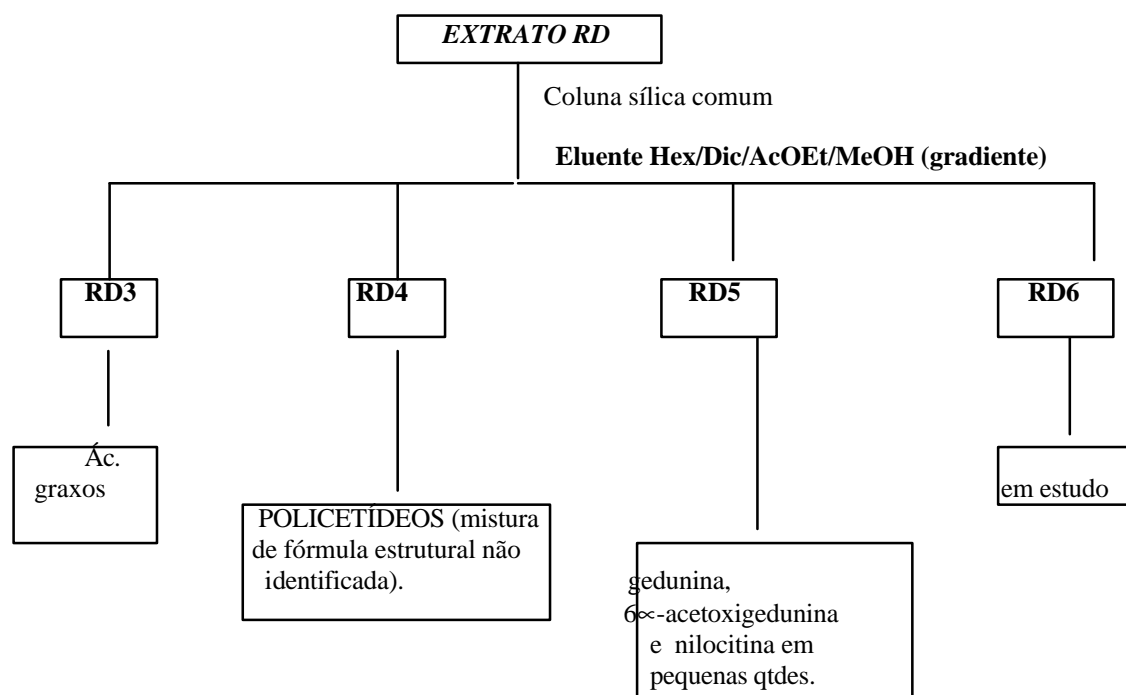
Condição 2:

- placa preparativa – 20 x 20 cm
- eluente: Hex/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acetona (6:3:1)

## Fluxograma 2 REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO RHA



Fluxograma 3. FRACIONAMENTO DO EXTRATO RD



Da fração RHA, foram isolados três limonóides (uma mistura de gedunina + 6 $\alpha$ -acetoxigedunina e a febrifugina) e um triterpeno (nilocitina), os quais não apresentaram atividade sobre o fungo simbiote. Também foram encontradas em todas subfrações de RHA, pequenas quantidades de policetídeos cujas fórmulas estruturais ainda não foram identificadas. Na fração RHD também foram encontrados os mesmos limonóides e pequenas quantidades dos policetídeos.

Do extrato RD, a fração RD3 resultante continha ácidos graxos que estão sendo identificados enquanto que da fração RD4 foram isoladas maiores quantidades dos policetídeos, o que possibilitou a avaliação da inibição destes compostos sobre o fungo simbiote na concentração de 42  $\mu\text{g/mL}$ , resultando em 100% de inibição (tabela 2).

A fração RD5 apresentou os mesmos compostos da fração RHA e a fração RD6 também apresentou pequenas quantidades dos policetídeos.

Tabela 2. Efeito das frações e subfrações dos extratos hexânico e diclorometânico (raiz) de *C. fissilis* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote.

| Fração | Subfração   | Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | % de inibição<br>do fungo |
|--------|---|--------------------------------------|---------------------------|
| RHH    |   | 300                                  | 100                       |
| RHD    |   | 270                                  | 100                       |
| RHA    |   | 138                                  | 60                        |
|        | <b>nilocitina</b>   | 56                                   | 0                         |
|        | <b>gedunina</b>   | 140                                  | 0                         |
|        | <b>febrifugina</b>  | 58                                   | 20                        |
|        | <b>gedunina + 6 <math>\mu</math>-<br/>acetoxigedunina</b> | 17                                   | 0                         |
| RHM    |   | 579                                  | 0                         |
| RD3    |   | 430                                  | 80                        |
| RD4    |   | 570                                  | 100                       |
|        | <i>Policetídeos*</i>                                      | 42                                   | 100                       |
| RD5    |   | 424                                  | 100                       |
| RD6    |   | 412                                  | 80                        |
| RD7    |   | 160                                  | 20                        |
| RD8    |   | 214                                  | 0                         |
| RD9    |   | 336                                  | 40                        |

Controle = 0% de inibição

Peso seco ( $7,4 \pm 0,4$  mg/mL)

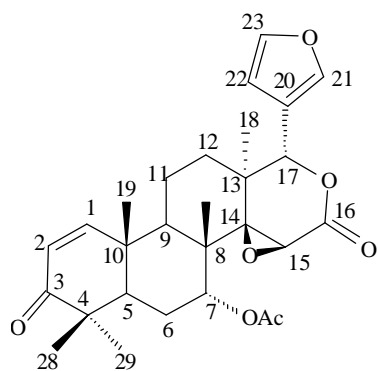
\*policetídeos: provavelmente uma mistura

Portanto, dos compostos isolados da raiz de *Cedrela fissilis* os melhores resultados foram obtidos com a mistura de policetídeos, cujas fórmulas estruturais ainda estão em processo de identificação. A atividade apresentada por RHA e RHD pode ser devido a presença de pequenas quantidades da mistura de policetídeos. Uma outra hipótese para a atividade observada com RHA e RHD seria um possível sinergismo entre as substâncias presentes nestas frações que, quando separadas, perdem sua atividade. Este efeito sinérgico já foi demonstrado em outros estudos envolvendo produtos naturais (VICTOR, 2001; ZANCUL,

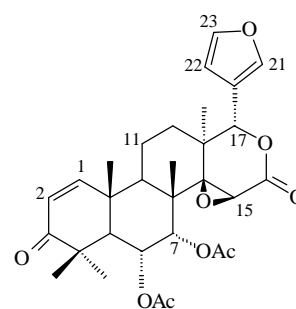
2001; MAFEZOLI et al., 2000). Também devemos considerar que a concentração dessas frações nesses ensaios foram elevadas, o que também pode ter influenciado nos resultados.

Alguns compostos isolados de *Cedrela spp.*, inclusive a gedunina, demonstraram atividade inseticida e larvicida para a espécie *Spodoptera frugiperda*, um inseto que provoca muitos danos à agricultura mexicana (CESPEDES et al., 2000). Em estudos realizados paralelamente com as formigas, Bueno (2002) também verificou toxicidade às operárias nos mesmos extratos e frações tóxicos ao fungo. No entanto, a única substância pura ensaiada foi a gedunina na concentração de 100 µg/mL, a qual reduziu 100% o número de operárias em 14 dias contra 86% do controle em 25 dias. Este estudo nos indica que, nos extratos obtidos de *Cedrela fissilis*, existem metabólitos secundários com potencial fungicida e formicida, conforme esperávamos encontrar.

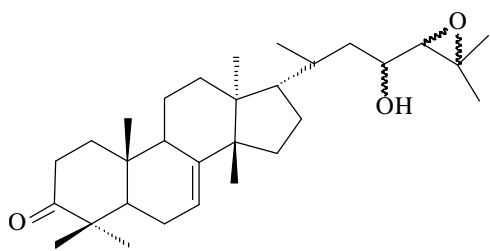
Estruturas dos compostos isolados do extrato RH de *Cedrela fissilis*



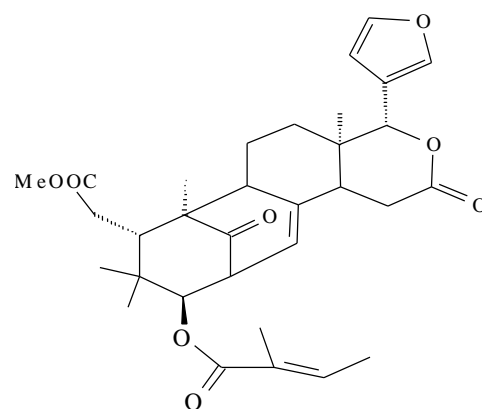
gedunina



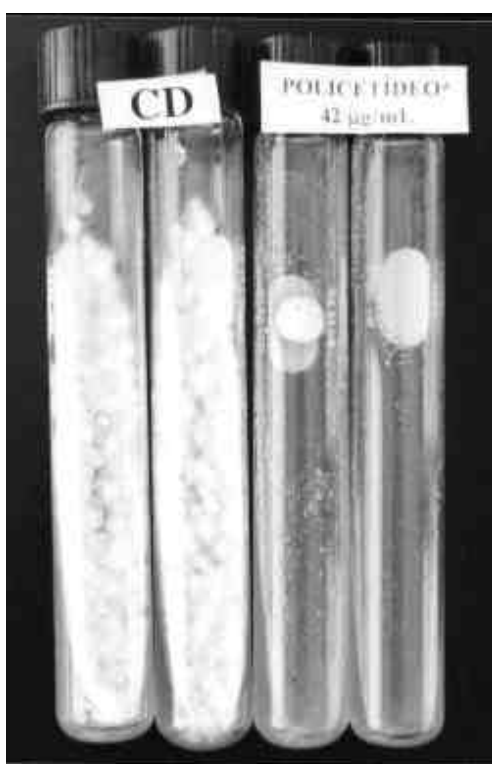
6α-acetoxigedunina



nilocitina



febrifugina

**Figura 1. Efeito dos policetídeos sobre o desenvolvimento do fungo simbiote.**

Da esquerda para a direita: 2 tubos da esquerda CD = controle do solvente (diclorometano); 2 tubos a direita = policetídeos (42 µg/mL). Observar que a área de crescimento e densidade micelial foi reduzida em 100%.

Continuando os ensaios com *Cedrela fissilis*, os extratos brutos foram também analisados quanto à atividade antimicrobiana envolvendo outros microrganismos. Assim, na tabela 3 podemos verificar os resultados referentes aos extratos e frações de *Cedrela fissilis*. Os maiores halos foram obtidos dos ensaios com os extratos diclorometânico (fruto) e metanólico (fruto e folha). Esses extratos mais ativos foram fracionados por partição líquido-líquido conforme o fluxograma 4 e as frações mais ativas de ambos os extratos foram as n-butanólicas. As bactérias Gram-negativas e os fungos leveduriformes testados não foram inibidos.

Fluxograma 4. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

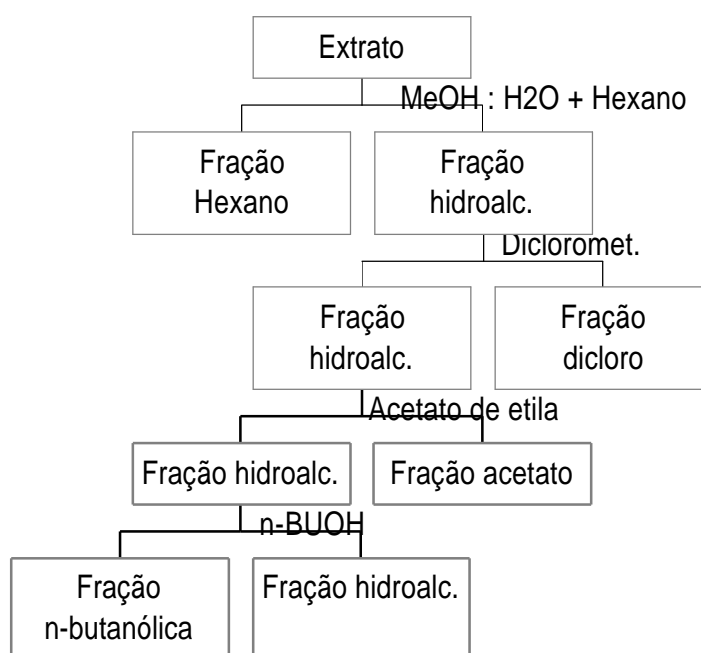
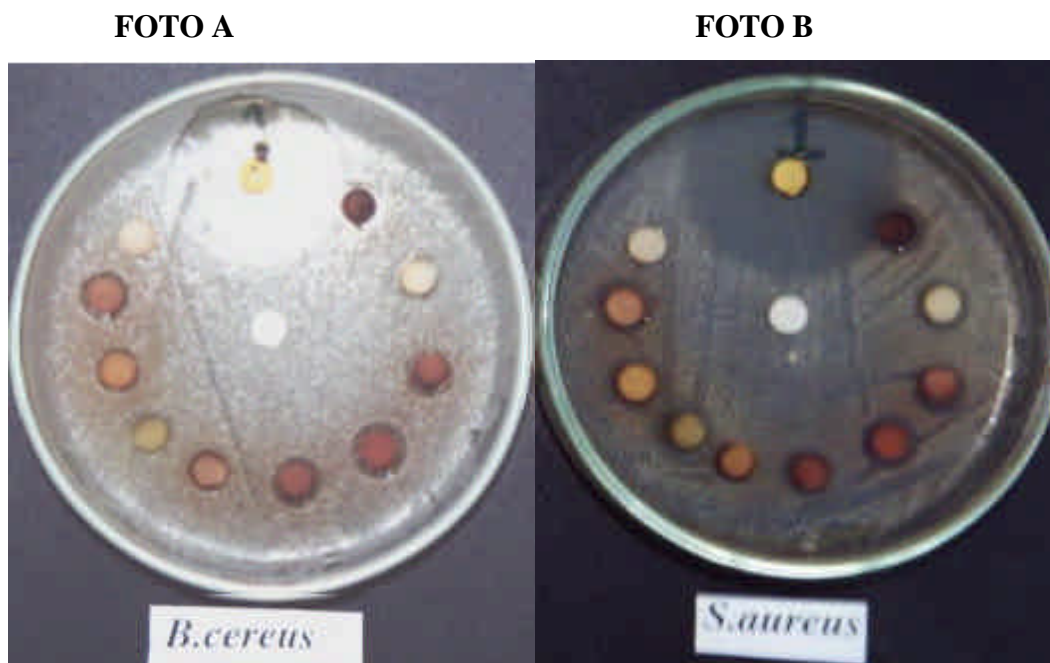


