

SUSANA JOHANN

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
FLAVONÓIDES POLIMETOXILADOS ISOLADOS
DE FRUTOS CÍTRICOS.**

FLORIANÓPOLIS

2003

SUSANA JOHANN

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE
FLAVONÓIDES POLIMETOXILADOS ISOLADOS
DE FRUTOS CÍTRICOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: **Prof. Dr. Artur Smânia Júnior**

Co-orientadores: **Dr. Aleksandro Branco**

Prof. Dra. Vetúria Lopes de Oliveira

FLORIANÓPOLIS

2003

SUSANA JOHANN

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FLAVONÓIDES
POLIMETOXILADOS ISOLADOS DE CITRUS spp.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre no curso de Pós – graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Artur Smânia Júnior
Orientador (MIP/UFSC)

Prof^ª. Dr^ª. Margarida de Matos Mendonça
(MIP/UFSC)

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolati
(QMC/UFSC)

Prof^ª. Dr^ª. Vetúria Lópes de Oliveira
(MIP/UFSC)

A meus pais Salete e Volmir, irmãos Gisela e Gustavo
e a meu adorável afilhado e sobrinho Rafinha, pelo
amor e compreensão das minhas ausências

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas virtudes recebidas, como a coragem e fé, e por ter colocado em minha vida tantas pessoas especiais e de boa vontade.

Ao Prof. Artur Smânia Júnior por sua orientação, sinceridade, apoio e conhecimentos ao curso deste trabalho.

Ao Prof. Alesxandro Branco pela coorientação, incentivo, conselhos e apoio.

A Prof^a. Vetúria Lópes de Oliveira pela preciosa amizade, incentivo e grande contribuição no deliamento dos experimentos e na organização desta dissertação.

A Prof^a. Margarida de Matos Mendonça pelo incentivo, apoio e conhecimentos ao longo do curso e pela identificação dos fungos.

Ao Prof. Moacir Geraldo Pizzolatti pelos conhecimentos e por ter cedido o Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Química da UFSC, para a realização de uma parte dos experimentos.

Ao Prof. Mário Stendel pelos conhecimentos, apoio e realização das fotografias usadas neste trabalho.

Ao Prof. Carlos José de Carvalho Pinto pelo apoio e sugestões fornecidas.

Ao Prof. Eduardo Feichtenberg do Instituto Biológico Brasileiro e ao colega Adolfo Haruo Koga que me ajudaram na obtenção dos microrganismos utilizados neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Antibióticos da UFSC: Cynthia Seidel, Prof^a. Elza Smânia, Elídio Angioletto e Roberta Paulert pelo apoio, contribuições, conselhos e amizade.

Aos colegas do curso de Pós – Graduação, pela amizade e apoio, em particular ao Luiz Borges pelo incentivo, amizade e conselhos.

A meu namorado Job Diógenes Ribeiro Borges que me fortaleceu e encorajou nos momentos de dificuldade e por sua contribuição na estrutura da dissertação.

Aos amigos Cláudio Pache, Nadja Gheuca, pela sinceridade e apoio.

Ao meu cunhado Rafael Recalcatti pelo apoio e amizade.

A todos os Professores e secretários do curso de Pós graduação em Biotecnologia que sempre estiveram presentes e dispostos a ajudar.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Frutas cítricas	4
1.2. Microrganismos fitopatogênicos para os Citrus spp.	5
1.3. Mecanismos de defesa das plantas.....	9
1.4. Flavonóides.....	11
1.4.1. Biossíntese dos flavonóides: Regulação transcricional	11
1.4.1.2. Formação dos flavonóides	13
1.4.2. Flavonóides Polimetoxilados	16
1.4.3. Importância dos flavonóides na natureza	17
1.4.5. A presença dos PMF na dieta.....	19
1.4.6. Flavonóides na medicina	20
1.4.7. Atividade biológica	21
1.5. Aspectos econômicos	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. OBJETIVO GERAL	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1. Obtenção dos Flavonóides.....	27
2.1.1. Obtenção das espécies do gênero <i>Citrus</i>	27
2.1.2. Obtenção dos extratos epicuticulares e dos extratos em hexano	27
2.1.3. Isolamento, purificação e identificação das substâncias do extrato em hexano.....	28
2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana	29
2.2.1. Solventes usados na solubilização dos produtos naturais.....	29

2.2.2. Corante usado para a identificação dos microrganismos e reagente usado para a revelação dos testes.....	30
2.2.3. Meios de cultura.....	30
2.2.4. Origem dos microrganismos.....	31
2.2.4.1. Bactérias.....	31
2.2.4.2. Fungos.....	31
2.2.5. Preparo do inóculo.....	31
2.2.6. Método de bioautografia direta.....	33
2.2.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Quantidade Inibitória Mínima (QIM).....	34
3. RESULTADOS.....	36
3. 2. Identificação dos fungos <i>Curvularia</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp.....	40
3.3. Atividade antimicrobiana dos extratos e compostos isolados de <i>Citrus</i> spp.....	43
3.3.1. Teste de bioautografia direta.....	46
3.3.2. Concentração Inibitória Mínima e Quantidade Inibitória Mínima das substâncias e extratos de <i>Citrus</i> spp.....	51
4. DISCUSSÃO.....	56
5. CONCLUSÕES.....	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidades de extratos epicuticular e hexânico obtidas das diferentes espécies de <i>Citrus</i>	36
Tabela 2.- Perfil cromatográfico dos extratos e precipitados de <i>C. limon</i>	37
Tabela 3- Perfil cromatográfico dos extratos e precipitados das diferentes espécies de <i>Citrus</i>	38
Tabela 4. Compostos isolados de espécies de <i>Citrus</i>	39
Tabela 5. Atividade antifúngica de extratos da cera epicuticular de diferentes espécies de <i>Citrus</i> , pelo método bioautográfico direto.....	47
Tabela 6. Atividade antifúngica de extratos hexânicos de diferentes espécies de <i>Citrus</i> pelo método bioautográfico direto.....	47
Tabela 7. Atividade antifúngica de substâncias extraídas de diferentes espécies de <i>Citrus</i>	48
Tabela 8. Atividade antibacteriana de extratos da cera epicuticular de diferentes espécies de <i>Citrus</i> , pelo método bioautográfico direto.....	48
Tabela 9. Atividade antibacteriana de extratos hexânicos de diferentes espécies de <i>Citrus</i> pelo método bioautográfico direto.....	49
Tabela 10. Atividade antibacteriana de substâncias isoladas de diferentes espécies de <i>Citrus</i> pelo método bioautográfico direto.	49
Tabela 11. Quantidade Inibitória Mínima (QIM) do extrato da cera epicuticular de <i>Citrus</i> spp. para bactérias e fungos.....	52
Tabela 12. Quantidade Inibitória Mínima (QIM) do extrato hexânico de <i>Citrus</i> spp. para bactérias e fungos.....	53
Tabela 13. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos obtidos de <i>Citrus</i> spp.e dos antimicrobianos de referência contra bactérias e fungos.....	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Organização esquemática da casca do fruto de *Citrus* spp. e os constituintes monoméricos majoritários da cutina. Fonte: FANG *et al.* (2001).....5
- Figura 2. Bolor verde e azul pós-colheita causado pelo fungo *Penicillium digitatum*. Fonte: VELÁSQUEZ & RONDÓN, (1980).9
- Figura 3. Formação dos flavonóides a partir da via chiquimato e acetato. Fonte: adaptação UGAZ, (1988). 15
- Figura 4. Flavonóides freqüentemente encontrados nas plantas. Fonte: PETERSON *et al.*, (1998). 16
- Figura 5. Metodologia usada para a obtenção de substâncias lipofílicas majoritárias de *Citrus* spp.29
- Figura 6. Estrutura dos compostos identificados nos precipitados de.....
C. limon (1); *C. reticulata* (2 e 3) e *C. aurantifolia* (4 e 5).39
- Figura 7. Fotomicrografias de *Curvularia* sp.: (a) hifas septadas e conídios (Aumento 250 x); (b) conídios.(Aumento 530 X) (poroconídios) de formato fusiforme e septos transversos. Corados com azul de algodão ao lactoglicerol.....41
- Figura 8. Conídios de *Colletotrichum* sp., corados com azul de algodão ao lactoglicerol (Aumento 530 X)43
- Figura 9. Curva de calibração do fungo patogênico *Colletotrichum* sp.....44
- Figura 10. Curva de calibração do fungo patogênico *Curvularia* sp.....44
- Figura 11 Curva de calibração do fungo dermatófito *Trichophyton mentagrophytes*.....45
- Figura 12. Curva de calibração do fungo dermatófito *Microsporum canis*.....45
- Figura 13. Curva de calibração do fungo fitopatogênico *Penicillium digitatum*.....46
- Figura 14. Teste de bioautografia direta após a revelação com violeta p - iodonitrotetrazólio contra a bactéria *S. aureus* (a) flavonas (2,3) (b) extrato hexânico de *C. sinensis*, (c) extrato epicuticular de *C. limon*, (d) extrato epicuticular de *C. aurantifolia* (e) 6,7-dimetoxi-cumarina.50

Figura 15. Teste de bioautografia direta contra o fungo <i>Curvularia</i> sp., sem a utilização do revelador violeta p -iodonitrotetrazólio (a) flavonas (2, 3), (b) 6,7-dimetoxi-cumarina, (c) extrato epicuticular de <i>C. reticulata</i> , (d) extrato hexânico de <i>C. sinensis</i> e (e) extrato epicuticular de <i>C. aurantifolia</i>	50
Figura 16. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de flavonas (1), flavonóis (2) e do antifúngico fluconazol (3) contra <i>Curvularia</i> sp. pela técnica da microdiluição em placa e sem a utilização do revelador de crescimento	52
Figura 17. Quantidade Inibitória Mínima (QIM) dos extratos da cera epicuticular de <i>C. limon</i> (1), <i>C. aurantifolia</i> (2) <i>C. reticulata</i> (3) e <i>C. sinensis</i> (4), contra <i>Curvularia</i> sp.	54
Figura 18. Concentração Inibitória Mínima dos compostos: Cumarina (1), 2,3-Flavonas (2), 4,5-Flavonois (3) contra a bactéria <i>S. aureus</i> com a utilização de violeta p -iodonitrotetrazólio.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – “American Type Culture Collection”

BHI - “Brain Heart Infusion” - Infusão de Cérebro e Coração

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CG - EM- Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectro de Massa

CL - EM- Cromatografia Líquida acoplada ao Espectro de Massa

CIM - Concentração Inibitória Mínima

EM - Espectrometria de Massa

FPM - Flavonóide Polimetoxilado

HPLC - “High-performance liquid chromatography” – Cromatografia Líquida de Alta Performance

INT - “p-iodoNitroTetrazolium Violet” – Violeta p - iodonitrotetrazólio

IV - InfraVermelho

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina

QIM - Quantidade Inibitória Mínima

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RPLC - “Reversed Phase Liquid Chromatography” - Cromatografia Líquida de Fase Reversa

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

UV - Ultravioleta

RESUMO

Os flavonóides polimetoxilados (FPM) são metabólitos secundários que ocorrem nas plantas do gênero *Citrus* e vem sendo introduzidos na dieta humana pelo avanço tecnológico na fabricação de sucos concentrados. Essas substâncias são encontradas principalmente nas cascas dos frutos que incluem princípios de resistência natural contra patógenos. Essa propriedade é, provavelmente, derivada da possibilidade de formarem complexos com proteínas solúveis e com a parede celular de microrganismos. A metilação das hidroxilas confere à molécula caráter lipofílico, o qual é também um dos parâmetros moleculares mais estudados na elaboração de novos medicamentos e pesticidas. No presente estudo, essas moléculas promissoras foram obtidas de cascas de frutos de 4 espécies de *Citrus*: *C. limon*, *C. reticulata*, *C. aurantifolia* e *C. sinensis*. Com o uso de hexano foram preparados extratos da cera epicuticular e extratos brutos hexânico. A partir desses extratos, foram obtidos uma cumarina e quatro flavonóides por precipitação com metanol. O processo foi monitorado por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) e as substâncias identificadas por métodos espectroscópicos, como sendo: 6,7-dimetoxi-cumarina, 6,7,8,4'-pentametoxi-flavona, 5,6,7,8,3',4'-hexametoxi-flavona, 8-hidroxi-3,5,6,7,4'-pentametoxi-flavona e 8-hidroxi-3,5,6,7,3',4'-hexametoxi-flavona. A atividade antimicrobiana dos extratos e compostos foi estudada por dois métodos: bioautografia direta e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). A bioautografia revelou que todos os extratos e substâncias obtidas apresentaram atividade inibitória para os fungos e as bactérias testadas. Pela CIM, constatou-se que a 6,7-dimetoxi-cumarina foi a substância mais eficiente para os fungos dermatófitos e que as flavonas 6,7,8,4'-pentametoxi-flavona e 5,6,7,8,3',4'-hexametoxi-flavona foram as mais ativas para as bactérias.

ABSTRACT

Polymethoxylated flavonoids (PMF) are secondary plant metabolites and constitute a group which is found in *Citrus* species and are introduced in to the human diet after new technologiest processwere avilable is the citric concentrate juice industry. PMF are located in the fruit peel at *Citrus* spp. and they act as natural factors for resistance against pathogens. This property is probably due to the fact that these substances form complexes with soluble proteins and with the cellular wall of microorganisms. In this context, the lipophilic aspect is one of the most studied molecular parameter in new drugs and pesticide production. With the peel of *C. limon*, *C. reticulata*, *C. aurantifolia* and *C. sinensis*, a wax extract and a hexanic extract were obtained. Pure substances were obtained by precipitation through methanol dissolution. These substances were analysed through thin-layer chromatography (TLC). One coumarin, 6,7-dimethoxy-coumarin, and the polymethoxylated flavonoids 5,6,7,8,4'-pentamethoxy-flavone, 5,6,7,8,3',4'-hexamethoxy-flavone, 3,5,6,7,4'-pentamethoxy-8-hydroxy-flavone and 3,5,6,7,3',4'-hexamethoxy-8-hydroxy-flavone were identified. The antimicrobial activity of these extracts and compounds was evaluated by direct bioautography. All the *Citrus* spp. showed antimicrobial activity. The determination of the minimal inhibitory concentration showed that 6,7-dimethoxy-coumarin was showed highest efficient a against dermatophyte fungi while the 5,6,7,8,4'-pentamethoxy-flavone and the 5,6,7,8,3',4'-hexamethoxy-flavone present highest efficiency against the bacteria.

1. INTRODUÇÃO

A natureza é uma das maiores fontes de medicamentos para a humanidade. As populações de todos os continentes, ao longo da vida vem utilizando, desde a pré-história, infusões de plantas para o tratamento de diversas doenças (COWAN, 1999). Atualmente, nos países industrializados, mais de 40% de todos os medicamentos são provenientes de recursos naturais ou são semi-sintéticos, demonstrando o potencial terapêutico de plantas, animais, microrganismos e minerais. Do ponto de vista econômico, é importante ressaltar que nos países desenvolvidos os fitoterápicos movimentam anualmente cerca de 12 bilhões de dólares (GRUNWALD, 1995).

No Brasil, os produtos naturais merecem destaque devido à ampla biodiversidade que existe em seu território. Estima-se que 20% do patrimônio genético mundial esteja concentrado em território nacional, onde o índice de endemismo é altíssimo. São 55 mil espécies vegetais (22% do total registrado no planeta), 524 mamíferos (cerca de 131 endêmicos), 517 anfíbios (294 endêmicos), 1.622 aves (191 endêmicas), 468 répteis (172 endêmicos), 3 mil espécies de peixes de água doce e cerca de 15 milhões de insetos, (elevado número ainda sem qualquer descrição taxonômica). Assim, o país se torna um celeiro para a busca de novas substâncias com atividades farmacológicas (PINTO *et al.*, 2002).

Dentre essas fontes de medicamentos, o reino vegetal representa um extraordinário reservatório de moléculas. Das 400.000 a 500.000 espécies de plantas existentes no globo, somente uma pequena porcentagem tem sido estudada em suas propriedades fitoquímicas (HOSTETTMANN, WOLFENDER, RODRIGUEZ, 1997) e menor ainda tem sido a parcela destinada à investigação de atividade antimicrobiana.

Embora os antibióticos de origem microbiana já venham sendo utilizados na prática médica desde os anos 40, o uso de antimicrobianos derivados de plantas ainda é incipiente (COWAN, 1999). Portanto, muitas são as razões que estimulam os estudos sobre a triagem de novas moléculas com propriedades antimicrobianas a partir de fitoquímicos. Dentre essas, podemos citar, ainda, o aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos tradicionais (COWAN, 1999) e a maior sensibilidade de pacientes tratados com drogas imunossupressoras às infecções fúngicas e bacterianas

O estudo de novos medicamentos para o tratamento de infecções fúngicas se tornou mais relevante nas últimas décadas, com o aumento do número de incidências causados por fungos, contrapondo-se ao fato de que o número de antibacterianos é significativamente maior que o número de agentes antifúngicos (ALVES, LOPES, CURY, 2001).

Um outro fator, que vem sendo atualmente focado na área biomédica, é o crescente uso de extratos de plantas como alimentos, cosméticos e na indústria farmacêutica (NOSTRO *et al.*, 2000), fazendo surgir uma nova tendência, que focaliza as propriedades nutracêuticas dos alimentos. O nutracêutico, termo concebido em 1989 pela “Foundation for Innovation in Medicine”, é definido como um alimento ou parte de um alimento que fornece algum benefício incluindo a prevenção e o tratamento de doenças (DEFELICE, 1992). Dessa forma, os compostos naturais também podem atuar como nutracêuticos, sendo a base dos componentes presentes nos nutracêuticos eminentemente de origem vegetal, ou seja, fitoquímica.

Evidências demonstram que os componentes químicos presentes nos alimentos contêm substâncias fisiologicamente ativas que cumprem funções benéficas e

contribuem para reduzir a incidência de certas enfermidades crônicas. São, portanto, necessárias para uma vida saudável. Vários exemplos comprovam esse fato: a utilização do vinho tinto ou do suco da uva na prevenção de doenças do coração (ZUANAZZI, 2000); dietas ricas em frutas, verduras, grãos integrais e leguminosas, se mostram eficazes na proteção contra o câncer (BLOCK, PATTERSON, SUBAR, 1992; WILLIAMSON, FAULKNER, PLUMB, 1998); e, ainda, o consumo de chá preto e chocolate reduzindo o risco de morte por isquemia do coração (ARTS *et al.*, 2001). Como resultado, a prevenção de enfermidades através da dieta saudável é vista cada vez mais como uma opção, a base de produtos destinados a cobrir necessidades específicas.

No entanto, exceto quanto aos nutrientes conhecidos, a maioria das substâncias alimentares permanece incompletamente caracterizada por suas funções fisiológicas (VASCONCELLOS, 2001). Hoje em dia, estão sendo comercializados suplementos (pílulas, barras nutritivas e dietas líquidas) como fontes de vitaminas, energia e nutrientes, sem que seja feita uma completa investigação dos compostos e ingredientes naturais que estes fornecem. A absorção, distribuição e metabolismo de um nutriente depende da forma como tal é ingerido. As formas puras ou concentradas podem não ser absorvidas apropriadamente, podendo, ainda, interferir na absorção de outros nutrientes. O mesmo ocorre com os extratos de algumas substâncias fitoquímicas que não são tão efetivos como aquela que se encontra em sua forma natural, como parte do alimento. Isso sugere que alguns fitoquímicos podem não ser metabolizados em sua forma pura e necessitam da presença de outros compostos presentes nos componentes alimentícios para funcionar apropriadamente. É necessária uma investigação científica a fim de estabelecer o mecanismo de funcionamento biológico dos fitonutrientes e seu valor na luta por uma melhor qualidade de vida (VASCONCELLOS, 2001).