Tabela 3. Diâmetro dos halos de inibição dos microrganismos em presença de extratos e frações de *Cedrela fissilis*

| Órgão | Extrato<br>bruto | Fração         | Concentração<br>(µg/disco) | Microrganismo(mm) |                 |
|-------|------------------|----------------|----------------------------|-------------------|-----------------|
|       |                  |                |                            | <i>B.cereus</i>   | <i>S.aureus</i> |
| Raiz  | Hexano           |                | 1000                       | 14                | -               |
|       |                  | RHH            | 300                        | NT                | NT              |
|       |                  | RHD            | 270                        | 09                | 08              |
|       |                  | RHA            | 138                        | NT                | NT              |
|       | Dicloro          |                | 1000                       | 09                | -               |
|       | Metanol          |                | 1000                       | 11                | -               |
| Fruto | Hexano           |                | 1000                       | 10                | -               |
|       | Dicloro          |                | 1000                       | 10                | 12              |
|       | Metanol          |                | 1000                       | 14                | 10              |
|       |                  | Hexano         | 364                        | -                 | -               |
|       |                  | Dicloro        | 270                        | 09                | 09              |
|       |                  | Acetato        | 329                        | 09                | 09              |
|       |                  | n-butanol      | 315                        | 10                | 10              |
|       |                  | Hidroalcoólico | 228                        | 09                | 08              |
| Galho | Hexano           |                | 1000                       | 11                | -               |
|       | Dicloro          |                | 1000                       | 14                | -               |
|       | Metanol          |                | 1000                       | 12                | -               |
| Caule | Dicloro          |                | 1000                       | 09                | -               |
|       | Metanol          |                | 1000                       | -                 | -               |
|       | Hexano           |                | 1000                       | -                 | -               |
| Folha | Dicloro          |                | 1000                       | -                 | -               |
|       | Metanol          |                | 1000                       | 16                | 14              |
|       |                  | Hexano         | 286                        | -                 | -               |
|       |                  | Dicloro        | 413                        | 07                | 10              |
|       |                  | Acetato        | 322                        | 08                | 09              |
|       |                  | n-butanol      | 485                        | 09                | 10              |
|       |                  | Hidroalcoólico | 530                        | -                 | -               |
|       |                  | Hexano         | 1000                       | -                 | -               |

NT- Não testado

Figura 2. Halos de inibição de frações de extratos brutos de folhas e frutos de *C. fissilis*



Da esquerda para a direita: Foto A - Frações testadas contra *B. cereus*; Foto B – Frações testadas contra *S. aureus*. Observar o halo maior = Tetraciclina (30 µg/disco); no sentido horário = Frações do extrato metanólico de frutos : Hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol (observar halo de inibição de 10 mm em ambos microrganismos), hidroalcoólica.; Frações do extrato metanólico de folhas : hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol, hidroalcoólica; No centro = DMSO.

#### 4.1.2. *Cipadessa fruticosa*

*Cipadessa fruticosa* (sinonímia: *Cipadessa baccifera*) é amplamente distribuída no Sudeste da China. Esta planta é bastante utilizada no tratamento de disenteria, coceiras na pele, malária e queimaduras (LUO et al., 2000).

Na tabela 4 temos os resultados referentes à atividade de *Cipadessa fruticosa* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote. Podemos observar que nesta espécie os extratos brutos de folha, semente e cabo dos frutos não inibiram ou inibiram discretamente o desenvolvimento do fungo simbiote e portanto estes extratos não foram utilizados nas etapas subsequentes. Os extratos mais ativos foram aqueles obtidos de galhos (hexânico), dos frutos (diclorometânico) e das cascas dos frutos (aquoso).

Tabela 4. Efeito dos extratos brutos de diferentes partes de *Cipadessa fruticosa* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote.

| Órgão            | Extrato bruto | Concentração<br>(µg/mL) | % de inibição<br>do fungo |
|------------------|---------------|-------------------------|---------------------------|
| Folha            | Hexano        | 1000                    | 20                        |
|                  | Dicloro       | 1000                    | 20                        |
|                  | Metanol       | 1000                    | 0                         |
| Galho            | Hexano        | 1000                    | 80                        |
|                  | Dicloro       | 1000                    | 40                        |
|                  | Metanol       | 1000                    | 0                         |
| Frutos           | Hexano        | 1000                    | 0                         |
|                  | Dicloro       | 1000                    | 80                        |
|                  | Metanol       | 1000                    | 0                         |
|                  | Água          | 562                     | 0                         |
| Semente          | Metanol       | 1320                    | 0                         |
|                  | Água          | 1000                    | 0                         |
| Cabo dos Frutos  | Metanol       | 314                     | 0                         |
|                  | Água          | 1063                    | 0                         |
| Casca dos Frutos | Metanol       | 1152                    | 0                         |
|                  | Água          | 732                     | 80                        |

Controle = 0% de inibição  
Peso seco (6,5 ± 0,3 mg/mL)

Devido à dificuldade de fracionamento do extrato aquoso (devido a polaridade) optamos por trabalhar com os extratos do galho (hexânico) e dos frutos (diclorometânico). Na tabela 5 observamos que as frações mais ativas do extrato hexânico de galho foram a acetato (GHA) e a metanólica (GHM), ambas inibindo o desenvolvimento do fungo simbiote em 80%. Ainda nesta tabela, estão expressos os resultados das frações dos frutos, cujas melhores atividades foram aquelas obtidas com a fração acetato do extrato bruto diclorometânico dos frutos (FDA) e com uma subfração (DDAM) da fração dicloro/acetato 1:1 (2), as quais inibiram o desenvolvimento do fungo simbiote em 40% e 80%, respectivamente. Desta planta demos prioridade à purificação das frações de galho por produzirem a maior inibição em menores concentrações quando comparadas com as demais.

Tabela 5. Efeito das frações de galho (hexano) e frutos(diclorometano) de *C. fruticosa* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote.

| Fração      | Subfração | Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | % de inibição<br>do fungo |
|-------------|-----------|--------------------------------------|---------------------------|
| GHH         |           | 333                                  | 40                        |
| GHD         |           | 355                                  | 40                        |
| GHA         |           | 448                                  | 80                        |
| GHM         |           | 288                                  | 80                        |
| FDHD 1:1    |           | 500                                  | 20                        |
| FDD         |           | 260                                  | 0                         |
| FDDA 1:1(1) |           | 500                                  | 0                         |
| FDDA 1:1(2) |           | 720                                  | 20                        |
|             | DDAD      | 385                                  | 20                        |
|             | DDAA      | 657                                  | 20                        |
|             | DDAM      | 400                                  | 60                        |
| FDA 1:1(3)  |           | 122                                  | 0                         |
| FDA         |           | 200                                  | 40                        |
| FDAM 1:1(1) |           | 125                                  | 20                        |
| FDAM 1:1(2) |           | 200                                  | 0                         |

Controle = 0% de inibição  
Peso seco ( $6,8 \pm 0,4 \text{ mg/mL}$ )

Neste estágio dos ensaios ainda não podemos saber qual a substância pura presente nas frações ativas, mas os metabólitos secundários mais comuns da família Meliaceae são os triterpenos e tetranortriterpenóides, alguns com excelente atividade no controle de insetos. Também em outro estudo realizado em *C. fruticosa* foram isolados dois novos diterpenóides

do tipo clerodane, mas sua atividade biológica ainda não foi determinada (ROJATKAR; NAGASAMPAGI, 1994).

Ainda com relação aos extratos brutos de *Cipadessa fruticosa*, outros microrganismos também foram testados quanto a sua sensibilidade, pelo método de difusão em ágar, sendo que o único extrato ativo foi o metanólico obtido de galho, resultando em halos de inibição de 10 mm e 11 mm para *B. cereus* e *S. aureus*, respectivamente, nas concentrações de 1000 µg/mL. Os demais microrganismos testados não foram inibidos por esta substância.

#### 4.1.3. *Trichilia sp.*, *T. pallida* e *T. rubra*.

Muitas espécies deste gênero já foram estudadas e apresentaram diferentes atividades biológicas. Uma delas, a espécie *Trichilia emetica* é conhecida por possuir atividades contra *Schistosoma haematobium* (SPARG et al, 2000). Outra espécie, *Trichilia heudelotti*, foi analisada quanto à atividade antimicrobiana e as substâncias isoladas de suas folhas (extrato metanólico) demonstraram pouca inibição dos microrganismos testados (ALADESANMI; ODEDIRAN, 2000). Alguns trabalhos com diferentes espécies de *Trichilia* relataram a presença de tetranortripenoides nas raízes com atividade deterrente (SIMMONDS et al., 2001) bem como o isolamento de limonóide da casca do caule (CORTEZ et al., 2000).

Na tabela 6 temos os resultados obtidos com os extratos de *Trichilia sp.* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote e podemos verificar que os extratos e frações de folha não inibiram ou inibiram discretamente (20%) o fungo. Os resultados mais expressivos foram obtidos com os extratos brutos de galho e dos frutos (hexânicos), ambos inibindo em 60% o crescimento do fungo. Do fracionamento dos extratos de galhos obtivemos a fração mais ativa (15) que apresentou inibição de cerca de 40% , resultado idêntico ao obtido com as frações mais ativas do fruto (3a, 12a, 13a e 11b). A análise da fração 13a mostrou que os principais compostos presentes eram os ácidos graxos hexadecanóico e oleico. Estes resultados vieram a confirmar os ensaios realizados por Victor (2001) que, analisando a atividade de ácidos graxos variando o número de carbonos de 6 à 31, verificou que a toxicidade para o fungo esteve entre 6 a 12 carbonos, sendo que, maiores cadeias carbônicas resultaram na perda da atividade. Um outro fator verificado foi que o grau de insaturações favorecia a atividade antifúngica destes compostos. Segundo Victor (2001), o ácido hexadecanóico (palmítico) na concentração de 100 µg/mL não inibiu o fungo, enquanto que o ácido oleico na mesma concentração inibiu o desenvolvimento do fungo em 40%. Já o ácido linoleico (2

insaturações) e o linolênico (3 insaturações) inibiram 80% o fungo também na concentração de 100 µg/mL.

Tabela 6. Efeito de extratos e frações de *Trichilia sp.* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote.

| Órgão | Extrato bruto | Fração  | Concentração (µg/mL) | % de inibição do fungo |        |
|-------|---------------|---------|----------------------|------------------------|--------|
| Folha | Hexano        | Dicloro | 1000                 | 20                     |        |
|       |               |         | 1000                 | 20                     |        |
|       |               |         | Hexano               | 500                    | 20     |
|       |               |         | Dicloro              | 500                    | 0      |
|       |               |         | Metanol              | 500                    | 0      |
|       |               |         | Acet.Etíla           | 500                    | 20     |
|       |               |         | Metanol              | 1000                   | 0      |
| Galho | Hexano        |         | 1000                 | 60                     |        |
|       |               |         | 8                    | 280                    | 0      |
|       |               |         | 14                   | 250                    | 20     |
|       |               |         | 15                   | 250                    | 40     |
|       |               |         | 17                   | 440                    | 0      |
|       |               |         | Dicloro              | 1000                   | 40     |
|       |               |         | Fruto                | Metanol                | Hexano |
| 1000  | 60            |         |                      |                        |        |
|       |               | 3a      |                      | 300                    | 40     |
|       |               | 8a      | 500                  | 20                     |        |
|       |               | 9a      | 500                  | 20                     |        |
|       |               | 10a     | 500                  | 20                     |        |
|       |               | 11a     | 500                  | 20                     |        |
|       |               | 12a     | 500                  | 40                     |        |
|       |               | 13a     | 500                  | 40                     |        |
|       |               | 14a     | 500                  | 0                      |        |
|       |               | 15a     | 500                  | 20                     |        |
|       |               | 16a     | 500                  | 20                     |        |
|       |               | 18a     | 540                  | 20                     |        |
|       |               | 19a     | 470                  | 20                     |        |
|       |               | 20a     | 500                  | 0                      |        |
|       |               | 21a     | 480                  | 0                      |        |
|       |               | 22a     | 433                  | 20                     |        |
|       |               | 3b      | 220                  | 0                      |        |
|       |               | 7b      | 500                  | 20                     |        |
|       |               | 8b      | 500                  | 20                     |        |
|       |               | 9b      | 500                  | 20                     |        |
|       |               | 10b     | 450                  | 20                     |        |
| 11b   | 500           | 40      |                      |                        |        |
| 12b   | 500           | 20      |                      |                        |        |
| 14b   | 500           | 20      |                      |                        |        |
| 15b   | 500           | 20      |                      |                        |        |
| 16b   | 500           | 0       |                      |                        |        |
| 17b   | 500           | 0       |                      |                        |        |
|       | Dicloro       |         | 1000                 | 20                     |        |
|       | Metanol       |         | 1000                 | 20                     |        |

Controle = 0% de crescimento  
Peso seco (6,5 ± 0,4 mg/mL)

Extratos de *Trichilia sp.* também inibiram outros microrganismos (bactérias Gram-positivas). Os extratos brutos com melhor atividade foram o hexânico e o diclorometânico (folha, galhos, frutos). Das frações resultantes, a mais ativa foi a de número 13 (extrato diclorometânico de galho) responsável por halos de inibição de 12 mm para *B. cereus* e *S. aureus*. Tal fração foi identificada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) e o composto majoritário identificado foi o ácido hexadecanóico. Este ácido graxo também foi isolado do extrato (acetato de etila) de *Pentanisia prunelloides* e demonstrou atividade antimicrobiana sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (YFF et al., 2002). Os autores usaram metodologia da microdiluição em microplaca para determinar a CIM e os resultados obtidos foram: 390 µg/mL para *K. pneumoniae* e 780 µg/mL para os outros microrganismos descritos. Além da metodologia utilizada e das linhagens de microrganismos serem diferentes, as CIM's encontradas por esses autores foram muito maiores do que as que encontramos em nossos testes. Outros ácidos graxos também são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas (OH & MARSHALL, 1993) contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (MONK et al. 1996) e *Candida albicans* (BERGSSON et al., 2001). Existe também uma relação entre potencial antibiótico e o grau de insaturação dos ácidos graxos, conforme descrito por Gutteridge et al. (1974) que comparou a atividade antimicrobiana de ácidos graxos com diferentes graus de insaturação e verificou que o ácido araquidônico foi mais ativo que o ácido oléico, sugerindo que tal atividade está provavelmente associada aos produtos de oxidação formados.

Figura 3. Halos de inibição de frações de extratos brutos de *Trichilia sp.* (galhos e frutos)



Da esquerda para a direita: Frações testadas contra *B. cereus* e frações testadas contra *S. aureus*. Observar o halo maior = Tetraciclina (30 µg/disco); no sentido horário : frações do fruto: 11ha, 13ha, 14ha, 15ha, 16 ha, 15 hb, 16 D. Frações do galho : 12 D, 13 D (Observar halo de inibição de 12 mm em ambos microrganismos), 14 D. Ao centro = DMSO.