1.1. Frutas cítricas

As frutas de espécies do gênero *Citrus* (Rutaceae) apresentam uma grande aceitação na alimentação humana. Seu uso está centrado, principalmente, sob a forma da fruta fresca e do suco. As frutas cítricas se destacam por constituírem uma das principais fontes de compostos naturais com propriedades antioxidantes, como, por exemplo, carotenóides, ácido ascórbico, fenóis e polifenóis, que protegem o organismo contra o aparecimento de doenças degenerativas (GORINSTEIN *et al.*, 2001). Além desses compostos, podem ser encontrados 6 a 12% de glícidos, elevada quantidade de compostos nitrogenados, vitaminas C e cálcio, bem como ferro, fibras e outros sais minerais. O teor de gorduras, em contrapartida, é baixo, oscilando entre 0,2 e 0,5% (MACHIDA ? OSAWA, 1989; KOLLER, 1994; ROBARDS, ANTALOVICH, BOYD, 1997; MOULY, GAYDOU, ARZOUYAN, 1999).

A casca (epicarpo) é diferenciada em um exocarpo compacto, colenquimatoso, o flavedo, e um mesocarpo esponjoso, o albedo (ESAÚ, 1974). No flavedo, encontra-se uma cutícula constituída de cera que irá controlar a difusão de água e de compostos químicos para o meio ambiente e um suporte estrutural formado por polímeros que irão proteger o fruto contra o ataque de microrganismos, além de carotenóides que contribuem na coloração da casca e óleos essenciais que dão aroma ao fruto. Os constituintes monoméricos majoritários do flavedo podem ser observados na figura 1, são C₁₆ ácidos graxos hidroxilados (FANG *et al.*, 2001). No flavedo podemos encontrar, ainda, glândulas, e associadas a estas os flavonóides polimetoxilados (CHEN *et al.*, 1985; MOULY *et al.*, 1999). O albedo é formado pela pectina e a parede celular e constitui a porção geralmente branca e esponjosa da casca (ASHBELL *et al.*, 1987; ARDLE, LETOURNEAU, STEPHEN, 2000).

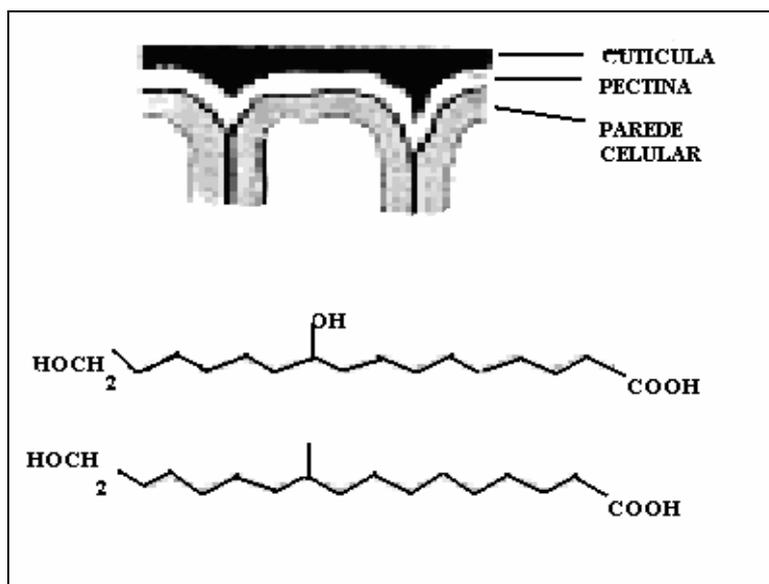


Figura 1. Organização esquemática da casca do fruto de *Citrus* spp. e os constituintes monoméricos majoritários do flavedo. Fonte: FANG *et al.*(2001).

O suco é obtido a partir do endocarpo do fruto maduro e com processo de fabricação, o epicarpo e o mesocarpo são geralmente descartados e/ou utilizados para a fabricação de ração para animais (HEERDEN *et al.*, 2002). Atualmente, porém, o epicarpo vem sendo usado como um complemento para o suco com a finalidade de aumentar a intensidade da cor, como também o valor nutricional (ARDLE *et al.*, 2000).

1.2. Microrganismos fitopatogênicos para os *Citrus* spp.

As plantas cítricas são susceptíveis a um grande número de patógenos. Alguns desses organismos incidem nas culturas de forma menos danosa, enquanto que outros são mais agressivos, podendo, inclusive, dizimar pomares em poucos dias (JOHAL *et al.*, 1995; DERRICK ? TIMMER, 2000).

As frutas e as partes vegetativas estão freqüentemente em contato com solo, insetos e animais durante o crescimento e a colheita no campo. Conseqüentemente, suas superfícies não estão livres dos contaminantes naturais. Em geral, a superfície da fruta de citros fresca contém populações de cerca de 10^4 microrganismos/cm². A maioria desses microrganismos é comum no solo e a sua presença na fruta fresca não representa geralmente um perigo para saúde pública. Porém, muitos microrganismos como algas, bactérias e fungos podem atacar as plantas cítricas, causando danos consideráveis a mudas em sementeiras, afetando raízes, tronco, ramos, folhas, frutos, brotações novas e botões florais (PAO & DAVIS, 1999).

As plantas, animais e insetos possuem tamanho e massa protoplasmática total quase sempre maior que uma população microbiana. Dessa forma, os efeitos visíveis que os microrganismos produzem nas plantas e animais se devem a estratégias específicas desenvolvidas para “iludir” ou reagir aos efeitos de proteção das plantas e animais (BROCK, 1966). Os compostos antimicrobianos da planta saudável estão geralmente armazenados em vacúolos ou organelas, e existem evidências, que durante o crescimento biotrófico do patógeno, esses compostos possam não afetar a infecção pelos microrganismos. As fitoalexinas induzidas podem ser evitadas ou atrasadas pela invasão do sistema de vigilância da planta. Há também evidências de que muitos fungos produzem moléculas que irão diminuir a resposta de defesa da planta, através da produção de toxinas e enzimas hidrolíticas que são responsáveis por reações necróticas das células nas plantas infectadas. Portanto, as estratégias dos microrganismos podem incluir: a produção de enzimas degenerativas, a resistência inata e os mecanismos de efluxo, estes para prevenir que os compartimentos com os compostos antimicrobianos sejam ativados em nível tóxico (MORRISSEY & OSBOURN, 1999).

Os fatores ambientais durante o estado de infecção da planta também podem aumentar a susceptibilidade da planta à enfermidade. Como o aumento da umidade, pela infiltração de água nos espaços intercelulares, facilitando a propagação de microrganismos nos tecidos da planta (ROBERTS & BOOTHROYD, 1978).

As bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *X. axonopodis* pv. *aurantifolii* são exemplos de microrganismo que atacam os *Citrus* spp. Essas bactérias são, facilmente, disseminadas pelo homem, animais, chuva, vento e insetos, e são o agente casual do cancro cítrico, uma doença que produz elevados prejuízos e ataca, mundialmente, a maioria dos *Citrus* spp. reduzindo a qualidade do fruto. Os sintomas consistem em lesões coriáceas cercadas de óleo ou água nas margens das folhas, frutos e no caule, causando, também, abscisão prematura da folha e do fruto (CUBERO, GRAHAM, GOTTWALD, 2001; CUBERO & GRAHAM 2002).

A verrugose é causada pelo fungo *Elsinoë australis*, que na forma imperfeita é conhecido por *Sphaceloma australis* (HAWKSWORTH *et al.*, 1983). Essa espécie ataca os tecidos jovens de folhas e ramos no primeiro estágio de desenvolvimento dos frutos e, assim que caem as flores, mas não penetra no seu tecido interno. Em condições favoráveis, aparecem pequenas manchas pretas e lesões onde se formam as frutificações do fungo, garantindo, assim, sua disseminação (ROSSETTI, MÜLLER, COSTA, 1993).

O fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, que na fase imperfeita é conhecido como *Glomerella cingulata* (HAWKSWORTH *et al.*, 1983), é o agente causal da antracnose. Esse fungo ataca comumente o caule, pecíolos e frutos, mas todas as partes aéreas da planta são susceptíveis. Nos frutos, em início do desenvolvimento, o microrganismo fica em estado quiescente, mas depois da colheita e do amadurecimento, ele se desenvolve rapidamente, surgindo manchas marrons escuras no pericarpo e um

leve apodrecimento no mesocarpo. Na folha, aparecem manchas pardas com bordas irregulares e coloração marrom claro no centro, mais escura nas extremidades e halo amarelado (VELÁSQUEZ & RONDÓN, 1980; BAILEY & JEGER, 1992; GUARRO *et al.*, 1998; YAKOBY *et al.*, 2000;).

Outro fungo filamentososo, patogênico para os *Citrus* spp., é *Curvularia* spp., que na forma imperfeita, é conhecido por *Cochliobous* spp. (HAWKSWORTH *et al.*, 1983). A maioria das espécies de *Curvularia* é formada por patógenos facultativos nativos do solo, plantas e cereais em áreas tropicais e subtropicais (DESHAZO & SWAIN *et al.*, 1995).