As outras duas plantas, *Trichilia pallida* e *Trichilia rubra*, são espécies nativas da região Amazônica, sendo que a primeira, por ter sido dispersada, pode ser encontrada também no Rio de Janeiro e Minas Gerais com o nome popular de cangerana (PIOCORREA, 1978).

As partes analisadas foram apenas os galhos e as folhas (extratos hexânicos e metanólicos). Na tabela 7 estão expressos os resultados da atividade destes extratos sobre o desenvolvimento do fungo simbiote. Os extratos brutos dos galhos de ambas as espécies não inibiram ou apresentaram pouca atividade sobre o fungo (40% de inibição). Da mesma maneira, os extratos brutos da folha de *T. pallida* também inibiram muito pouco o fungo (20 à 40%). No entanto, o extrato hexânico da folha de *T. rubra* inibiu em 60% o desenvolvimento

do fungo simbiote. Tal extrato foi fracionado por partição líquido-líquido e a fração hexânica foi a que mostrou melhor atividade, inibindo totalmente o fungo simbiote na concentração de 500 µg/mL. As demais apresentaram baixa atividade (40 e 20%), embora a quantidade disponível da fração acetato de etila permitiu-nos testá-la em concentração bem menor que as outras (137 µg/mL) (tabela 7).

Tabela 7. Efeito de extratos de *T. pallida* e extratos e frações de *T. rubra* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote.

| Espécie                  | Órgão | Extrato bruto | Frações      | Concentração (µg/mL) | % de inibição do fungo |
|--------------------------|-------|---------------|--------------|----------------------|------------------------|
| <i>Trichilia pallida</i> | Galho | Hexano        |              | 1000                 | 0                      |
|                          |       | Metanol       |              | 1000                 | 0                      |
|                          | Folha | Hexano        |              | 1000                 | 40                     |
|                          |       | Metanol       |              | 1000                 | 20                     |
| <i>Trichilia rubra</i>   | Galho | Hexano        |              | 1000                 | 40                     |
|                          |       | Metanol       |              | 1000                 | 0                      |
|                          | Folha | Hexano        |              | 1000                 | 60                     |
|                          |       | Hexano        | Hexano       | 500                  | 100                    |
|                          |       | Metanol       | Metanol      | 500                  | 40                     |
|                          |       | Ac. de etila  | Ac. de etila | 137                  | 20                     |
|                          |       | Metanol       | Metanol      | 1000                 | 0                      |

Controle = 0% de inibição  
Peso seco (7,0 ± 0,4 mg/mL)

Estes extratos também foram analisados quanto à ação antimicrobiana envolvendo outros microrganismos. Assim, vemos na tabela 8 que os extratos hexânicos (galho) de ambas espécies apresentaram os melhores resultados, inibindo todos os microrganismos Gram-positivos testados em menor ou maior intensidade.

Tabela 8. Diâmetro dos halos de inibição dos microrganismos em presença de extratos brutos de *T. rubra* e *T. pallida*

| Espécie                  | Órgão | Extrato bruto | Microrganismo (mm) |                  |
|--------------------------|-------|---------------|--------------------|------------------|
|                          |       |               | <i>B.cereus</i>    | <i>S. aureus</i> |
| <i>Trichilia pallida</i> | Galho | Hexano        | 09                 | 10               |
|                          |       | Metanol       | 08                 | 09               |
|                          | Folha | Hexano        | -                  | -                |
|                          |       | Metanol       | 09                 | -                |
| <i>Trichilia rubra</i>   | Galho | Hexano        | 10                 | 14               |
|                          |       | Metanol       | 09                 | -                |
|                          | Folha | Hexano        | 13                 | -                |
|                          |       | Metanol       | 08                 | -                |

Concentração = 1000 µg/disco

- Ausência de inibição

O extrato hexânico de *T. rubra* (galho), devido sua atividade foi fracionado por partição líquido-líquido, mas as frações resultantes testadas na concentração de 475 µg/disco perderam a atividade. Os extratos de *T. pallida* que também apresentaram boa atividade, estão sendo fracionados.

## 4.2. Família Burseraceae

Plantas da família Burseraceae são conhecidas por seus exsudatos e resinas ricos em compostos aromáticos utilizados como perfumaria, vernizes, entre outras utilidades (LE COINTE, 1934). Outra propriedade muito explorada é a atividade farmacológica de seus compostos e neste contexto, a espécie *Protium* é uma das mais exploradas.

### 4.2.1. *Protium heptaphyllum*

Árvore de grande porte chegando até 20 metros de altura, sendo que sua madeira pode ser utilizada em construção civil, marcenaria e carpintaria, entre outras aplicações. É encontrada em todo o Brasil, de preferência em terrenos arenosos (PIOCORREA, 1978). Algumas de suas indicações terapêuticas são: sonífera, anti-diarreico, antiinflamatório, hérnia, afecção dos olhos (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 1995).

Na tabela 9 podemos verificar o efeito dos extratos de *Protium heptaphyllum* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote. Nela vemos que foram ativos somente os extratos brutos hexânico e diclorometânico do galho (inibição de cerca de 60%). Com as frações 12 e 17 do extrato diclorometânico e as frações 9, 10, 13 e 16 do extrato hexânico também observamos mesma porcentagem de inibição. Os componentes dessas frações estão sendo identificados, mas já existem estudos indicando a presença de triterpenos na resina desta espécie (SUSUNAGA et al. , 2001). Siani et al., (1999) relataram também propriedades anti-inflamatórias da resina e do óleo essencial obtido das folhas de diferentes espécies de *Protium*. Muitos estudos relatam ainda que este gênero possui compostos anti-tumorais (PERNET, 1972), hepatoprotetores (TAMAI et al., 1989) e cercaricidas (FRISCHKORN, C.G.N; FRISCHKORN,H.R.,1978).

Algumas espécies vegetais, entre elas *Protium glabrescens*, são utilizadas pelos índios Tacana, na Bolívia, com propósitos medicinais. Em estudo conduzido por Deharo et al.,

(2001), esta espécie foi avaliada quanto à atividade antimalárica, apresentando resultados promissores “in vivo”.

Tabela 9. Efeito de extratos brutos e frações de *Protium heptaphyllum* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote.

| Órgão | Extrato<br>bruto             | Fração | Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | % de<br>inibição<br>do<br>fungo |      |    |
|-------|------------------------------|--------|--------------------------------------|---------------------------------|------|----|
| Folha | Hexano<br>Dicloro<br>Metanol |        | 1000                                 | 20                              |      |    |
|       |                              |        | 1000                                 | 20                              |      |    |
|       |                              |        | 1000                                 | 0                               |      |    |
| Galho | Hexano                       |        | 1000                                 | 60                              |      |    |
|       |                              | 1      | 330                                  | 20                              |      |    |
|       |                              | 4      | 478                                  | 0                               |      |    |
|       |                              | 6      | 329                                  | 20                              |      |    |
|       |                              | 7      | 549                                  | 20                              |      |    |
|       |                              | 8      | 220                                  | 20                              |      |    |
|       |                              | 9      | 356                                  | 60                              |      |    |
|       |                              | 10     | 351                                  | 60                              |      |    |
|       |                              | 12     | 395                                  | 40                              |      |    |
|       |                              | 13     | 341                                  | 60                              |      |    |
|       |                              | 14     | 465                                  | 40                              |      |    |
|       |                              | 15     | 327                                  | 20                              |      |    |
|       |                              | 16     | 279                                  | 60                              |      |    |
|       |                              | 17     | 414                                  | 40                              |      |    |
|       |                              | 18     | 497                                  | 40                              |      |    |
|       |                              | 19     | 456                                  | 20                              |      |    |
|       |                              | 20     | 580                                  | 40                              |      |    |
|       |                              |        | Dicloro                              |                                 | 1000 | 60 |
|       |                              |        |                                      | 11                              | 390  | 0  |
|       |                              |        |                                      | 12                              | 412  | 60 |
| 14    | 299                          |        |                                      | 20                              |      |    |
| 15    | 261                          |        |                                      | 20                              |      |    |
| 16    | 276                          |        |                                      | 20                              |      |    |
| 17    | 368                          |        |                                      | 60                              |      |    |
| 19    | 251                          |        |                                      | 20                              |      |    |
|       | Metanol                      |        | 1000                                 | 20                              |      |    |

Controle = 0% de crescimento  
Peso seco ( $7,4 \pm 0,4 \text{ mg/mL}$ )

Os extratos foram também ensaiados com outros microrganismos e, como nos outros casos, também não apresentaram atividade sobre bactérias Gram-negativas e fungos leveduriformes. Podemos verificar na tabela 10 que o extrato diclorometânico (galho) inibiu discretamente a bactéria *S. aureus*. Após o fracionamento, os melhores resultados foram observados com as frações 12, 15 e 16, cujos halos de inibição foram iguais ou levemente superiores aos observados com o extrato bruto. Dos extratos brutos obtidos com hexano (galho) não verificamos nenhuma inibição, embora algumas frações resultantes do fracionamento tenham se mostrado ativas, como foi o caso das frações 9, 10, 12,13, 14, 15, 19 e 20.

**Tabela 10. Diâmetro dos halos de inibição dos microrganismos em presença de extratos e frações de *P. heptaphyllum***

| Órgão | Extrato bruto | Fração | Concentração (µg/disco) | Microrganismos (mm) |                 |    |    |
|-------|---------------|--------|-------------------------|---------------------|-----------------|----|----|
|       |               |        |                         | <i>B.cereus</i>     | <i>S.aureus</i> |    |    |
| Folha | Hexano        |        | 1000                    | -                   | -               |    |    |
|       | Dicloro       |        | 1000                    | 08                  | -               |    |    |
|       | Metanol       |        | 1000                    | -                   | -               |    |    |
| Galho | Hexano        |        | 1000                    | -                   | -               |    |    |
|       |               | 1      | 495                     | -                   | -               |    |    |
|       |               | 4      | 956                     | -                   | -               |    |    |
|       |               | 6      | 493                     | -                   | -               |    |    |
|       |               | 7      | 329                     | -                   | -               |    |    |
|       |               | 8      | 220                     | -                   | -               |    |    |
|       |               | 9      | 356                     | 10                  | 10              |    |    |
|       |               | 10     | 351                     | 11                  | 11              |    |    |
|       |               | 12     | 395                     | 12                  | 12              |    |    |
|       |               | 13     | 341                     | 12                  | 12              |    |    |
|       |               | 14     | 232                     | 12                  | 12              |    |    |
|       |               | 15     | 327                     | 10                  | 09              |    |    |
|       |               | 16     | 279                     | -                   | -               |    |    |
|       |               | 17     | 207                     | 11                  | -               |    |    |
|       |               | 18     | 373                     | -                   | -               |    |    |
|       |               | 19     | 342                     | 10                  | 09              |    |    |
|       |               | 20     | 217                     | 10                  | 10              |    |    |
|       |               |        | Dicloro                 |                     | 1000            | -  | 12 |
|       |               |        |                         | 11                  | 390             | -  | -  |
|       |               |        |                         | 12                  | 329             | 10 | 09 |
|       | 14            | 299    |                         | 09                  | -               |    |    |
|       | 15            | 261    |                         | 10                  | 09              |    |    |
|       | 16            | 276    |                         | 12                  | 12              |    |    |
|       | 17            | 368    |                         | -                   | 11              |    |    |
|       | 19            | 251    | -                       | -                   |                 |    |    |
|       | Metanol       |        | 1000                    | -                   | 10              |    |    |

- Ausência de inibição

### 4.3. Família Rutaceae

A família Rutaceae compreende cerca de 150 gêneros, distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. São plantas arbustivas ou arbóreas, de folhas compostas (JOLY, 1993) e são caracterizadas por produzirem alcalóides, cumarinas e lignanas como principais metabólitos secundários (LEWIS, 1983). No Brasil é citada a ocorrência de 200 espécies (PASSADOR, 1996).

#### 4.3.1. *Conchocarpus longifolius*

*Conchocarpus* é um dos gêneros com cerca de 45 espécies de distribuição geográfica da Nicarágua ao nordeste da Bolívia e sudeste do Brasil (KALLUNKI; PIRANI, 1998). A espécie estudada quanto ao potencial antimicrobiano foi a *C. longifolius*. Na tabela 11 temos os resultados obtidos com os extratos e frações desta espécie. Verificamos que os extratos brutos do pecíolo com atividade sobre o fungo simbiote foram os hexânico e diclorometânico. O fracionamento destes extratos resultou em muitas frações ativas, algumas delas inibindo totalmente o desenvolvimento do fungo. Essas frações foram as de número 7, 9 e 10 (do extrato hexânico) e as de número 5, 6, 8, 10, 14 e 15 (do extrato diclorometânico). Da fração 9 isolamos a substância **pimpineline**, da fração 14 isolamos duas cumarinas, a **3-metoxiangelicina** e a **esfodina** e da fração 15 o composto isolado foi a **cianocumarina-D**. Também obtivemos frações bastante ativas (60% de inibição) do fracionamento do extrato hexânico (frações 11 e 12) e do extrato diclorometânico (frações 21 e 22). As frações 12, 20 e 23 (extrato diclorometânico) não foram testadas devido a quantidade insuficiente.

A atividade antimicrobiana de outra cianocumarina (3-cianocumarina) já foi descrita por Zaha e Hazem (2002). Esfodina tem sido relacionada quanto à atividade antiinflamatória (YANG et al., 2002) e fraca atividade fototóxica, enquanto que metoxiangelicina e pimpineline estão relacionados à fortes efeitos fototóxicos (CONCONI et al., 1998; KAVLI et al., 1983).

Tabela 11. Efeito de extratos e frações de *Conchocarpus longifolius* (pecíolo) sobre o desenvolvimento do fungo simbiote.

| Órgão   | Extrato<br>bruto | Fração  | Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | % de<br>inibição<br>do fungo |     |
|---------|------------------|---------|--------------------------------------|------------------------------|-----|
| Pecíolo | Hexano           |         | 1000                                 | 100                          |     |
|         |                  | 4       | 259                                  | 0                            |     |
|         |                  | 5       | 523                                  | 40                           |     |
|         |                  | 6       | 280                                  | 20                           |     |
|         |                  | 7       | 286                                  | 100                          |     |
|         |                  | 9       | 504                                  | 100                          |     |
|         |                  | 10      | 390                                  | 100                          |     |
|         |                  | 11      | 277                                  | 60                           |     |
|         |                  | 12      | 265                                  | 60                           |     |
|         |                  | 13      | 280                                  | 60                           |     |
|         |                  | 14      | 265                                  | 40                           |     |
|         |                  | 15      | 327                                  | 40                           |     |
|         |                  | Dicloro |                                      | 1000                         | 100 |
|         |                  |         | 2                                    | 351                          | 40  |
|         |                  |         | 5                                    | 404                          | 100 |
|         | 6                |         | 285                                  | 100                          |     |
|         | 8                |         | 330                                  | 100                          |     |
|         | 10               |         | 276                                  | 100                          |     |
|         | 12               |         | 331                                  | NT                           |     |
|         | 14               |         | 291                                  | 100                          |     |
|         | 15               |         | 536                                  | 100                          |     |
|         | 20               |         | 403                                  | NT                           |     |
|         | 21               |         | 320                                  | 60                           |     |
|         | 22               | 359     | 60                                   |                              |     |
|         | 23               | 556     | NT                                   |                              |     |
|         | 24               | 413     | 20                                   |                              |     |
|         | 25               | 506     | 20                                   |                              |     |
|         | 26               | 311     | 20                                   |                              |     |
|         |                  | Metanol |                                      | 1000                         | 0   |

Controle = 0% de crescimento

NT – Não testado

Peso seco ( $7,4 \pm 0,4$  mg/mL)

Na tabela 12 apresentamos os efeitos dos extratos brutos e frações do galho desta espécie. Podemos observar que todos os extratos foram ativos, sendo que o extrato hexânico e o metanólico inibiram totalmente o fungo, enquanto que o diclorometânico inibiu cerca de

80%. Devido a pouca quantidade obtida do extrato hexânico, este novamente foi misturado ao diclorometânico e daí fracionado. Das frações resultantes, testadas em diferentes concentrações, os melhores resultados foram obtidos com as frações 9, 22, 26, 28 e 30, inibindo o fungo de 60 à 100%. Tais frações estão sendo purificadas para isolamento dos compostos ativos.

Tabela 12. Efeito de extratos e frações de *Conchocarpus longifolius* (galho) sobre o desenvolvimento do fungo simbiote

| Órgão | Extrato<br>bruto | Fração  | Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | % de inibição<br>do fungo |
|-------|------------------|---------|--------------------------------------|---------------------------|
| Galho | Hexano           |         | 1000                                 | 100                       |
|       |                  | Dicloro | 1000                                 | 80                        |
|       |                  | 2       | 220                                  | 20                        |
|       |                  | 6       | 240                                  | 20                        |
|       |                  | 7       | 158                                  | 20                        |
|       |                  | 8       | 230                                  | 40                        |
|       |                  | 9       | 90                                   | 60                        |
|       |                  | 12      | 228                                  | 40                        |
|       |                  | 13      | 214                                  | 60                        |
|       |                  | 19      | 294                                  | 60                        |
|       |                  | 20      | 470                                  | 80                        |
|       |                  | 22      | 525                                  | 100                       |
|       |                  | 23      | 410                                  | 20                        |
|       |                  | 24      | 420                                  | 20                        |
|       |                  | 25      | 430                                  | 60                        |
|       |                  | 26      | 453                                  | 80                        |
|       |                  | 27      | 420                                  | 40                        |
|       | 28               | 90      | 60                                   |                           |
|       | 29               | 174     | 20                                   |                           |
|       | 30               | 85      | 60                                   |                           |
|       | Metanol          |         | 1000                                 | 100                       |

Controle = 0% de crescimento  
Peso seco ( $7,6 \pm 0,4$  mg/mL)

Estudos de Mafezoli et al. (2000) com extratos brutos de *C. inopinatus* e *C. longifolius* mostraram que os extratos da folha de *C. inopinatus* apresentaram atividade tripanossomicida na concentração de 2mg/mL, porém a substância ativa não foi identificada. Extratos foliares

desta mesma espécie também foram testados anteriormente com o fungo simbiote tendo-se verificado que um alcalóide do tipo acridona (presente na fração dicloro 3/extrato metanol) inibiu o fungo simbiote em 80% na concentração de 100 µg/mL (VICTOR, 2001). Da espécie *Conchocarpus paniculata* (syn. *Angostura paniculata*) também foram isolados alcalóides do tipo acridona (cuspanina e cusculina), os quais apresentaram moderada atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* (VIEIRA et al, 1992).

Na tabela 13 temos os resultados com os demais microrganismos testados com os extratos e frações de *Conchocarpus longifolius* (pecíolo). Os extratos brutos mais ativos foram o hexânico e diclorometânico (semelhante aos resultados obtidos com o fungo simbiote). Esses extratos resultaram em frações, das quais as mais ativas foram: 9, 10 e 11 (do extrato hexânico) , 12 e 15 (do extrato diclorometânico). Algumas frações do extrato diclorometânico como as de número 5, 6, 12, 14 e 20 não foram testadas contra *B. cereus* devido à quantidade insuficiente.

Algumas das substâncias que inibiram o fungo simbiote também inibiram as bactérias Gram-positivas, como foi o caso da fração 9 (**pimpinlina**) obtida do extrato hexânico e das frações 14 (**3-metoxiangelicina** e **esfodina**) e 15 (**cianocumarina-D**) obtidas do extrato diclorometânico.

Magalhães (2001), trabalhando com extratos foliares de *C. longifolius*, verificou que as frações metanólicas do extrato bruto hexânico continham as cumarinas: **3-metoxiangelicina**, **3-6dimetoxiangelicina**, **cianocumarina-D**, **pimpinlina** e **aurapteno** e também uma mistura de **esfodina** e **3-metoxiangelicina**. A mistura desses dois últimos compostos resultou em uma CIM de 57,5 µg/mL para *B. subtilis* e 7,18 µg/mL para *M. roseus*. A autora associou a perda de atividade dos compostos puros à ausência de sinergismo entre as moléculas presentes na fração ou à concentração testada.

As cumarinas têm sido associadas principalmente à atividade anticoagulante (Simões et al., 2002), porém, pesquisas verificaram que elas podem exercer também um potencial antibacteriano dependendo da estrutura da molécula. Assim, cumarinas dimetoxiladas e com pelo menos um grupo fenólico (como as cumarinas altamente oxigenadas) podem se tornar promissoras drogas antibacterianas com amplo espectro de ação (KAYSER ; KOLODZIEJ, 1999).

Tabela 13. Diâmetro dos halos de inibição dos microrganismos em presença de extratos e frações de *C. longifolius* (pecíolo)

| Órgão   | Extrato<br>bruto | Fração         | Concentração<br>(µg/disco) | Microrganismos (mm) |                 |    |    |
|---------|------------------|----------------|----------------------------|---------------------|-----------------|----|----|
|         |                  |                |                            | <i>B.cereus</i>     | <i>S.aureus</i> |    |    |
| Pecíolo | Hexano           |                | 1000                       | 20                  | 16              |    |    |
|         |                  | 4              | 259                        | -                   | -               |    |    |
|         |                  | 5              | 261                        | 08                  | -               |    |    |
|         |                  | 6              | 280                        | 08                  | -               |    |    |
|         |                  | 7              | 286                        | 11                  | 09              |    |    |
|         |                  | 9 <sup>a</sup> | 252                        | 12                  | 09              |    |    |
|         |                  | 10             | 390                        | 12                  | 09              |    |    |
|         |                  | 11             | 283                        | 14                  | 09              |    |    |
|         |                  | 12             | 265                        | -                   | -               |    |    |
|         |                  | 13             | 210                        | 10                  | 08              |    |    |
|         |                  | 14             | 365                        | -                   | -               |    |    |
|         |                  | 15             | 327                        | -                   | -               |    |    |
|         |                  | Dicloro        |                            |                     | 1000            | 14 | 16 |
|         |                  |                | 2                          | 382                 | -               | -  |    |
|         |                  |                | 5                          | 295                 | NT              | 10 |    |
|         | 6                |                | 208                        | NT                  | 10              |    |    |
|         | 12               |                | 360                        | NT                  | 12              |    |    |
|         | 14 <sup>b</sup>  |                | 215                        | NT                  | 08              |    |    |
|         | 15 <sup>c</sup>  |                | 391                        | 10                  | 11              |    |    |
|         | 20               |                | 294                        | NT                  | 09              |    |    |
|         | 21               |                | 334                        | 09                  | 09              |    |    |
|         | 22               |                | 275                        | -                   | -               |    |    |
|         | 23               |                | 568                        | 09                  | 09              |    |    |
|         | 24               |                | 316                        | -                   | -               |    |    |
|         | 25               |                | 387                        | -                   | -               |    |    |
|         | 26               |                | 324                        | -                   | -               |    |    |
|         |                  |                | Metanol                    |                     | 1000            | -  | -  |

NT- Não testado; a = pimpinelina; b = esfodina + 3-metoxiangelicina; c = cianocumarina-D

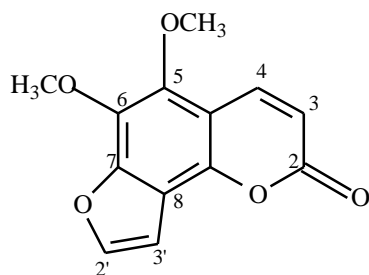
Na tabela 14, podemos verificar os resultados obtidos com os extratos brutos e frações de galho de *C. longifolius*. Neste caso, os melhores resultados foram com os extratos diclorometânico e metanólico. O extrato metanólico está sendo fracionado, enquanto que as frações que estão descritas na tabela são as obtidas do fracionamento da mistura dos extratos hexânico e diclorometânico. Nota-se que a fração 22 foi a que apresentou maiores halos de inibição. Esta fração também foi a mais ativa contra o fungo simbionte, indicando resultados promissores.

Tabela 14. Diâmetro dos halos de inibição dos microrganismos em presença de extratos e frações de *C. longifolius* (galho)

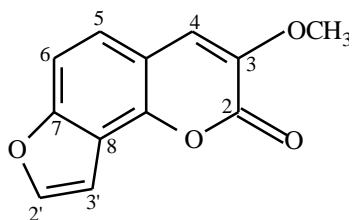
| Órgão | Extrato<br>bruto | Fração  | Concentração<br>(µg/disco) | Microrganismo (mm) |                 |
|-------|------------------|---------|----------------------------|--------------------|-----------------|
|       |                  |         |                            | <i>B.cereus</i>    | <i>S.aureus</i> |
| Galho | Hexano           |         | 1000                       | -                  | 08              |
|       |                  | Dicloro | 1000                       | 10                 | 09              |
|       |                  | 2       | 248                        | 12                 | -               |
|       |                  | 6       | 262                        | -                  | -               |
|       |                  | 8       | 246                        | -                  | 08              |
|       |                  | 12      | 356                        | 08                 | 10              |
|       |                  | 13      | 342                        | -                  | 09              |
|       |                  | 19      | 328                        | -                  | -               |
|       |                  | 20      | 495                        | -                  | -               |
|       |                  | 22      | 540                        | 10                 | 10              |
|       |                  | 23      | 438                        | -                  | -               |
|       |                  | 24      | 451                        | -                  | -               |
|       |                  | 25      | 462                        | -                  | -               |
|       |                  | 26      | 350                        | -                  | -               |
|       |                  | 27      | 448                        | -                  | -               |
|       |                  | 28      | 400                        | -                  | -               |
|       |                  | 30      | 300                        | -                  | -               |
|       | Metanol          |         | 1000                       | 10                 | 09              |

NT – Não Testado

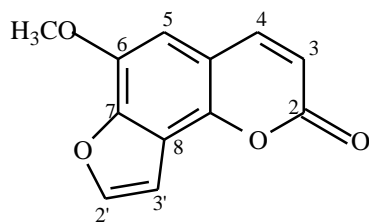
- Ausência de inibição

ESTRUTURA DOS COMPOSTOS ATIVOS OBTIDOS DE *C. longifolius* (PECÍOLO)

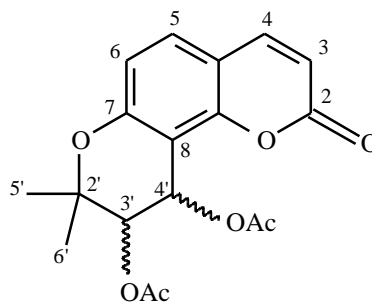
Pimpinellina



cumarina 3-metoxiangelicina



Esfodina



Cianocumarina-D

#### 4.4. Substâncias puras

##### 4.4.1 Substâncias puras isoladas de *Pilocarpus grandiflorus* (Rutaceae)

Além dos extratos brutos, frações e subfrações, algumas substâncias puras isoladas de extratos vegetais e que apresentaram alguma atividade biológica ou estrutura semelhante à alguma molécula com atividade conhecida, também foram testados quanto à atividade sobre o fungo simbiote.

O gênero *Pilocarpus* contém 16 espécies, estendendo-se do sul do México e América Central até a América do Sul (SKORUPA, 1996). Entre as plantas nativas do Brasil, algumas espécies de *Pilocarpus* representam importantes fontes de compostos farmacologicamente ativos (PINHEIRO, 1997; ROBERTS et al., 1996).

Na tabela 15 podemos ver os resultados das substâncias isoladas de caule e de galho de *Pilocarpus grandiflorus*.

Tabela 15. Efeito de substâncias isoladas do extrato diclorometânico (caule e galho) de *P. grandiflorus* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote

| Substância                            | Concentração<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | % de<br>inibição<br>do fungo |
|---------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| <b>siringaldeído</b>                  | 50                                   | 80                           |
| <b>Ácido vanílico</b>                 | 50                                   | 80                           |
| <b>Ar1</b>                            | 50                                   | 0                            |
| <b>3b-hidroxi-stigmast-5-en-7-ona</b> | 60                                   | 20                           |
| <b>Esteróide 5</b>                    | 35                                   | 20                           |
| <b>4-metoxi-2-quinolona</b>           | 60                                   | 20                           |
| <b>Ácido N',N'-dimetilantranílico</b> | 50                                   | 20                           |

Controle = 0% de crescimento  
Peso seco ( $6,4 \pm 0,4$  mg/mL)

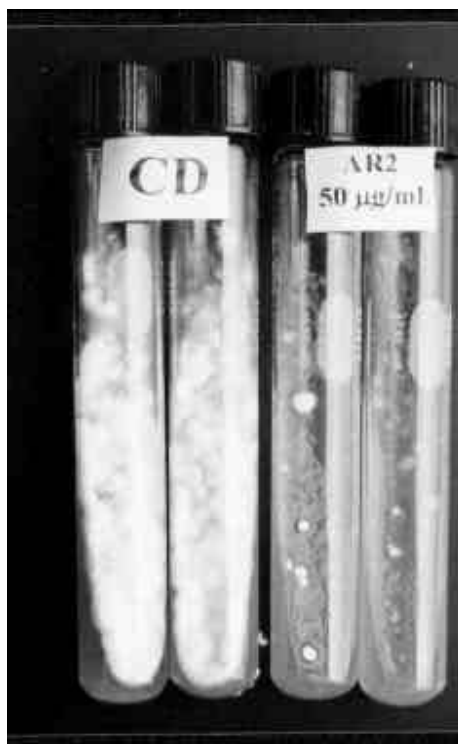
Estudos realizados por Zancul (2001) analisando o efeito de diferentes partes de *P. grandiflorus* sobre o desenvolvimento do fungo simbiote, demonstraram que tanto o extrato diclorometânico de caule como de galho, na concentração de  $1000 \mu\text{g/mL}$ , apresentaram 100% de inibição. A partir daí, seguiram-se os procedimentos de purificação (GODOY et al., 2002) até a obtenção das substâncias relacionadas na tabela 15, das quais as de melhor

atividade (80% de inibição) foram os compostos aromáticos **siringaldeído** e **ácido vanílico**, ambos isolados do caule. A substância **Ar1** ainda está sendo identificada. As demais substâncias foram obtidas do extrato de galho, mas perderam a atividade quando isoladas, indicando novamente um possível sinergismo entre elas.