As doenças pós-colheita, que ocorrem na casca dos frutos, são um fator econômico importante no “marketing” da fruta cítrica fresca. Isso se deve ao fato de afetar a aparência externa e influenciar na aceitação do consumidor. Essas doenças deterioram o fruto e podem causar perdas econômicas significativas, limitando as possibilidades de exportação. Dentre os fungos causadores da podridão pós-colheita destacam-se *Penicillium digitatum* e *P. italicum* cujos estados teleomórficos são *Eupenicillium* sp. e *Talaromyces* sp., respectivamente. Esses fungos são causadores do bolor verde e azul nos frutos de *Citrus* spp. (HAWKSWORTH *et al.*, 1983; ROSSETTI *et al.*, 1993).



Figura 2. Bolor verde e azul causado pelo fungo pós-colheita *Penicillium digitatum*. Fonte: VELÁSQUEZ & RONDÓN, (1980).

1.3. Mecanismos de defesa das plantas

As plantas possuem suas próprias defesas que as protegem de outras plantas, microrganismos, insetos fitófagos, e herbívoros predadores de uma maneira geral. Essas defesas são de natureza química e física e podem ser divididas em passivas e ativas. As defesas passivas são as barreiras pré-infeccionais e as ativas são as pós-infeccionais (HARBORNE, 1982; PINTO *et al.*, 2002).

Os mecanismos passivos podem ser físicos ou químicos. No primeiro caso, encontram-se a parede celular, espaços intercelulares e xilema, presença de ceras, que além de atuar como uma barreira contra a invasão de microrganismos protegem a planta da radiação ultravioleta e contra a perda de água. Dentre os químicos, citam-se os inibidores da germinação dos esporos, inibidores de polissacarídeos e proteases ou compostos com ação tóxica sobre o organismo invasor (HARBORNE, 1982).

Os mecanismos de resistência ativa ocorrem somente em resposta à possível invasão do hospedeiro, envolvendo, também, respostas físicas e químicas. As primeiras incluem a formação de estruturas histológicas e celulares de defesa, tais como camadas

de cortiça, tiloses, gomas ou espessamentos da parede celular pela deposição de calose. Dentre as respostas químicas estão a síntese e/ou ativação de substâncias aromáticas. Essa ativação acontece geralmente por hidrólise enzimática ou oxidação. Os compostos sintetizados e ativados também são chamados de fitoalexinas e estão relacionados com os constituintes do metabolismo secundário das plantas (HARBORNE, 1982; BOWLES, 1991; JOHAL *et al.*, 1995).

As fitoalexinas aparecem, geralmente, em altas concentrações em resposta à infecção, desempenhando, nas plantas, um papel semelhante ao dos anticorpos nos animais. Embora incluam várias classes de produtos naturais, existe uma relação entre a natureza química das fitoalexinas e determinadas famílias de plantas. Apenas uma família é conhecida por apresentar uma grande variedade de tipos de fitoalexinas, a Leguminosae (HARBORNE, 1982; STEVENS *et al.* 1995; BARTHOLOTT *et al.*, 1998).

Dentro das respostas químicas, também ocorre formação de substratos resistentes às enzimas do patógeno, como a detoxificação de toxinas, reações de hipersensibilidade acompanhadas de morte celular programada, dentre outras respostas (JOHAL *et al.*, 1995; STEVENS *et al.* 1995; KERSTIENS, 1996).

A distinção entre as barreiras de pré-infecção e as de pós-infecção não é facilmente estabelecida. A literatura especializada revela que muitas espécies de plantas já exibem a produção de compostos que conferem resistência ao ataque de invasores com o primeiro contato do patógeno, embora a concentração máxima só seja atingida após 24 horas desse contato (UZI *et al.*, 1986). Por outro lado, respostas estruturais são diretamente dependentes de mudanças fisiológicas e bioquímicas, o que dificulta a diferenciação entre defesas físicas e químicas (ADASKAVEG, 1992).

Deve-se considerar, ainda, que os produtos formados pelo metabolismo das plantas podem variar de tecido para tecido, das condições de crescimento e dos estímulos do meio ambiente (ROBARDS & ANTALOVICH, 1997).

1.4. Flavonóides

Os flavonóides são compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário e compreendem uma das maiores classes de produtos naturais, juntamente com isoprenóides e alcalóides (SHIRLEY, 1996). Os flavonóides podem estar presentes em diferentes órgãos das plantas como nos frutos, onde são particularmente abundantes (UGAZ, 1998).

1.4.1. Biossíntese dos flavonóides: Regulação transcricional

A coordenação do controle transcricional da biossíntese nos genes resulta no mecanismo que dita o metabolismo secundário das plantas.

Essa regulação é dada por fatores específicos de transcrição, ao passo que esses fatores são proteínas que interagem com regiões promotoras dos genes alvo e modulam a iniciação da síntese de RNA mensageiro pela RNA polimerase II. Os fatores de transcrição se caracterizam, no metabolismo secundário das plantas, ou na biossíntese de flavonóides, ou dos terpenóides (ENDT, KIJNE, MEMELINK, 2002).

Essas proteínas, que regulam a transcrição dos genes, dependem do tipo de tecido e/ou da resposta dos sinais internos, como os hormônios da planta, e externos, como ataque de patógenos, estado nutricional, temperatura, incidência de luz ultravioleta, dentre outros. Os fatores externos podem induzir os internos. Esses estímulos resultam no aumento de genes transcritos correspondentes a enzimas biossintéticas (ENDT *et al.*, 2002). Nesse contexto, foi isolado de *Citrus unshiu* Marc.,

um gene (Cit FLS) que codifica a síntese de flavonóides. Este gene têm 1274 bp de comprimento, 335 resíduos de aminoácidos e pertence à família das 2-oxaglutarato-dependente de dioxigenases. Posteriormente, investigou-se a expressão desse durante o desenvolvimento do fruto e das folhas. Os níveis de Cit FLS transcritos nas folhas jovens foram maiores do que nas velhas. Por outro lado, eles aumentaram na casca dos frutos durante a maturação. Esses resultados indicam que essa espécie é regulada diferentemente durante o estágio de desenvolvimento e também depende do tecido-específico (MORIGUCHI *et al.*, 2002).

O efeito do estresse causado por bactérias como *Herbaspirillum rubri* e *Gluconacetobacter diazotrophicans* também foi avaliado na cana-de-açúcar, constatando-se a indução da expressão de chalcona sintase (CHS) em plântulas infectadas com esses agentes, o que sugere a ativação da via da biossíntese dos flavonóides em resposta ao estresse biológico. Os resultados indicam que as vias do metabolismo de isopropanóides e de fenilpropanóides em cana de açúcar também são ativadas de acordo com o estágio de desenvolvimento, especificidade de tecidos e em resposta a situações de estresse (FRANÇA *et al.*, 2001).

A maioria das plantas que possuem como produtos da biossíntese dos flavonóides as antocianinas apresenta proteínas (vertebrado proto-oncogêne) responsáveis pela ligação no alvo da seqüência de DNA. Membros específicos dessa família de proteínas estão envolvidos na regulação dos flavonóides, juntamente com bHLH (basic Helix-Loop-Helix) em *Arabidopsis thaliana* (GROTEWOLD *et al.*, 1989).

Muitas enzimas responsáveis pela biossíntese de flavonóides pertencem a uma pequena família de genes. KIMURA, AOKI, AYAE, (2002) reportaram que

Glycyrrhiza echinata contém duas izoenzimas que estão provavelmente envolvidas na biossíntese dos isoflavonóides específicos de leguminosas.

Atualmente, essas enzimas vem sendo usadas para melhorar o valor nutricional dos vegetais, através do aumento de flavonóides que tenham se mostrado ativos na promoção da saúde em animais. Em estudo realizado por MUIR *et al.* (2001), pode-se evidenciar a utilização das enzimas que são responsáveis pela biossíntese dos flavonóides. Utilizando-se o tomate, que possui uma pequena quantidade de flavonóides em sua casca, foi realizada uma transformação no gene que codifica a chalcona isomerase, o *chia-a* de petúnia, resultando em uma variedade de tomate transgênica com maiores níveis de rutina, obtendo-se um fruto com maior atividade biológica. Através desse estudo, pode-se observar que a aproximação racional da engenharia da biossíntese de flavonóides depende, certamente, de um entendimento detalhado da enzimologia na biossíntese dos flavonóides.

Assim, a compreensão da base molecular na função dos estímulos externos, bem como a regulação e o mecanismo bioquímico do controle dos tipos e quantidades de flavonóides sintetizados sob diferentes condições, continua a ser prioridade de muitos estudos no intuito de beneficiar a integração de novas tecnologias abrangendo a genética e a bioquímica (SHIRLEY, 2002).

1.4.1.2. Formação dos flavonóides

Os flavonóides se formam a partir da união da via do chiquimato e da via acetato (Figura 3). De um modo simplificado, a biossíntese dos flavonóides envolve uma unidade de *p*-cumaroil-CoA e de três unidades de malonil-CoA. O fechamento do anel A produz uma chalcona que ciclisa, originando o anel C que, que é fechado na reação seguinte. A partir desse flavonóide, podem ocorrer outras modificações

produzindo, dessa forma, outras classes. Assim, cada uma dessas classes pode sofrer metilações, isoprenilações ou glicosilações (ROBBERS *et al.*, 1997; PELEGRINE & GALEMBECK, 2001). Estruturalmente, os flavonóides são caracterizados pelo esqueleto de carbono C₆-C₃-C₆ (PETERSON, DWYER, DSC, 1998) que apresentam-se freqüentemente oxigenados nas posições 5, 7 e 4'. Um grande número de esqueletos flavonoídicos apresenta ligações com moléculas de açúcares. Esta forma, é chamada de conjugada, também conhecida como heterosídeo (UGAZ, 1998).

Atualmente, são conhecidos mais de 4.200 flavonóides. Dentre os flavonóides mais comuns destacam-se as classes das flavonas e os flavonóis (Figura 4). Dentre os outros flavonóides podem-se citar as isoflavonas, as chalconas e as auronas (PETERSON *et al.*, 1998).