O ácido vanílico já demonstrou possuir propriedades diversas, como a inibição de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus* na concentração de 400 µg/ml. Apresentou ainda atividade contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, assim como a inibição da produção de aflatoxina por ambos, na concentração de 200 µg /mL (AZIZ et al., 1998). Estudos revelaram ainda a propriedade antioxidante deste ácido (HUNG; YEN, 2002) podendo, tal efeito, ser um de seus mecanismos de ação.

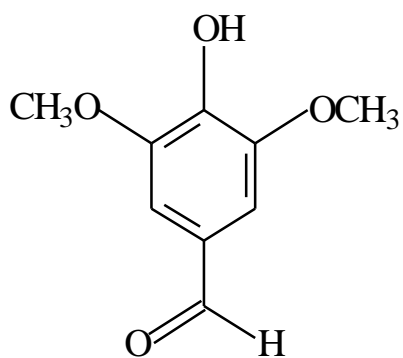
A atividade antimicrobiana do **ácido vanílico** pode estar relacionado com a sua presença freqüente em compostos vegetais, pois ele também é encontrado em plantas de outras famílias e tal atividade pode ser um mecanismo de defesa contra microrganismos fitopatógenos (FERNANDEZ et al., 1996). Esta relação também pode se aplicar ao **siringaldeído**, pois este composto também é encontrado em diferentes espécies vegetais (SHARP et al., 2001; OKUYAMA et al.,1995; WU et al.,1995). Além disso, também é encontrado em própolis e tem demonstrado atividade antibacteriana (BANKOVA et al., 1996) e antiinflamatória (FARAH; SAMUELSSON, 1992).

**Figura 6. Efeito do ácido vanílico sobre o desenvolvimento do fungo simbiote**

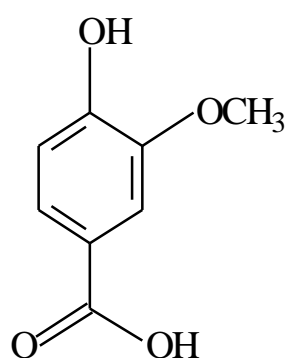


Da esquerda para a direita: 2 tubos da esquerda CD = controle do solvente (diclorometano); 2 tubos a direita = ácido vanílico (50 µg/mL). Observar que a área de crescimento e densidade micelial foi reduzida em 80%.

ESTRUTURA DOS COMPOSTOS AROMÁTICOS ATIVOS ISOLADOS DE *P.grandiflorus* (EXT. DICLOROMETÂNICO DO CAULE)



Siringaldeído



Ácido vanílico

Destas substâncias isoladas de *P. grandiflorus*, devido a quantidade disponível, somente as obtidas de galho (**3b-hidroxi-stigmast-5-en-7-ona**, **Esteróide 5, 4-metoxi-2-quinolona** e **Ácido N',N'-dimetilantranílico**) foram testadas em outros microrganismos, sendo que, nas concentrações entre 40 e 100 µg/disco não houve inibição para os fungos leveduriformes, nem mesmo para as bactérias testadas nas concentrações de 100 µg/mL.

#### 4.4.2. Substâncias puras isoladas de *Adiscanthus fusciflorus* (Rutaceae)

Na tabela 16 estão expressos os resultados obtidos com as substâncias isoladas do extrato metanólico de *Adiscanthus fusciflorus* (raiz). Nela podemos observar que a **isopimpineline** e a **dictamina** inibiram totalmente o desenvolvimento do fungo simbionte enquanto que a **esquimianina** inibiu 80%, todas agindo em baixas concentrações. A substância **A1** é um açúcar ainda não identificado, o qual foi inativo. Das substâncias isoladas do extrato hexânico (raiz), **T12** inibiu 80%, enquanto que **T13** inibiu 60%. **T11** não apresentou boa atividade (40%) (tabela 16).

Tabela 16. Efeito de substâncias isoladas do extrato metanólico e hexânico de *A.fusciflorus* (raiz) sobre o desenvolvimento do fungo simbionte.

| Substância            | Concentração<br>(µg/mL) | % de inibição<br>do fungo |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------|
| A1                    | 50                      | 0                         |
| <b>Isopimpineline</b> | 64                      | <b>100</b>                |
| <b>Esquimianina</b>   | 72                      | <b>80</b>                 |
| <b>Dictamina</b>      | 60                      | <b>100</b>                |
|                       | 40                      | 40                        |
| <b>T11</b>            | 75                      | 40                        |
| <b>T12</b>            | 100                     | <b>80</b>                 |
| <b>T13</b>            | 60                      | <b>60</b>                 |

Controle = 0% de crescimento  
Peso seco (6,0 ± 0,4 mg/mL)

Destas substâncias ativas, as mais conhecidas são os alcalóides furanoquinolônicos **dictamina** e **esquimianina**. A **dictamina** já demonstrou atividade deterrente para insetos adultos e larvas de *T. castaneum* e *S. zeamais* (pragas de produtos estocados) (LIU et al, 2002). Estes autores isolaram a dictamina da casca da raiz de uma planta medicinal chinesa (*Dictaminus dasycarpus* Turcz- Rutaceae) a qual também possui aplicações nos tratamentos de tosse, reumatismo e outras doenças. No entanto, esta substância possui comprovada atividade mutagênica (MIZUTA; KANANMORI, 1985) inviabilizando seu uso para os nossos propósitos. A **esquimianina** já foi isolada de outra planta (fração acetato/extrato hexânico de folhas de *Raulinoa echinata*) e também apresentou 80% de inibição sobre o fungo simbionte na concentração de 100 µg/mL (VICTOR, 2001). Além disso, já foi relatada sua atividade contra *Leishmania amazonensis* (MURIITHI et al., 2002) e fraca atividade antimicrobiana (MITSHCER et al., 1975).

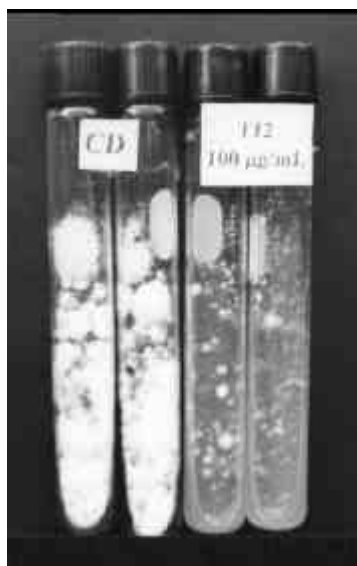
Poucos são os dados sobre a isopimpineline, mas, ao contrário do seu isômero pimpineline, não é considerada fototóxica (KAVLI et al., 1983).

A substância **A1** é um açúcar cuja estrutura ainda não foi identificada e as substâncias **T11**, **T12**, e **T13** são derivados do ácido dihidrocinâmico, mas ainda não foram identificados.

Estas substâncias, com exceção da T13, foram testadas quanto a atividade antibacteriana (CIM) pela técnica do TTC. Os valores encontrados para *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. roseus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* foram maiores que 100 µg/mL .

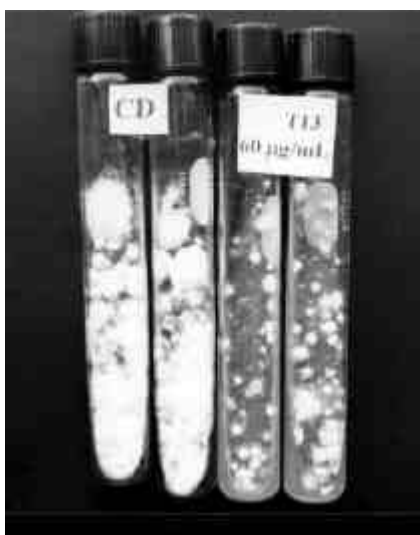
Para os fungos *C. albicans*, *Cr. laurentii*, *S. cerevisiae*, *T. cutaneum*, *C. krusei*, *Geotrichum sp.* e *R. rubra* os testes de inibição foram realizados por meio de discos de papel de filtro e o único halo de inibição observado foi o da substância **dictamina**, na concentração de 50 µg/disco em relação ao *T. cutaneum* (11 mm).

**Figura 7. Efeito de T12 sobre o desenvolvimento do fungo simbiote**



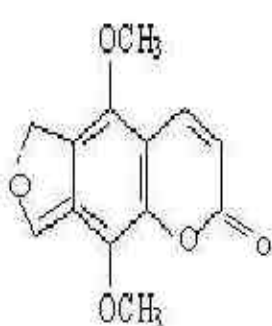
Da esquerda para a direita: 2 tubos da esquerda CD = controle do solvente (diclorometano); 2 tubos a direita = T12 (100 µg/mL). Observar que a área de crescimento e densidade micelial foi reduzida em 80%.

**Figura 8. Efeito de T13 sobre o desenvolvimento do fungo simbiote**

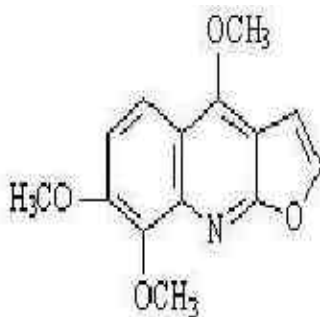


Da esquerda para a direita: 2 tubos da esquerda CD = controle do solvente (diclorometano); 2 tubos a direita = T 13 (60 µg/mL). Observar que a área de crescimento e densidade micelial foi reduzida em 60%.

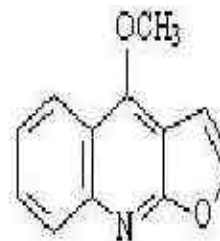
ESTRUTURAS DOS COMPOSTOS ATIVOS ISOLADOS DE *Adiscanthus fusciflorus*  
(EXT. METANÓLICO DA RAIZ)



isopimpinina



esquimianina



dictamina

**4.4.3. Substâncias puras isoladas de *Trichilia rubra* (Meliaceae)**

A substância isolada do extrato hexânico da folha de *Trichilia rubra* (TR2) analisada na concentração de 50 µg/mL não apresentou atividade sobre o fungo simbiote. Nesta concentração também não inibiu os demais microrganismos testados. Adicionalmente, as substâncias lupeol e fridelina, isoladas do extrato metanólico, também não inibiram o fungo simbiote nas concentrações de 60 e 50 µg/mL, respectivamente. No entanto, a fridelina inibiu *M. roseus* e *B. subtilis* na concentração de 100 µg/mL. A quantidade que restou destes testes foi utilizada para o teste de difusão em ágar com os outros fungos e nenhum deles foi inibido, mas a concentração testada foi muito baixa (22 µg/disco para lupeol e 10 µg/disco para fridelina).

**4.4.4. Substâncias puras isoladas de *Citrus limonea* (Rutaceae)**

Esta espécie é uma árvore pequena de 3 à 6 metros de altura. O suco do limão é muito ácido, tendo propriedades antiespasmódica, diaforética, contra o escorbuto e nevralgias, entre outras de conhecimento popular. Existem duas variedades que se desdobram em numerosas subvariedades (PIOCORREA, 1978).

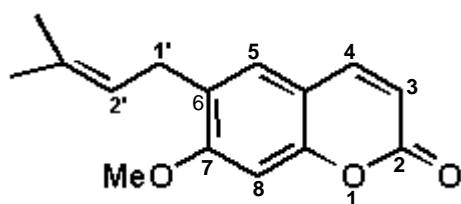
Na tabela 17 estão expressos os resultados obtidos com as cumarinas isoladas do extrato diclorometânico da raiz da planta *Citrus limonea*. Podemos observar que as cumarinas **suberosina e xantoxiletina** foram as mais ativas inibindo totalmente o desenvolvimento do fungo simbionte.

Tabela 17. Efeito de cumarinas isoladas do extrato diclorometânico de *Citrus limonea* (raiz) sobre o desenvolvimento do fungo simbionte.

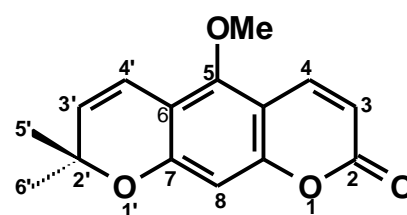
| Substância           | Concentração (µg/mL) | % de inibição do fungo |
|----------------------|----------------------|------------------------|
| Angelical            | 72                   | 40                     |
| Cumarina 02          | 70                   | 0                      |
| <b>Suberosina</b>    | 72                   | <b>100</b>             |
| <b>Xantoxiletina</b> | 80                   | <b>100</b>             |
| Clausarina           | 75                   | 0                      |

Controle = 0% de crescimento  
Peso seco ( $6,4 \pm 0,4$  mg/mL)

#### ESTRUTURAS DAS CUMARINAS ATIVAS ISOLADAS DE *Citrus limoneae* (EXT. DICLOROMETÂNICO DA RAIZ)



**Suberosina**



**Xantoxiletina**

Victor (2001) observou 100% de inibição do fungo simbionte com uma cumarina (xantiletina, na concentração de 25µg/mL) isolada de *Pilocarpus riedelianus*. Xantiletina e suberosina possuem atividade antiproliferativa de células cancerosas (KAWAII et al., 2001) e xantoxiletina tem sido estudado quanto ao efeito antiagregante plaquetário (TENG et al,

1992). Estas substâncias foram testadas contra os fungos leveduriformes, sendo que a clausarina na concentração de 60 µg/disco e as demais na concentração de 42 µg/disco, não apresentaram atividade.

As cumarinas **angelical**, **cumarina 02**, **suberosina** e **xantoxiletina** foram testadas com as bactérias na concentração de 100 µg/mL e todas foram inativas.

#### **4.4.5. Mexicanolídeo, Astilbina e Flavona.**

Destas substâncias puras, a única que apresentou alguma atividade foi a flavona. Na concentração de 25 µg/mL inibiu totalmente o fungo simbiote. Em estudos anteriores realizados por Victor (2001), já havia inibido 80% o fungo simbiote na concentração de 22 µg/mL. Realizamos também ensaios com as bactérias e não houve inibição na concentração de 100 µg/mL, mas inibiu *Cr. laurentii*, *R.rubra*, *S.cerevisiae*, *T. cutaneum* e *C. albicans*, em diferentes intensidades na concentração de 50 µg/disco. Existem muitos estudos que relatam o potencial deste flavonóide sobre diferentes espécies de fungos (SILVA et al., 1998; PICMAN et al., 1995; WEINDENBORN; JHA, 1997), no entanto, o efeito antifúngico em *T. cutaneum* ainda não havia sido descrito.

## **5.CONCLUSÕES:**

### **5.1. Família Meliaceae:**

#### **5.1.1. *Cedrela fissilis* :**

Em relação ao fungo simbionte : As substâncias ativas foram os **policetídeos** (100% de inibição na concentração de 42 µg/mL) .

Em relação aos microrganismos: Melhores resultados obtidos com a fração n-butanólica do extrato metanólico (fruto) (halos de inibição de 10 mm para *B. cereus* e *S. aureus* na concentração de 315 µg/disco).

#### **5.1.2. *Cipadessa fruticosa* :**

Em relação ao fungo simbionte: Melhores resultados obtidos com as frações acetato e metanol do extrato hexânico de galho (80% de inibição nas concentrações de 448 e 288 µg/mL, respectivamente).

Em relação aos microrganismos: Melhores resultados obtidos com extrato metanólico de galho (halos de inibição de 10 e 11 mm para *B. cereus* e *S. aureus*, respectivamente, na concentração de 1000 µg/disco).

### 5.1.3. *Trichilia sp.*:

As substâncias responsáveis pela inibição parcial do fungo simbiote foram : **ácido hexadecanóico (palmítico) e oleico** presentes na fração 13a do extrato hexânico de fruto (40% de inibição na concentração de 500 µg/mL).

Em relação aos microrganismos, a substância ativa isolada foi o **ácido hexadecanóico (palmítico)** obtido da fração 13 do extrato diclorometânico de galho (12 mm de halo de inibição para *B. cereus* e *S. aureus* na concentração de 215 µg/disco).

### 5.1.4. *Trichilia pallida e T. rubra*:

Os melhores resultados com o fungo simbiote foram obtidos com a fração hexano/extrato hexano de *T. rubra* (100% de inibição na concentração de 500 µg/mL).

Extratos de *T. pallida* não apresentaram bons resultados de inibição para o fungo.

Em relação aos microrganismos, os melhores resultados de *T. pallida* foram os obtidos com o extrato bruto hexânico de galho (halos de inibição de 09 e 10 mm para *B. cereus* e *S. aureus*, respectivamente). O extrato mais potente de *T. rubra* (extrato hexânico de galho) quando fracionado, perdeu a atividade.

A substância **fridelina** (isolada do extrato metanólico foliar de *T. rubra*) foi ativa para *M. roseus* e *B. subtilis* (CIM de 100 µg/mL).

## 5.2. Família Rutaceae:

### 5.2.1. *C. longifolius*:

- Fração 9/extrato hexânico do pecíolo:

Substância encontrada: **pimpinellina**

Ação no fungo simbiote: 100% de inibição na concentração de 504 µg/mL.

Ação nos outros microrganismos: Halos de inibição de 12 e 9 mm para *B. cereus* e *S. aureus*, respectivamente, na concentração de 252 µg/disco.

- Fração 14/extrato diclorometânico do pecíolo :

Substâncias encontradas: **3- metoxiangelicina + esfodina.**

Ação no fungo simbiote: 100% de inibição na concentração de 291 µg/mL.

Ação nos outros microrganismos: Halo de inibição de 08 mm para *S. aureus* na concentração de 215 µg/disco.

- Fração 15/ extrato diclorometânico do pecíolo :

Substância encontrada: **cianocumarina D.**

Ação no fungo simbiote :100% de inibição na concentração de 536 µg/mL.

Ação nos outros microorganismos : Halos de inibição de 10 e 11 mm para *B. cereus* e *S. aureus* na concentração de 391 µg/disco.

Frações 9, 22, 26, 28 e 30 dos extratos hexano + diclorometano (galho) : 60 à 100 % de inibição do fungo simbiote em concentrações variadas.

Frações 12 e 22 do extrato hexano + diclorometânico de galho : Inibição de *B. cereus* e *S. aureus* em diferentes intensidades nas concentrações de 356 e 540 µg/disco, respectivamente.

### **5.2.2. *Pilocarpus grandiflorus* :**

As substâncias responsáveis pela inibição do fungo simbiote foram os compostos aromáticos: **siringaldeído e ácido vanílico** (80% de inibição na concentração de 50 µg/mL).

### **5.2.3. *Adiscanthus fusciflorus*:**

Substâncias que inibiram o fungo simbiote : Cumarina **isopimpineline**, alcalóide **dictamina** (100% de inibição nas concentrações de 64 e 60 µg/mL, respectivamente) e alcalóide **esquimianina** (80% de inibição na concentração de 72 µg/mL).

Em relação aos microrganismos a **dictamina** foi ativa apenas contra *T. cutaneum* (halo de inibição de 11 mm na concentração de 50 µg /disco), não inibindo *C. albicans*, *Cr. laurentii*, *Geotrichum sp.*, *C. krusei*, *R. rubra* e *S. cerevisiae*.

#### 5.2.4. *Citrus limoneae*:

As substâncias que inibiram o fungo simbionte foram as cumarinas : **suberosina e xantoxiletina** (100 % de inibição nas concentrações de 72 e 80 µg/mL, respectivamente).

#### 5.3. Família Burseraceae:

##### 5.3.1. *Protium heptaphyllum*:

Em relação ao fungo simbionte, as frações ativas foram : Frações 9, 10, 13 e 16 (extrato hexânico de galho), todas com 60% de inibição em concentrações variáveis (entre 279 à 356 µg/mL).

Em relação aos microrganismos, as frações ativas foram : Frações 9, 10, 12, 13, 14, 15, 19 e 20 (extrato hexânico de galho) e frações 12, 15 e 16 (extrato diclorometânico de galho), todas inibiram *B. cereus* e/ou *S. aureus* em diferentes intensidades e em concentrações variáveis.

#### 5.4. Flavona, Mexicanolídeo e Astilbina :

Destas substâncias, apenas a **flavona** foi ativa, inibindo em diferentes intensidades os seguintes fungos: *C. laurentii*, *R. rubra*, *S. cerevisiae*, *T. cutaneum* e *C. albicans* na concentração de 50 µg/disco. Nesta concentração não inibiu *C. krusei* e *Geotrichum sp.*

Todos os extratos e derivados testados não foram ativos contra as bactérias Gram-negativas.

**REFERÊNCIAS :**

ABO EL-GHAR, G.E.S.; KHALIL, M.E.; EID, T.M. Some biochemical effects of plant extracts in the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lep., Noctuidae). **Journal of Applied Entomology**, Hamburgo, v. 120, p. 447-82, 1996.

ACÁCIO-BIGI, M.F.M. et al. Toxicidade de extratos foliares de *Ricinus communis* L. para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (Hymenoptera, Formicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 41, n.2-4, p. 239-43, 1998.

ACÁCIO-BIGI, M.F.M. **Determinação do efeito tóxico de extratos foliares e derivados químicos de *Ricinus communis* L. para operárias de *Atta sexdens* Forel (Hymenoptera, Formicidae)**. 1997. 134f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1997..

AGOSTINHO, S.M.M. et al. Limonoids from *Toona ciliata* and speculations on their chemosystematic and ecological significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 22, n.3, p.323-8, 1994.

ALADESANMI, A.J.; ODEDIRAN, S.A Antimicrobial activity of *Trichilia heudelotti* leaves. **Fitoterapia**, Milão, v.71, p.179-182, 2000.

ALVES, T.M. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n.3, p. 367-373, 2000.

ANGELI-PAPA, J. La culture d'un champignon par les fourmis Attines. **Cryptogamie Mycologie**, Paris, v.5, p. 147-154, 1984.

ANGELI-PAPA, J.; EYMÉ, J. Les champignons cultivés par les fourmis Attinae. Évolution des structures cellulaires au cours du développement. **Annales des Sciences Naturelles**, Paris v. 13, n. 7, p. 103-129, 1985.

ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. **Insecticides of plant origin**. Washington: The American Chemical Society, 1989. 213p.

AUTUORI, M. Investigações sobre a biologia da saúva. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.1, n.1/2, p.4-12, 1949.

AZIZ, N.H.; FARAG, S.E.; MOUSA, L.A.; ABO-ZAID, M.A. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Microbios**, Cambridge, v. 93, n.374, p. 43-54, 1998.

BANKOVA, V. et al. Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. **Z Naturforsch**, Halle, v. 51, n. 5-6, p. 277-280, 1996.

BARRETO, U.P. Ainda o gergelim como saúvicida. **Chácaras e Quintais**, São Paulo, v. 41, n.3, p.252, 1930.

BARRETO, U.P. O gergelim e a saúva. **Chácaras e Quintais**, São Paulo, v. 54, n.3, p.338-339, 1936.

BASS, M.; CHERRETT, J.M. Fungal hyphae as a source of nutrients for the leaf-cutting ant *Atta sexdens*. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 20, p. 1-6, 1995.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American J. Clinical Pathology**, Philadelphia, v.45, n. 4, p.493-496, 1966.

BENDECK, O.R.P.; NAKANO, O. Controle de formigas-cortadeiras através do uso de formicida em pó. In: SIMPÓSIO SOBRE FORMIGAS-CORTADEIRAS DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 1996, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1998, p.99-104.

BERGSSON, G.; ARNFINNSSON, J.; STEINGRIMSSON, O.; THORMAR, H. In Vitro Killing of *Candida albicans* by Fatty Acids and Monoglycerides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Bethesda , v.45, n.11, p. 3209–3212, 2001.

BEZERRA, J. et al. Molluscidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, Milão, v. 73, n.5, p. 428, 2002.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 11, n.30, p. 31-46, 1997.

BONONI, V. L. R.; AUTUORI, M.; ROCHA, M.B. *Leucocoprinus gongylophorus* (Moller) Heim, o fungo do formigueiro de *Atta sexdens rubropilosa*, Forel. **Rickia**, São Paulo, v. 9, p. 93-97, 1981.

BORGES, A. Ainda o gergelim e as saúvas. **Chácaras e Quintais**, São Paulo , v. 33, n.6, p.539, 1926.

BOYD, N. D.; MARTIN, M. M. Faecal proteinases of the fungus growing ant, *Atta texana*: properties, significance and possible origin. **Insect Biochemistry**, Elmsford, v. 5, p. 619-635, 1975.

BORSAUX-EUDE, C.; GROSS, R. New insights into symbiotic associations between ants and bacteria. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 513-519, 2000.

BRANDÃO, C.R.F.; MAYHÉ-NUNES, A. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen.n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, New York , v. 38, n.3B, p. 639-665, 2001.

BUENO, F.C. **Toxicidade de extratos da planta *Cedrela fissilis* Vell. Para operárias de *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)**. 2002. 70 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso - Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2002.

BUENO, O. C. et al. Effect of sesame (*Sesamum indicum*) on nest development of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v.119, p. 341-343, 1995.

BUENO, O.C. et al. Toxic effect of plants on leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. In: VANDER MEER, R.K.; JAFFE, K. CEDENO, A. (Ed.) **Applied myrmecology; a world perspective**. Boulder: Westview Press, 1990. cap. 38, p. 420-3.

BUENO, O. C. et al. Testes de preferência de *Atta sexdens rubropilosa* por folhas de *Sesamum indicum* e *Virola sebifera*. In: ENCONTRO DE MIRMECOLOGIA, 9, 1989, Viçosa. **Anais...** Viçosa, 1989. p. 24-28.

CARREIRO, S. C. et al. Yeasts associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.71, p. 243-248, 1997.

CARVALHO, L.H. et al. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vivo against *Plasmodium falciparum* in culture. **Brazilian Journal of Medical Biology Research**, Ribeirão Preto, v.24, n.11, p.1113-1123, 1991.

CESPEDES, C.L.; CALDERON, J.S.; LINA, L.; ARANDA, E. Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n.5, p. 1903-1908, 2000.

CHAMPAGNE, D.E.; ISMAN, M.; TOWERS, G.H.N. Insecticidal activity of phytochemical and extracts of the Meliaceae. In: ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. (Ed.) **Insecticides of plant origin**. Washington: The American Chemical Society, 1989.cap.8, p. 95-109.

CHANG,H.M.; BUT, P.P.H. **Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica**. Singapore: World Scientific Publishing, 1986. 2 v.

CHAPELA, I. H. et al. Evolutionary history of the symbiosis between fungus growing ants and their fungi. **Science**, Los Angeles, v. 266, p. 1691-1694, 1994.

CHERRETT, J. M.; POWELL, R. J.; STRADLING, D. J. The mutualism between leaf-cutting and their fungus. In: WILDING, C. et al. **Insect fungus interactions**. London: Academic Press, 1989. p. 93 -120.

CHERRET, J.M. Chemical control and batí formulations for leaf-cutting ants. In: LOFGREN, C.S.; VANDER MEER, R.K.(Ed.). **Fire ants and leaf-cutting ants : biology and management**. Boulder: Westview Press, 1986. p.357-77.

CHERRET, J.M. The interaction of wild and crops in leaf - cutting ant attack. In: THRESH, J.M. (Ed.). **Pest , pathogens and vegetation**. 1981. p. 315- 325.

CHERRET, J. M. Possible reasons for the mutualism between leaf-cutting ants (Hymenoptera, Formicidae) and their fungus. **Biol.Ecol.Medit.**v.7, p.113-122, 1980.

CHERRET, J. M. The foraging behaviour of *Atta cephalotes* L. (Hymenoptera: Formicidae). The foraging patterns and plant species attacked in tropical rain forest. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 37, p. 387- 403, 1968.

CHIU, S.F. Recent advances in research on botanical insecticides in China. In: ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. (Ed.) Insecticides of plant origin. Washington: The American Chemical Society, 1989.cap.6, p.69-77.

COATS, J.R. Risks from natural versus synthetic insecticides. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 39, p. 489-515, 1994.

CONCONI, M. T.; MONTESI, F.; PARNIGOTTO, P.P. Antiproliferative activity and phototoxicity of some methyl derivatives of 5- methoxypsoralen and 5-methoxyangelicin. **Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 82, n.4, p. 193-198, 1998.