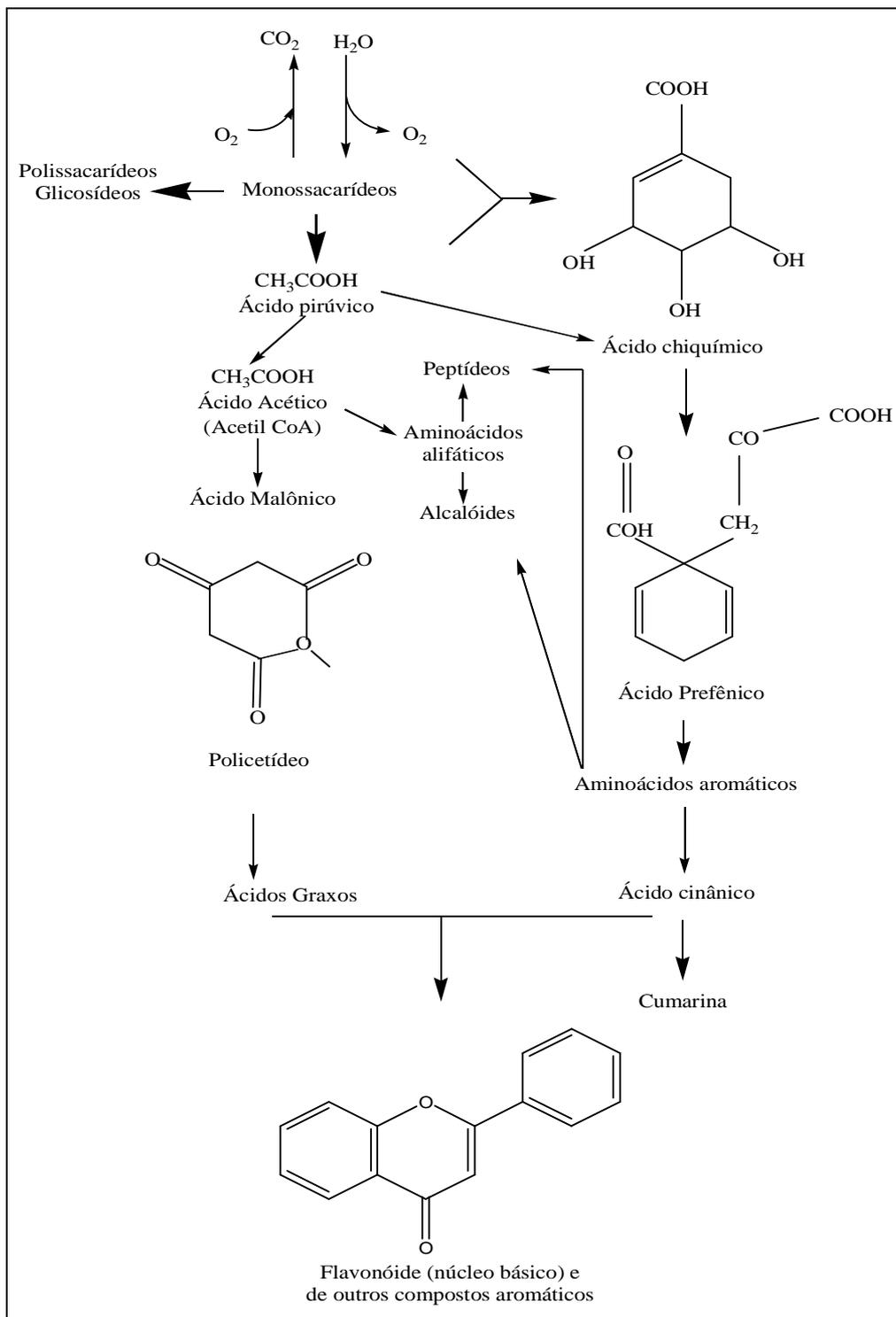


Figura 3. Formação dos flavonóides a partir da via chiquimato e acetato.

Fonte: adaptação UGAZ, (1988).

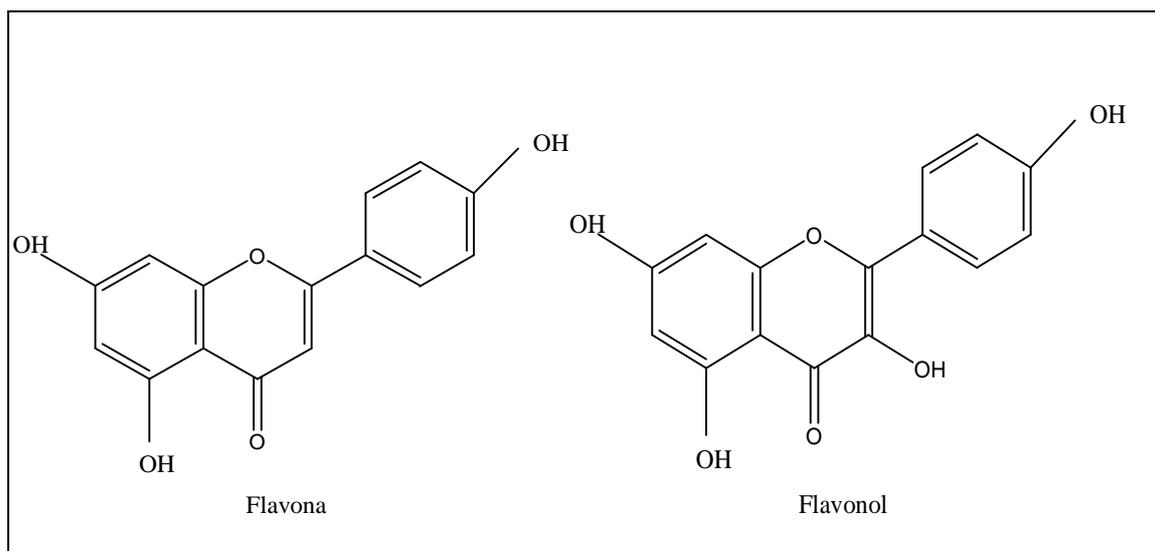


Figura 4. Flavonóides mais encontrados nas plantas. Fonte: PETERSON *et al.*, (1998).

1.4.2. Flavonóides Polimetoxilados

Os flavonóides podem sofrer metilações sucessivas em seus grupos hidroxílicos formando, assim, os flavonóides polimetoxilados (FPMs), que possuem características lipofílicas. Os FPMs não são comuns em frutas, mas os *Citrus* spp. são uma exceção, contendo, assim, uma elevada quantidade de flavonóides polimetoxilados (ROBARDS & ANTALOVICH, 1997). Um estudo da localização desses metabólitos secundários em tangelo (fruta cítrica do cruzamento de dois outros citros) revelou que eles estão localizados na casca (ORTUNÕ *et al.*, 1999). Esse resultado, combinado com estudos de outros autores (CHEN *et al.*, 1985; MACHIDA & OSAWA, 1989; MANTHEY & GROHMANN, 1996) em diferentes espécies de *Citrus* apóia a idéia de que a localização na superfície é possivelmente um fator de proteção contra o ataque de patógenos (ORTUNÕ *et al.*, 1999).

Os FPMs mais abundantes são a sinesetina, a nobiletina e a tangeritina que são encontrados nas cascas dos frutos e no óleo essencial de laranja (*C. sinensis*), do limão

(*C. limon*) e da tangerina (*C. reticulata*) (NIELSEN *et al.*, 2000). Esses compostos contribuem para o sabor amargo dos *Citrus* spp. (PETERSON *et al.*, 1998). Os FPMs variam consideravelmente entre as espécies e variedades de *Citrus* spp., sendo utilizados na quimiosistemática da família Rutaceae (MIZUNO *et al.*, 1991).

1.4.3. Importância dos flavonóides na natureza

O interesse nos flavonóides advem do fato de possuírem uma grande diversidade de funções de significado biológico, como compostos de defesa, moléculas sinalizadoras na reprodução, influenciando o crescimento e a aparente função na proteção da planta contra o estresse. Eles também são responsáveis pelas diferentes cores entre as espécies de plantas (SHIRLEY, 1996).

Os flavonóides são importantes agentes de defesa contra insetos e microrganismos fitopatogênicos, como vírus, bactérias e fungos, atuando como defensores naturais das plantas na forma de resposta química à invasão de patógenos (ZUANAZZI, 2000). A fungitoxidade destes compostos depende da quantidade de grupos metilados e do número de substituintes na formação do anel aromático, o que os torna mais tóxicos, interferindo na membrana dos fungos (HARBORNE, 1982). Os flavonóides com ação antifúngica pertencem a diferentes classes, mas são específicos de um pequeno grupo de plantas, sugerindo que eles possam ter aparecido recentemente durante a evolução das plantas (BOHM, 1998).

Como foi citado anteriormente, evidências demonstram que os flavonóides têm função de defesa para as plantas contra uma variedade de microrganismos patogênicos. Contudo, eles podem servir, também, como moléculas sinalizadoras atraindo microrganismos para a planta (SHIRLEY, 1996). Além disso, os flavonóides são conhecidos por seus pigmentos (vermelho, azul e roxo) característicos nos tecidos das

plantas, que podem exercer um poder atrativo sobre os polinizadores de plantas (insetos, pássaros ou outros animais), exercendo desta forma um papel essencial na reprodução e dispersão dos vegetais (BOHM, 1998; SHIRLEY, 2002). A germinação do pólen e o crescimento do tubo polínico também estão associados aos flavonóides, principalmente ao campeferol (BOHM, 1998).

Os flavonóides são essenciais às associações biológicas, envolvendo uma grande variedade de interações com microrganismos benéficos (SHIRLEY, 1996). Em estudo realizado com raiz de *Brassica napus* colonizada por *Azorhizobium caulinodans* ORS571(pXLGD4), pode-se observar a influência dos flavonóides e das glucosinolases no crescimento da colonização pela bactéria (BOHM, 1998; KENNETH *et al.*, 2000). Da mesma forma, os flavonóides são sinalizadores moleculares para estabilizar a associação simbiótica com fungos, como na colonização por fungos micorrízicos, facilitando a transferência de muitos minerais, particularmente, o fósforo para planta e transferindo carboidratos para o fungo (SHIRLEY, 1996).

Os flavonóides também podem influenciar no crescimento da planta, controlando o transporte da auxina, um regulador de crescimento. Esse hormônio, em situações de estresse, responde pelo controle da abertura do estômato e pelo destino dos recursos em condições deficientes de crescimento. Os flavonóides possuem uma estrutura similar ao inibidor do transporte de auxina, o ácido naftilftalmíco, competindo assim com este inibidor (MUDAY & DELONG, 2001). Isso se torna mais evidente devido ao mecanismo de biossíntese dos flavonóides se localizar no ápice e nas células do córtex da zona de alongação da raiz nas plantas de *Arabidopsis* spp. (SASLOWSKY & SHIRLEY, 2001).

Uma das funções mais freqüentemente citada, é a proteção contra o estresse da planta que se origina devido à sua capacidade de filtrar raios ultravioletas. A camada epidérmica das plantas pode absorver cerca de 90-99% da luz ultravioleta incidente. A localização dos flavonóides nessa camada epidérmica, e suas conhecidas propriedades de absorção de luz ultravioleta, principalmente UV-B, sugerem que estes sirvam como uma proteção à radiação prejudicial (BOHM, 1998). Esse fato se tornou ainda mais importante nos últimos anos, devido à deterioração da camada de ozônio da Terra, que faz com que a incidência de raios UV seja ainda maior. Em adição, a biossíntese dos flavonóides é rápida e fortemente induzida pela exposição à radiação UV (SHIRLEY, 1996, 2002). Em outra situação de estresse, como é o caso das geadas, MANTHEY *et al.*, (2000), observaram nas folhas de *C. sinensis* uma relação entre o aumento da concentração de flavonóides e a deficiência de zinco induzida pela referida intempérie. Existem evidências, também, de que os flavonóides exercem função na resistência à toxidez do alumínio em plantas. Isso ocorre devido à alta atividade destes compostos fenólicos em capturar diversos metais (SHIRLEY, 2002).

1.4.5. A presença dos PMF na dieta

Recentemente, na Holanda, foi verificada a presença de cinco compostos na dieta humana: apigenina, campeferol, luteolina, mircetina e quercetina. De acordo com este estudo, a quantidade desses compostos na alimentação foi de aproximadamente 23 mg por dia (PETERSON *et al.*, 1998). No entanto, nele não foram descritas outras classes importantes de flavonóides como as antocianinas, flavonas, flavononas e isoflavononas. Isso pode levar a uma estimativa errônea da contribuição dos flavonóides na dieta. Um bom exemplo é representado pela análise dos cinco compostos citados anteriormente em *Citrus* spp. O suco dessas espécies contribui com apenas 1 mg.100

mL⁻¹ de flavonóides da dieta (PETERSON *et al.*, 1998). No entanto, estima-se, que o suco de *Citrus* spp. contém de 25 a 30 % dos flavonóides ingeridos na dieta humana (ROBARDS & ANTALOVICH, 1997).

Durante a metabolização dos flavonóides em humanos e outros animais, as moléculas de açúcar nos flavonóides glicosilados são usualmente clivadas durante o processo de absorção. Depois da absorção, os flavonóides são conjugados no fígado e se estendem para o rim. As moléculas conjugadas são excretadas na bile e urina (PETERSON *et al.*, 1998).

No organismo humano, foi investigada a ingestão de quercetina e outros flavonóides e sua degradação por bactérias na passagem pelo tracto intestinal, resultando na formação de ácidos fenólicos. As bactérias que fazem essa degradação utilizam os flavonóides como única fonte de carbono. Recentemente, foi isolada a bactéria *Eubacterium ramulus* de fezes humanas, que mostrou utilizar a quercetina-3-glucosídeo como substrato de crescimento, resultando na formação de ácido 3,4-dihidroxifenilacético (SIMMERING *et al.*, 2002).

1.4.6. Flavonóides na medicina

Os flavonóides são componentes de muitos medicamentos naturais e estão presentes em mais de 100 preparações comercializadas na Suíça e França. A própolis, presente na cera de abelha, contém um grande número de flavonóides e é usada em medicamentos e cosméticos. As preparações com rutina e diosmina são comumente usadas para aumento do tônus vascular. As antocianinas de *Vaccinium* spp. e *Ribes* spp. (uva do monte e groselha negra, respectivamente) são usadas para aumentar a visão e a resistência capilar (PETERSON *et al.*, 1998).

1.4.7. Atividade biológica

Os flavonóides são muito estudados devido a suas inúmeras atividades biológicas, como por exemplo: atividade antioxidante, anticarcinogênica, antimicrobiana, ação antiinflamatória e antialérgica (ZUANAZZI, 2000).

A atividade antioxidante dos flavonóides está relacionada a sua estrutura, ou seja, vai depender do número de substituintes hidroxil na sua estrutura. De modo geral, quanto mais hidroxil, mais forte será a sua atividade (CAO, SOFIC, PRIOR, 1997). Em estudo realizado com extrato de *Ginkgo biloba* EGb 761 e derivados do vinho tinto mostrou-se que as propriedades antioxidantes dos flavonóides presentes foram capazes de proteger as células do hipocampo contra os efeitos tóxicos de peptídeos beta-amiloideos (A β) e estresse oxidativo (BASTIANETTO & QUIRON, 2001).

Existem vários estudos do efeito antimutagênico dos flavonóides. A quercetina é o composto mais estudado. Entretanto, estudos com FPM, presente nos frutos de *Citrus* spp., demonstram uma efetiva inibição no crescimento de células cancerígenas (CHEN *et al.*, 1985; DEPYPERE *et al.*, 2000; IWASE *et al.*, 2001). A tangeritina induz os leucócitos à inibição parcial do desenvolvimento de HL-60, células causadoras da leucemia (HIRANO, ABE, OKA, 1995). A tangeritina, nobiletina e heptametoxiflavona têm propriedades citotóxicas sobre as células cancerígenas e função de ajudar na circulação sanguínea de pacientes com doenças coronárias (KUPCHAN, KNOX, UDAYAMURTH, 1965; ROBBINS, 1976; MIDDELETON ? KANDASWAMI, 1994; DEPYPERE *et al.*, 2000). Esses compostos atuam na prevenção do câncer, uma vez que interagem com radicais livres que, quando em excesso, possuem ação tóxica e contribuem para a carcinogênese (IWASE *et al.*, 2001).

Foram encontrados também flavonóides fitoestrógenos (daidzeína, genisteína, gliciteína) em alguns compostos químicos de planta, como na soja. Esses são compostos com atividade análoga ao estrogênio, hormônio esteróide que apresenta importante função no sistema reprodutor feminino e também influencia no crescimento, diferenciação e função de muitas células alvo e na esteroidogênese de humanos e animais selvagens. Tornando-se, assim, importantes, também na proliferação de células cancerígenas, devido à regulação no crescimento dessas células (PETERSON *et al.*, 1998).

As catecolaminas isoladas no chá preto, maçã e chocolate foram testadas quanto ao seu efeito contra à morte por isquemia de coração. Observou-se que o consumo de 7,5-mg reduziu em 20% o risco da mortalidade por essa doença (ARTS *et al.*, 2001). A sinetina, um FPM, tem efeito sobre a diminuição da agregação e da sedimentação de eritrócitos na circulação sanguínea (ROBBINS, 1976).

Muitos flavonóides isolados de diferentes plantas apresentam atividade antimicrobiana *in vitro* (HARBORNE *et al.*, 1976; JENSEN *et al.*, 1998; ALCERITO *et al.*, 2001; PENNA *et al.*, 2001; PANIZZI *et al.*, 2002), como os presentes na própolis da cera de abelha (KOO *et al.*, 2002). Essa atividade deve-se, provavelmente, à sua capacidade em formar complexos com proteínas solúveis e com a parede celular das bactérias. Os flavonóides polimetoxilados também podem romper a membrana microbiana (COWAN, 1999). KOTKAR *et al.*, (2002) estudaram os flavonóides isolados das folhas de *Annona squamosa* que se mostraram ativos contra contaminantes comuns desta planta. HARBORNE *et al.*, (1976) estudaram essas respostas em gêneros de *Lupinus* contra fungos não patógenos, e observaram que a presença de luteonina

conferia atividade fungitóxica, tendo significativa influência na resistência contra doenças.

Os flavonóides exibem efeito inibitório contra diversos vírus pela indução da produção de gamma interferon derivado de Th1 pelas células mononucleares do sistema periférico sanguíneo (NAIR *et al.*, 2002). Numerosos estudos têm documentado o efeito dos flavonóides contra o vírus HIV, vírus que causam infecções respiratórias, vírus do herpes simples tipo I (HSV-1), poliovírus tipo I, parinfluenza tipo 3 (BRINKWORTH, STOERMER, FAIRLIE, 1992; COWAN, 1999; YAO-LAN *et al.*, 2002).

1.5. Aspectos econômicos

O interesse nos flavonóides não é restrito apenas às áreas mencionadas, mas se estende a diferentes aplicações no campo industrial, como na descoberta de novos pigmentos, na tanagem do couro, na fermentação do chá-da-índia e na indústria alimentícia como condimentos para o preparo de alimentos (ZUANAZZI, 2000). Em consequência, o interesse comercial nesses compostos é considerável.