CORTEZ,D.A.; FERNANDES,J.B.; VIEIRA, P.C.; DA SILVA, M.G.; FERREIRA, A.G. A limonoid from *Trichilia stipulata*. **Phytochemistry** , New York , v.55, n.7, p. 711-713, 2000.

COWAN, M.M. Plant product as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v.12, n. 4, p.564-582, 1999.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Medicinals for the millennia. The historical record. **Science**, Los Angeles, v. 953, p. 3-25, 2001.

CRAVEN, S. E.; DIX, M. W.; MICHAELS, G. E. Attine fungus gardens contain yeasts. **Science**, Los Angeles, v. 169, p. 184-186, 1970.

CRUZ, B. P. B.; BATISTA FILHO, A. Manifestação da forma perfeita de *Leucocoprinus gongylophorus* (Moller) Heim em saueiro artificial de *Atta sexdens rubropilosa* Forel. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 60, n.1/2, p. 66-69, 1993.

CURRIE, C.R. A community of ants, fungi, and bacteria: A multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Review of microbiology**, Palo Alto , v. 55, p. 357-380, 2001.

CURRIE, C. R. et al. Fungus - growing ants use antibiotic - producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, London, v. 398, n. 6729, p. 701-704, 1999a.

CURRIE, C.R.; MUELLER,U.G.; MALLOCH,D. The agricultural pathology of ant fungus gardens. **Proceedings Natural of Academic Science**, v. 96, p. 7998-8002, 1999b.

DECKER, S. Inseticidas vegetais (*Pyrethrum*, *Derris*, *Mundulia*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e outros). **Boletim de Agricultura**, São Paulo , n. único, p.1-18, 1940.

DEHARO, E. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 77, p. 91-98, 2001.

DELLA-LÚCIA, T. M. C.; VILLELA, E. F. Métodos atuais de controle e perspectivas. In: DELLA - LÚCIA, T.M.C. (Ed). **As formigas cortadeiras**. Viçosa: Editora: Folha de Viçosa, 1993. 226p.

DI STASI, L. C. **Plantas Mediciniais: arte e ciência - um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 1996. 230p.

DI STASI, L.C. et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, Milão, v. 73, p. 69-91, 2002.

DOWD, P. F. Insect fungal symbionts: a promising source of detoxifying enzymes. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 9, p. 149-161, 1992.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 64, n.8, p. 711-713, 1998 .

FARAH, M.H.; SAMUELSSON, G. Pharmacologically active phenylpropanoids from *Senra incana*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 58, n.1, p. 14-18, 1992.

FARNSWORTH, N.R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bull. WHO**, v.63, p. 965-981, 1985.

FEBVAY, G.; BOURGEOIS, P.; KERMARREC, A. Antiappétants pour la fourmi attine, *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Hymenoptera: Formicidae), chez certaines espèces d'igname (Dioscoreaceae) cultivées aux antilles. **Agronomie**, Paris, v. 5, n. 5, p. 439-444, 1985.

FERNANDEZ, M. A.; GARCIA, M.D.; SAENZ, M.T. Antibacterial activity of the phenolic acids fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.53, n.1, p. 11-14, 1996.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B.influenzae*. **British Journal of Experimental pathology**, Oxford, v.10, p.226-236, 1929.

FRAGA, R.L. **Lignanas das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae), variação sazonal e transformações em análogos de podofilotoxina e esteganacina.** 1987. 118f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1987.

FRISCHKORN, C.G.B.; FRISCHKORN, H.R. Cercaricidal activity of some essential oils of plants from Brazil. **Naturwissenschaften**, Halle, v. 65, p. 480-483, 1978.

GNAN, S.O.; DEMELLO, M.T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous Goiaba extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.68, n.1-3, p.103-108, 1999.

GODOY, M.F.P.; SOUZA, R.C.; ZANCUL, M.S. et al. Toxicidade de *Pilocarpus grandiflorus* para o fungo simbionte de *Atta sexdens*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.69, supl., p. 192-194, 2002.

GONÇALVES, C. R. Contribuição para o conhecimento de gênero *Atta* Fabr., das formigas saúvas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 3, p. 333-358, 1942.

GOVINDACHARI, T.R.; SURESH, G.; BANUMATHY, B.; MASILAMANI, S.; GOPALAKRISHNAN, G.; KUMARI, G.N.K. Antifungal activity of some B,D-seco Limonoids from two meliaceous plants. **J.Chemical Ecology**, New York, v.25, n.4, p.923-933, 1999.

GRAYER, R.J.; HARBORNE, J.B., A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993. **Phytochemistry**, New York, v.37, n.1, p.19-42, 1994.

GREEN, A. M.; MUELLER, U. G. ; ADAMS, R. M. M. Extensive exchange of fungal cultivars between sympatric species of fungus-growing ants. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, n.2, p.191, feb. 2002.

GUTTERIDGE, J.M.C.; LAMPORT, P.; DORMANDY, T.L. Autoxidation as a cause of antibacterial activity in unsaturated fatty acids. **Journal of Medical Microbiology**, Essex, v. 7, p. 387-389, 1974.

HARAGUCHI, H.; OHMI, I.; MASUDA, H.; TAKAMURA, Y.; MIZUTANI, K.; TANAKA, O.; CHOU, W. H. Inhibition of aldose reductase by dihydroflavonols in *Engelhardtia chrysolepis* and effects on other enzymes, **Experientia**, Basel, v.52, p.564-567,1996.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical Ecology** . New York : Academic Press, 1972.

HEBLING, M.J.A. et al. Toxic effects of leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) to laboratory nests of *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 86, p. 253-256, 1996.

HEBLING, M.J.A.; BUENO, O.C.; MAROTI, P.S.; PAGNOCCA, F.C.; SILVA, O.A. Effects of leaves of *Ipomoea batatas* (Convolvulaceae) on nest development and on respiratory metabolism of leaf-cutting ants *Atta sexdens l.* (Hym., Formicidae). **Journal of Applied Entomology**. Hamburg, v.124, p. 249-252, 2000 .

HEIM, R. A propos du *Rozites gongylophora* Moeller. **Revue de Mycologie**, Paris, v. 22, n. 3, p. 293-299, 1957.

HOLDOBLER, B.; ENGEL-SIEGEL, H. On the metapleural gland of ants. **Psyche**, Cambridge, v. 91, p. 201-224, 1984.

HOLDOBLER, B.; WILSON, E.O. **The ants**. Cambridge: Belknap, 1990. 732p.

HOWARD, J.J.; CAZIN Jr., J.; WIEMER, D.F. Toxicity of terpenoid deterrents to the leafcutting ant *Atta cephalotes* and its mutualistic fungus. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 14, n.1, p. 59-69, 1988.

HOWARD, J. J. ; WIEMER, D. F. Chemical ecology of host plant selection by the leaf-cutting ant, *Atta cephalotes*. In: LOFGREN, C.; VANDERMEER, R.K. (Ed). **Fire ants and leaf-cutting ants - Biology and management**. London: Boudier and London Wistwiew Press, 1986. p.260-273.

HUBBELL, S. P.; WIEMER, D. F. Host plant selection by an attine ant. In: JAISSON, P. (Ed). **Social insects in the tropics**. Paris: University of Paris Press,1983, p.133-154.

HUBBELL, S. P.; WIEMER, D. F.; ADEJARE, A. An antifungal terpenoid defends a neotropical tree (*Hymenaea*) against attack by fungus growing ants (*Atta*). **Oecologia**, Berlin, DE, v. 60, p. 321-327, 1983.

HUNG, C.; YEN, G. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds Isolated from *Mesona procumbens* Hemsl. **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v. 50, n.100, p. 2993-2997, 2002.

JACOBSON, M. Botanical pesticides: past, present and future. In : ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. (Ed.). Insecticides of plant origin. Washington: The American Chemical Society, 1989. cap.1, p.1-10.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Editora Nacional, 1993. 377p.

KALLUNKI, J. A.; PIRANI, J. R. Synopses of *Angostura* Roem. & Schult. and *Conchocarpus* J.C. Mikan (Rutaceae). **Kew Bulletin**, London, v.53, n.2, p.266-327, 1998.

KAPOOR, L.D. **Handbook of Ayurvedic Medicinal plants**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

KAVLI, G.; JOHNSON, B.E.; VOLDEN, G.; HAUGSBO, S. Furanocoumarins of *Heracleum laciniatum* : isolation, phototoxicity, absorption and action spectra studies. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v.9, n.4, p. 257-262, 1983.

KAWAIL, S.; TOMONO, Y.; OGAWA, K.; SUGIURA, M.; YANO, M.; YOSHIZAWA, Y.; ITO, C.; FURUKAWA, H. Antiproliferative effect of isopentenylated coumarins on several cancer cell lines. **Anticancer Research**, v. 21, n.3B, p. 1905-1911, 2001.

KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H. Antibacterial activity of simple coumarins: structural requirements for biological activity. **Z. Naturforsch**, Halle, v. 54, n.3-4, p.169-174, 1999.

KOUL, O.; ISMAN, M.B. Toxicity of the limonoid allelochemical cedrelone to noctuid larvae. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 64, p. 281-7, 1992.

LARA, W. H.; BATISTA, G. C. Pesticidas. **Química Nova**, Sao Paulo, v. 15, n. 2, p. 161-166, 1992.

LARANJEIRO, A. J.; LOUZADA, R. M. Manejo de formigas cortadeiras em florestas. **Série Técnica IPEF**, Piracicaba, v. 13, n. 33, p. 115-124, 2000.

LE COINTE, P. **A amazônia Brasileira: Árvores e Plantas úteis**. Livraria Clássica ed. Belém, Brasil, p. 63,64, 1934.

LEMOS, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from brazilian plantas, **Fitoterapia**, Milão, v.63, p. 266-268, 1992.

LEWIS, J.R. Biological activity of some Rutaceous compounds. In : WATERMAN, P.G.; GRUNDON, M.F. (Ed.), **Chemistry and Chemical Taxonomy of Rutales**. London: Academic Press, 1983. p. 301-318.

LITTLEDYKE, M.; CHERRETT, J. M. Variability in the selection of substrate by the leaf - cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin Entomological Research**, Farnham Royal, v. 65, p.33-47, 1975.

LIU, Z.L.; XU, Y.J.; WU, J.; GOH, S.H.; HO, S.H. Feeding deterrents from *Dictamnus dasycarpus* Turcz against two stored-product insects. **J.Agricultural and food chemistry**, Easton, v.50, p.1447-1459, 2002.

LOECK,A.E.; NAKANO, O. Efeito de novas substâncias visando o controle de saueiros novos de *Atta laevigata* (Smith, 1858) (Hymenoptera: Formicidae). **O Solo**, Piracicaba, v.76, n.1, p.25-30, 1984.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, SP : Ed. Plantarum Ltda, 1992. V. 1, p. 1, 11, 76, 241, 244 e 245.

LUO, X.D; WU, S.H; MA, Y.B; WU, D.G. Components of *Cipadessa baccifera*. **Phytochemistry**, New York, v. 55, p. 867-872, 2000.

MAFEZOLI, J.;VIEIRA, P.C.;FERNANDES, J.B. et al. In vitro activity of Rutaceae species against the trypomastigote form of *Trypanossoma cruzi*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.73, p. 335-340, 2000.

MAGALHÃES, C.M.I. **Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas da família Rutaceae**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas** . 6. ed., São Paulo : Nobel , 1985. v.2.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1976 .

MARICONI, F. A. M. **As Saúvas**. São Paulo, Ares, 1970.

MARICONI, F. A. M. Aspectos ecológicos e bionômicos das saúvas da região oriental do Estado de São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, v. 22, p. 213-380, 1965.

MARICONI, F. A. M. Inseticidas de origem vegetal. In: \_\_\_\_\_. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 2.ed. São Paulo: Biblioteca Agronômica Ceres, 1963. cap.14, p.109-18.

MARTIN, M. M.; MACCONNELL, J. G.; GALE, G. R. The chemical basis for the Attine ant fungus symbiosis. Absence of antibiotics. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 62, n. 2 , p. 386-388, 1969.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R.; CAZARES LUNA, L.; MORENO GUTIÉRREZ, M.N.; GARCIA-ARGÁEZ, A.N., Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **J.Ethnopharmacology**, Limerick, v. 66, p. 79-82, 1999.

MITSCHER, L.A.; BATHALA, M.S.; CLARK, G.W.; BEAL, J.L. Antimicrobial agents from higher plants. The antimicrobially inactive components of *Ptelea trifoliata* L. **Lloydia**, Cincinnati, v. 38, n.2, p.117-124, 1975.

MIZUTA, M.; KANAMORI, H. Mutagenic activities of dictamnine and gamma-fagarine from dictamni radice cortex (Rutaceae). **Mutation Research**, Amsterdam, v.144, n.4, p. 221-225, 1985.

MOLLER, A. Die pilzgaten liniger sudameerikanischer ameisen. **Botanische Mittheilung aus den Tropen**, v. 6 , p. 1-127, 1893.

MONK, J.D.; BEUCHAT, L.R.; HATHCOX, A.K. Inhibitory effects of sucrose monolaurate, alone and in combination with organic acids, on *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **J. Appl Bacteriol**, Oxford, v.81, n.1, p.7-18, 1996.

MUCHOVEJ, J. J.; DELLA-LUCIA, T. M.; MUCHOVEJ, R.M.C. *Leucoagaricus weberi* sp nov from a live nest of leaf-cutting ants. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 11, p. 1308-1311, 1991.

MUELLER, U.G.; SHULTZ, T.R.; CURRIE, C.R. et al. The origin of the Attine ant-fungus mutualism. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v.76, n.2, p. 169-197, 2001.

MUELLER, U.G.; REHNER, A.; SCHULTZ, T.R. The evolution of agriculture ants. **Science**, Los Angeles, v. 281, p. 2034-2038, 1998.

MULLENAX, C. H. The use of jackbean (*Canavalia ensiformis*) as a biological control for leaf-cutting ants (*Atta* sp). **Biotropica**, Washington, v. 11, n. 4, p.313-314, 1979.

MURIITHI, M. W.; ABRAHAM, W.R.; ADDAE-KYEREME, J.; SCOWEN, I.; CROFT, S.L.; GITU, P.M.; KENDRICK, H.; NJAGI, E. N. M ; WRIGHT, C.W. Isolation and in Vitro Antiplasmodial Activities of Alkaloids from *Teclea trichocarpa*: In Vivo Antimalarial Activity and X-ray Crystal Structure of Normelicopicine. **J. Natural Products**, Columbus, v.65, n.7, p. 956-959, 2002.

NAKANO, O. A nebulização no controle das saúvas. In: SIMPÓSIO SOBRE FORMIGAS-CORTADEIRAS DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 1996, Piracicaba. **Anais...Piracicaba: FEALQ**, 1998.p.105-11

NASCIMENTO, R. R. et al. Chemistry of metapleural gland secretions of three Attine ants, *Atta sexdens rubropilosa*, *Atta cephalotes* and *Acromyrmex octospinosus* (Hymenoptera: Formicidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 22, n. 5, p. 987-1000, 1996.