Dessa forma, a cultura das plantas cítricas tem proporcionado grande progresso às regiões produtoras, com o aprimoramento de áreas de apoio como a tecnologia industrial, abrangendo não só novas e modernas fábricas como conceitos específicos de transporte nacional e internacional dos produtos derivados da laranja (ROSSETTI *et al.*, 1993). Os óleos essenciais e o farelo da polpa cítrica são exemplos das diferentes aplicações dos produtos derivados de *Citrus* spp. no mercado interno e externo, as quais incluem fabricação de produtos químicos, solventes, aromas, fragrâncias, tintas, cosméticos e rações (ABECITRUS, 2001).

No Brasil, o desenvolvimento desta cultura vem crescendo. A literatura cita que o país se encontra em primeiro lugar, com 36%, na produção mundial de frutas cítricas. As exportações brasileiras de frutas frescas alcançaram, em 1998, US\$ 117,2 milhões, um aumento de 1% em relação ao ano anterior (VILAS, 1999). O forte das exportações da citricultura concentra-se no suco concentrado, que representa mais de 85% do total de divisas carregadas. O Brasil é líder mundial nesse mercado, com 1,1 milhão de toneladas de suco produzidas a cada ano.

O maior valor com as exportações de suco concentrado foi obtido em 1996 (US\$ 1,4 bilhão), devido ao elevado preço médio alcançado (US\$ 1.175/tonelada), não representando, porém, o maior volume exportado, que foi de 1,189 milhão de toneladas, em 2000. Devido ao baixo preço médio alcançado neste último ano (US\$ 809/tonelada) obteve-se um valor menor (US\$ 1,03 bilhão), em relação aos demais períodos (NEVES *et al.*, 2001).

É interessante registrar que em 1996 e 1997 os valores alcançados pelo farelo de polpa cítrica ultrapassaram os US\$ 100 milhões. No início de 2001, com o pânico gerado pela crise da “vaca louca”, doença que afeta gado leiteiro e de corte, e com a conseqüente condenação e restrição ao uso de ração de origem animal, foi possível um aquecimento nas importações européias por tortas e farelos de origem vegetal, principalmente, as de soja e de laranja. Em 2001, registraram-se aumentos nas exportações de farelo de polpa cítrica para a União Européia, tanto em volume físico, como em divisas obtidas (NEVES *et al.*, 2001). Nas exportações cítricas é digno de registro que o óleo essencial, de reduzida importância em termos de volume físico se comparado aos volumes de suco concentrado e farelo de polpa, colabora nas divisas carregadas devido à alta agregação de valor que possui em termos de preço médio, tendo

superado, por valor unitário (US\$/tonelada), o suco concentrado nos anos de 1996, 1997 e 2000 (NEVES *et al.*, 2001).

No estado de São Paulo o cultivo de *Citrus* spp. ocupa uma área aproximada de 630 mil hectares. Além disso, a produção de laranjas gera cerca de 400 mil empregos diretos, computada a mão-de-obra utilizada desde o cultivo, assistência técnica e adubação até o transporte e embarque do produto. Os mais de 20 mil produtores paulistas de citros fornecem matéria-prima para 22 indústrias processadoras de suco de laranja, excluindo-se a receita de venda das frutas *in natura* no mercado nacional (ABECITRUS, 2001).

No estado de Santa Catarina, foi criado um programa de incentivo à citricultura, impulsionado pela absorção garantida de produção pelas agroindústrias. Criou-se, assim, o programa de trabalho e renda em citricultura, com o objetivo de diversificar a produção das propriedades e aumentar a renda (SCOLA, 2001).

Essas informações revelam a importância da cadeia agroindustrial cítrica no Brasil e a valorização da fruticultura nacional, pois se enquadra entre os principais produtos de exportação, agregando valor à economia do País e servindo de exemplo para programas de cultivo das demais frutas.

Dessa forma, o estudo dos FPMFs isolados de plantas do gênero *Citrus* merece destaque, não só pela alta produção desse gênero no Brasil, como também pelo grande valor nutricional e sua boa aceitação na alimentação humana. De outro norte, o avanço industrial na fabricação de sucos cítricos utilizando o fruto inteiro deu origem à introdução dos FPM na dieta humana. Além disso, esses flavonóides apresentam características que despertam o interesse do estudo de sua atividade antimicrobiana.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de flavonóides lipofílicos (flavonóides polimetoxilados), isolados de cascas dos frutos de espécies do gênero *Citrus*, como agentes antifúngicos e antibacterianos visando o controle de microrganismos patogênicos do homem e de plantas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter extratos de *Citrus* spp. (*C. aurantifolia*: lima da pérsia, *C. sinensis*: laranja pêra, *C. limon*: limão tahiti e *C. reticulata*: laranja bergamota).

Purificar os flavonóides e outros compostos majoritários.

Avaliar a atividade antimicrobiana dos flavonóides isolados com o uso de métodos qualitativos.

Determinar as concentrações inibitórias mínimas dos flavonóides e outros compostos majoritários isolados com atividade antimicrobiana pelos métodos quantitativos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos Flavonóides

2.1.1. Obtenção das espécies do gênero *Citrus*

Os frutos de *Citrus aurantifolia* (lima da pérsia), *Citrus sinensis* (laranja pêra), *Citrus limon* (limão tahiti) e *Citrus reticulata* (laranja bergamota) foram adquiridos no comércio local (Florianópolis, SC), em julho de 2001. O estabelecimento tinha como fornecedor a ECOCITRUS (Cooperativa dos Citricultores Ecológicos do Caí LTDA), situado na cidade de Montenegro, RS.

2.1.2. Obtenção dos extratos epicuticulares e dos extratos em hexano

A casca das frutas foi retirada, com o auxílio de uma faca, rendendo 600 gramas para *C. aurantifolia*, 750 g para *C. sinensis*, 521 g para *C. limon* e 495 g para *C. reticulata*. Em seguida, procedeu-se a extração da cera epicuticular na tentativa de remover os hidrocarbonetos (material graxo). Para isso, as cascas de cada espécie foram colocadas separadamente em Erlenmeyer (2 litros), contendo aproximadamente 800 mL de hexano. Após 40 a 60 segundos de extração com hexano, o solvente foi separado das cascas, por filtração em algodão e evaporado a baixa pressão. O hexano recuperado foi devolvido ao Erlenmeyer com as respectivas cascas, por um período de 72 horas, para a obtenção dos extratos em hexano (Figura 5). Após esse período, o solvente foi evaporado e os extratos em hexano foram obtidos e pesados.

Os extratos em hexano de *C. aurantifolia*, *C. reticulata* e *C. limon* apresentaram um precipitado no fundo do frasco. O extrato de *C. sinensis* apresentou-se na forma de um óleo de coloração verde-clara. Assim, os extratos que apresentaram precipitados foram submetidos a sucessivas recristalizações em metanol (Figura 5).

2.1.3. Isolamento, purificação e identificação das substâncias do extrato em hexano

As substâncias obtidas por precipitação foram separadas das graxas com o uso de uma coluna de sephadex LH 20. Para isso, foi utilizada uma coluna de vidro com 50,0 cm de comprimento por 2,4 cm de diâmetro, preenchida com 71,0 g de gel de sílica, ativada com 150,0 mL de metanol. As amostras a ser purificadas foram solubilizadas em clorofórmio e transferidas para a parte superior da coluna de sílica, com auxílio de uma pipeta de Pasteur. A seguir, as amostras foram eluídas com metanol e a composição de cada fração foi monitorada com o uso de CCD. Para isso, foram utilizadas placas analíticas de gel de sílica 60f₂₅₄ em folhas de alumínio com 0,2 mm de espessura (Merck, Darmstadt, Alemanha), as quais foram eluídas com tolueno - ácido acético (4:1) e benzeno - ácido acético (4:1). Posteriormente, as placas foram reveladas em luz ultravioleta (UV) a 254 e 366nm.

As substâncias obtidas foram identificados através de técnicas espectroscópicas tais como: Infravermelho (IV), Espectrometria de Massas (EM), Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massas (CG-EM) submetida a 70 eV em espectômetro Shimadzu QP-2000 e Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ¹H e ¹³C) a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C em espectômetro JEOL Eclipse + 400, usando TMS (trimetilsilano) como padrão interno ou como sinal do solvente de referência.