OH, D.H.; MARSHALL, D.L. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol**, Amsterdam, v. 20, n. 4, p. 239-246, 1993.

OKUYAMA, E.; SUZUMURA, K.; YAMAZAKI, M. Pharmacologically active components of *Podopon Puok* (*Fagraea racemosa*), a medicinal plant from Borneo. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokio, v. 43, n.12, p.2200-2204, 1995 .

PAGNOCCA, F. C. et al. RAPD analysis of the sexual state and sterile mycelium of the fungus cultivated by the leaf-cutting ant *Acromyrmex fallax*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n. 2, p. 173-176, 2001.

PAGNOCCA, F.C.; RIBEIRO,S.B.;TORKOMIAN,V.L.V.; HEBLING,M.J.A.; BUENO,O.C.; SILVA,O.A.;FERNANDES,J.B.;VIEIRA,P.C.;SILVA,M.F.G.F. E FERREIRA,A.G. Toxicity of lignans to symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.22, n.7, p. 1325-1330, 1996a.

PAGNOCCA, F. C. et al. Microbiological changes in the nests of leaf - cutting ants fed on sesame leaves. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 120, p. 317-320, 1996b.

PAGNOCCA , F. C. et al. Toxicity of sesame extracts to the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 80, p. 349-352, 1990.

PANIZZI, A.R.; PARRA , J.R.P. (Ed.). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991.

PASSADOR, E.A.P. **Quimiosistemática de Rutaceae e estudo fitoquímico de *Neoraputia magnífica* var. *magnífica***. 1996. Tese (Doutorado em Química): Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

PENNINGTON, T.D.; STYLES, B.T. A Generic Monograph of the Meliaceae. **Blumea**, Leiden, v.22, p.419-540, 1975.

PEREGRINE, D.J.; CHERRET, J.M. A field comparison of the modes of action of aldrin and mirex for controlling colonies of the leaf-cutting ants *Atta cephalotes* (L.) and *Acromyrmex octospinosus* (Reich) (Formicidae, Attini). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 63, p. 609-618, 1974.

PERFECT, J.R.; SCHELL,W.A. The new fungal opportunists are coming. **Clinical Infect Disease**, Chicago , v.22, suppl.2, p. S112-S118, 1996.

PERNET, R. Phytochimie des Burseracees. **Lloydia**, Ohio, v. 35, n.3, p. 280-287, 1972.

PICMAN, A.K.;SCHENEIDER, E.F.; PICMAN, J. Effect of flavonoids on mycelial growth of *Verticillium albo-atrum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.23, n.7-8, p.683-693, 1995.

PIDDOCK,L.J. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. **J.Applied Bacteriology**, Oxford, v.68, p.307-318, 1990.

PINHEIRO, C. U. B. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): a wild species and its rapid transformation into a crop. **Economic Botany**, Bronx, v. 51, n. 1, p. 49-58, 1997.

PIOCORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/ Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1978.

QUINLAN, R. J.; CHERRETT, J. M. The role of fungus in the diet of leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. **Ecological Entomology**, London, v. 4, p. 151-160, 1979.

QUINLAN, R.J.; CHERRET, J.M. Aspects of the symbiosis of the leaf-cutting ant *Acromyrmex octospinosus* (Reich) and its food fungus. **Ecological Entomology**, London, v.3, p. 221-230, 1978.

RAETANO, C.G.; WILCKEN, C.F. Aero system no controle de formigas cortadeiras In : SIMPÓSIO SOBRE FORMIGAS-CORTADEIRAS DOS PAÍSES DO MERCOSUL, 1996, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba: FEALQ, 1998.p.133-139.

RIBEIRO, S.B. **Caracterização de espécies bacterianas encontradas em ninho de *Atta sexdens* L. e isolamento de *Streptomyces* de formigas da Tribo Attini**. 2000. 143f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

ROBERTS, J.E. et al. **Pharmacognosy and pharmacobiotechnology**. Baltimore : Williams and Wilkins, 1996. 337 p.

ROCKWOOD, L. L. The effects of seasonality on foraging in two species of leaf-cutting ants *Atta* in Guanacast province, Costa Rica. **Biotropica**, Washington, v. 7, n. 3, p. 176-193, 1975.

ROCKWOOD, L. L. Plant selection and foraging patterns in two species of leaf-cutting ants (*Atta*). **Ecology**, Durham, v. 57, n. 1, p. 48-61, 1976.

RODRIGUEZ-GAMBOA, T. et al. Anthrone and oxanthrone C,O-diglycosides from *Picramnia teapensis*. **Phytochemistry**, New York, v. 55, p. 837-41, 2000.

ROEL, A.R. et al. Atividade tóxica de extratos orgânicos de *Trichilia pallida* Swartz (Meliaceae) sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n.4, p.799-808, 2000.

ROJATKAR, S. R.; NAGASAMPAGI, B. A -Diterpenos de *Cipadessa fruticosa*. **Phytochemistry**, New York, v. 37, n.2, p. 505-507, 1994.

SALVAT,A.;ANTONACCIL.; FORTUNATO,R.H.; SUAREZ, E.Y.; GODOY, H.M. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity **Letters in Applied Microbiology**, Londres, v. 32, p. 293-297, 2001.

SANTOS, L.F. A saúva e o gergelim. **Chácaras e Quintais**, São Paulo, v. 32, n.5, p.440, 1925.

SATASOOK, C. et al. Insecticidal bioactivity of crude extracts of *Aglaia* species (Meliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v.22, n.2, p.121-7, 1994.

SCHMUTTERER, H. von. First investigations of insecticidal effects of methanolic extracts from the leaves and bark of the Philippine neem tree, *Azadirachta indica* (A. Juss) and *Melia azedarach* L. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 108, p. 483-9, 1989.

SHARP, H.; LATIF, Z.; BARTHOLOMEW, B.; THOMAS, D. et al. Emodin and syringaldehyde from *Rhamnus pubescens* (Rhamnaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 29, p.113- 115, 2001.

SIANI, A.C.; RAMOS , M.F.; MENEZES-DE-LIMA,O. et al. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oil from the leaves and resin of species of *Protium*, **J. Ethnopharmacology**, Limerick, v.66, n.1, p.57-69, 1999.

SILVA, A. **Participação do fungo *Leucoagaricus gongylophorus* na produção de enzimas intestinais da formiga *Atta sexdens***. 2000, 108f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2000.

SILVA, A.M.S.; WEINDENBORNER, M.; CAVALEIRO, J.A.S. Growth control of different *Fusarium* species by selected flavones and flavonoid mixtures. **Mycological Research**, Cambridge, v.102, n.5, p. 638-640, 1998.

SIMÕES, C.M.; FALKENBERG, M.; MENTZ, L.A., et al. Antiviral activity of south Brazilian medicinal plant extracts. **Phytomedicine**, Jena, v. 6, n.3, p. 205-214. 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. **Farmacognosia :Da planta ao medicamento**. 4 ed. Florianópolis, SC: Editora da UFSC; Porto Alegre, RS: Editora da UFRS, 2002.

SIMMONDS, M.S.; STEVENSON, P.C.; PORTER, E.A.; VEITCH, N.C. Insect antifeedant activity of three new tetranortriterpenoids from *Trichilia pallida*. **J. Natural Products**, Columbus, v.64, n.8, p.1117-1120, 2001.

SINGER, R. **The Agaricales in Modern Taxonomy**. 4<sup>th</sup> ed. Koenigstein: Koeltz Scientific Books, 1986, 477 p.

SIQUEIRA, C. G. et al. Metabolism of plant polysaccharides by *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4820-4822, 1998.

SKORUPA, L.A. **Revisão taxonômica de *Pilocarpus vahl* (Rutaceae)**. 1996. Tese de doutorado da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

SOUQUET, J.M.; LABARBE, B.; Le GUERNEVÉ, C.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Phenolic composition of Grape stems, **J. Agric. Food Chem.**, Easton, v.48, p. 1076-1080, 2000.

SOUZA, F. L. Plantas preferidas pela saúva. **Divulgação Agronomica**, Rio De Janeiro, v. 14, p. 23-29, 1965.

SPARG, S.G; VAN STADEN, J.; JAGER, A.K. Efficiency of traditionally used South African plants against schistosomiasis. **J. Ethnopharmacol**, Limerick, v. 73, n.1-2, p. 209-214, 2000.

SUSUNAGA, G.S.; SIANI, A.C.; PIZZOLATTI, M.G.; YUNES, R.A.; DELLE MONACHE, F. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. **Fitoterapia**, Milão, v.72, n.6, p.709-711, 2001.

TAMAI, M.; WATANABE, N.; AOMEYA, M. et al. New hepatoprotective triterpenes from *Canarium album*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 55, p. 42-47, 1989.

TENG, C.M.; LI, H.L.; WU, T.S.; HUANG, S.C.; HUANG, T.F. Antiplatelet actions of some coumarin compounds isolated from plant sources. **Thromb. Research**, Elmsford, v.66, n.5, p. 549-557, 1992.

TOMESI, C.N.; VIALE, A.A.; BUSCHI, C.A.; ROFIR, D.; SCHTEINGART, C.D.; INIGO, R.P.A.; ZALLOCCI, F.M.; POMILIO, A.B. Antimicrobial screening of some argentine higher plants .P.II, **Fitoterapia**, Milão. v.57, p. 46-49, 1986.

TORKOMIAN, V. L. V. **Plantas tóxicas e formigas cortadeiras: efeitos de extratos de *Ricinus communis* L. e de *Canavalia ensiformis* sobre o fungo simbionte de *Atta sexdens rubropilosa* (Forel, 1908).** 1994. 94f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1994.

TYLER, V.E.;BRADY, L.R.; ROBBERS,J.E. **Pharmacognosy.** 8 th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1981

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. **Base de Dados de Plantas medicinais,** 1995. Disponível em <<http://www.ciagri.usp.br/planmedi/pm0039.htm>>. Acesso em : 06 jun. 2001.

VENDRAMIM, J.D. Plantas inseticidas e controle de pragas. **Informativo da sociedade Entomológica do Brasil,** São Paulo , v. 25,n.2, p.1 e 5, 2000.

VICTOR, S.R. **Efeito de extratos vegetais das famílias Meliaceae, Picramniaceae e Rutaceae e seus derivados sobre o fungo simbionte de *Atta sexdens* L.** 2001. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

VICTOR, S. R. ;CRISOSTOMO, F. R. ;BUENO, F. C. ;PAGNOCCA, F. C. ;FERNANDES, J. B. ;CORREA, A. G. ;BUENO, O. C. ;HEBLING, M. J. A. ;BACCI JR, M. ;VIEIRA, P. C.; SILVA, M.F.G.F. Toxicity of synthetic piperonyl compounds to leaf-cutting ants and their symbiotic fungus. **Pest.Manag.Science,** Sussex, v. 57, n.7, p.603-608, 2001.

VIEIRA, P. C.; KUBO, I.; KUJIME, H.; YAMAGIWA, Y.; KAMIKAWA, T. Molluscicidal acridone alkaloids from *Angostura paniculata*: isolation, structures, and synthesis. **Journal of Natural Products,** Columbus, v. 55, n.8, p. 1112-1117, 1992.

VILELA, E. F.; DELLA-LÚCIA, T.; JAFFÉ, K. Formigas cortadeiras: a linguagem dos odores. **Ciência Hoje,** Sao Paulo, v.16, n. 35, p. 26-31,1987.

VILELA, E.F. Status of leaf-cutting ant control in forest plantations in Brazil. In: LOFGREN, C.S.; VANDER MEER, R.K. (Ed.). **Fire ants and leaf-cutting ants: biology and management.** Boulder: Westview Press, 1986. p. 399-408.

XIE, Y.S. et al. Biological activity of extracts of *Trichilia* species and the limonoid hirtin against lepidopteran larvae. **Biochemical Systematics and Ecology,** Oxford, v.22, n.2, p.129-36, 1994.

WEBER, N. A. Fungus ants. In: HERMANN, H.R. (Ed.). **Social insects**. London: Academic Press, 1982. p. 255-364.

WEBER, N.A. Fungus-culturing by ants. In: **Insect-fungus symbiosis** Batra ed. New Jersey : Allanheld, Osmun, Montclair, p. 77-114, 1979

WEBER, N. A. Gardening ants. *The Attines*. **Memoirs of the American Philosophical Society**, v. 17, n. 92, p.146, 1972.

WEBER, N. A. Fungus - growing ants. **Science**, Los Angeles, v. 153, p. 587-604, 1966.

WEBER, N. A. Fungus growing ants and their fungi: *Cyphomyrmex costatus*. **Ecology**, Durham, v. 38, n.3, p. 480-494, 1957.

WEINDENBORNER, M.; JHA, H.C. Antifungal spectrum of flavone and flavanone tested against 34 different fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v.101, n.6, p.733-736, 1997.

WILSON, E. O. Causes of ecological success: the case of the ants. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 56, p. 1-9, 1987.

WILSON , E. O. Caste and division of labor in leaf-cutting ants (Hymenoptera: Formicidae: *Atta*). I. The overall pattern in a *Atta sexdens*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 7, p. 143-156, 1980.

WHITTAKER, R. H. The biochemical ecology of higher plants. In: SONDJEMER, E. , SIMEONE, J.B. (Ed.). **Chemical Ecology**. New York: Academic Press, 1972. p. 43-70.

WU, Y.C.; CHANG, G.Y.; KO, F.N.; TENG, C.M. Bioactive constituents from the stems of *Annona montana*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 61, n.2, p.146-149, 1995.

YANG, L.L.; LIANG, Y.C.; CHANG, C.W. et al. Effects of sphondin, isolated from *Heracleum laciniatum*, on IL-1beta-induced cyclooxygenase-2-expression in human pulmonary epithelial cells. **Life Science**, Beijing, v. 72, n.2, p. 199-213, 2002.

YFF,BT; LINDSEY, KL; TAYLOR, MB; ERASMUS, DG; JAGER, AK. The pharmacological screening of *Pentanisia prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid. **J Ethnopharmacol** , Limerick, v.79, n.1, p.101-7, 2002.

ZAHA, A.A.; HAZEM, A. Antimicrobial activity of two novel coumarin derivatives : 3-cyanonaphtho [1,2-(e)]pyran-2-one and 3- cyanocoumarin. **New Microbiology**, v. 25, n.2, p. 213-222, 2002.

ZANCUL, M.S. **Toxicidade de extratos de *Pilocarpus grandiflorus* Engl. Para o fungo simbiote de *Atta sexdens*.** 2001. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso- Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.