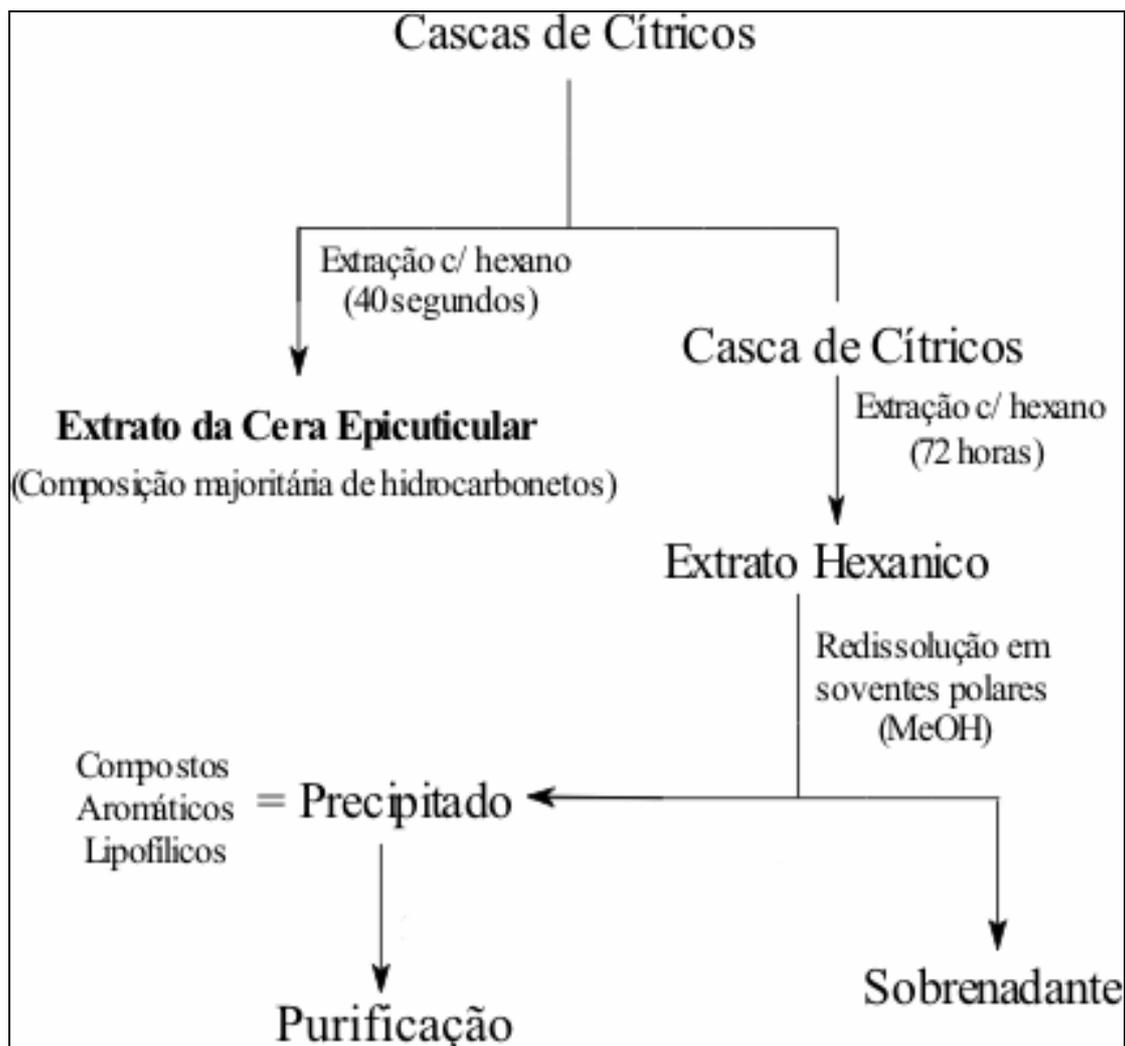


Figura 5. Metodologia usada para a obtenção de substâncias lipofílicas majoritárias de *Citrus* spp.

2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

2.2.1. Solventes usados na solubilização dos produtos naturais

Para dissolver e diluir os extratos e substâncias puras extraídas das cascas dos *Citrus* spp. foram utilizados o hexano (para os extratos) e a acetona (para as substâncias puras).

2.2.2. Corante usado para a identificação dos microrganismos e reagente usado para a revelação dos testes

Para a análise microscópica de alguns microrganismos foi utilizado o azul de algodão adicionado ao lactoglicerol. Para o preparo da solução de lactoglicerol foram usados 10 mL de ácido láctico, 20 mL de glicerina e 10 mL de água destilada. A 100 mL desta solução foi adicionado 0,1 g de azul de metila.

Para a revelação dos testes de bioautografia direta e para facilitar a leitura dos testes usados na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da quantidade inibitória mínima (QIM), foi usada uma suspensão a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ do sal de *p*-iodonitrotetrazolium Violet (INT) (Sigma), em etanol a 70%.

2.2.3. Meios de cultura

Os meios ágar batata dextrose e o ágar extrato de malte foram usados para o isolamento e manutenção das culturas fúngicas e testes da atividade antifúngica. O caldo nutriente e o ágar batata dextrose para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da quantidade inibitória mínima (QIM).

Para as bactérias, foi utilizado o meio infusão de cérebro e coração (“brain heart infusion”, BHI), para a manutenção das culturas e o preparo do inóculo. O meio ágar sangue (“Blood Agar Base” adicionado de 5% de hemáceas de sangue de carneiro) para testar a pureza das culturas. O caldo Mueller–Hinton para os testes de atividade antibacteriana.

Todos os meios de cultura utilizados foram obtidos dos laboratórios Difco.

2.2.4. Origem dos microrganismos

2.2.4.1. Bactérias

As estirpes de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 2593 foram obtidas junto à “American Type Culture Collection”, Rockville, MD, EUA e foram mantidas em meio BHI a -20°C no Laboratório de Antibióticos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC.

2.2.4.2. Fungos

O fungo causador de doenças pós-colheita *Penicillium digitatum* (Saccardo:Fries) foi cedido pelo Instituto Biológico Brasileiro. Os dermatófitos *Microsporium canis* (Bodin) e *Trichophyton mentagrophytes* (Blanchard) foram cedidos, respectivamente, pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Santa Catarina (LACEN) e Laboratório Santa Luzia, de Florianópolis, SC. Os fungos fitopatogênicos *Colletotrichum* sp. (Penz & Sacc) e *Curvularia* sp. (Boedjin) foram isolados a partir de frutos de *C. sinensis* e identificados no Laboratório de Micorrizas, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC.

2.2.5. Preparo do inóculo

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de 300 µL de cada cultura-estoque transferidos para 3 mL de caldo BHI. A incubação foi mantida por 24 h a 36° C ±1° C, sendo a pureza da cultura verificada após as primeiras 8 h de incubação em meio ágar sangue. Para os testes de bioautografia, o inóculo constituiu-se de uma suspensão de bactérias, diluída em caldo Mueller-Hinton, correspondendo a aproximadamente 10⁹ UFC.mL⁻¹ (turvação equivalente ao tubo n° 3 da escala de Mc Farland). Para a determinação da CIM e QIM, a concentração da suspensão foi ajustada com solução

fisiológica estéril (0,9% NaCl) para turvação correspondente a 10^8 UFC mL⁻¹ (tubo 0,5 da escala de Mc Farland) (SMÂNIA *et al.*, 1995; VALGAS, 2002).

Para a preparação do inóculo fúngico, um fragmento de cada cultura estoque foi inoculado em ágar extrato de malte inclinado e incubado durante sete dias a 30°C. A seguir, foram adicionados 5mL de solução fisiológica estéril sobre a cultura fúngica, a qual foi deslocada com auxílio de uma alça de Henle. A suspensão de esporos e hifas resultante foi transferida para outro tubo estéril contendo 3-4 pérolas de vidro, agitando-se em aparelho vórtex por aproximadamente 50 segundos. A partir dessa suspensão prepararam-se 4 diluições decimais da cultura que foram submetidos a dois procedimentos. No primeiro, foi determinada a absorbância em espectrofotômetro para cada diluição, utilizando-se comprimento de onda de 530 nm. No segundo, uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi transferida para meio de ágar batata visando determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC.mL⁻¹). As culturas foram incubadas durante 72 h a 30°C e, após, as colônias foram contadas com o auxílio de uma lupa. Os resultados de densidade óptica foram correlacionados com o número de colônias, obtendo-se, assim, um gráfico de curva de crescimento correspondente a cada fungo (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 1995, 1997).

Para os testes antifúngicos, o inóculo constou de uma suspensão fúngica como a anteriormente descrita, na qual foi lida a absorbância e esta, foi então, correlacionada ao gráfico correspondente. O ajuste da turvação do inóculo foi realizado com caldo nutriente de modo a obter-se $0.5-5 \times 10^4$ esporos.mL⁻¹ (KOBAYASHI *et al.*, 1996) nos teste de bioautografia e com solução fisiológica estéril (0,9%) para $0,2-1 \times 10^5$ esporos.mL⁻¹ nos de microdiluição (TUDELA, 1997).

2.2.6. Método de bioautografia direta

Os extratos e as substâncias foram dissolvidos ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em hexano e acetona, respectivamente, e alíquotas de $50 \mu\text{L}$ foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) (placas de gel de sílica 60F₂₅₄; Merck, Darmstadt, Alemanha). Entre os pontos de aplicação das substâncias e/ou da margem da placa de CCD foi mantida a distância mínima de 2,5 cm. Como amostra referência, foram aplicados $50 \mu\text{L}$ do antibiótico tetraciclina a $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as bactérias e $50 \mu\text{L}$ de anfotericina-B a $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para os fungos. Para o teste de toxidez, foi aplicado somente o solvente ($50 \mu\text{L}$). Após a aplicação dos produtos a ser testados, as placas de CCD foram mergulhadas por duas vezes consecutivas, por período de 5 min, no inóculo fúngico ou bacteriano preparado conforme descrito anteriormente. O excesso da suspensão de microrganismo foi absorvido em papel de filtro e as placas de CCD foram colocadas dentro de placas de Petri estéreis. Os sistemas assim montados foram acondicionados em caixas plásticas contendo um Becher com algodão embebido em água destilada. As caixas foram vedadas hermeticamente, sendo aquelas com sistemas para teste de atividade antibacterina mantidas a 36°C durante 24 h. As placas contendo sistemas para atividade antifúngica foram mantidas a 30°C por 72 h. Para facilitar a leitura, após a incubação, as placas de CCD foram borrifadas com solução de INT e incubadas novamente por 4 h a 36°C . Os experimentos foram conduzidos em duplicata. O diâmetro dos halos de inibição foi medido e os resultados expressos, como média de duas repetições, em milímetros.

2.2.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Quantidade Inibitória Mínima (QIM)

A CMI e QIM foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo. Para os extratos foi empregada a QIM e para as substâncias a CIM. Como organismos-teste foram usados aqueles que formaram halo de inibição no método de bioautografia direta.

De início, os extratos e substâncias puras foram dissolvidos em 200 μ L de hexano ou acetona, respectivamente, sendo, após, adicionados a 1800 μ L de caldo Mueller–Hinton para as bactérias e caldo nutriente para os fungos, posteriormente foram feitas diluições seriadas dos produtos naturais usando-se como diluente o próprio caldo de cultivo, mantido o volume constante de 1000 μ L em cada tubo, que recebeu 1000 μ L de ágar batata dextrose para testes com fungos ou ágar Mueller-Hinton para testes com bactérias. Assim, as substâncias foram testadas em oito concentrações que variaram de 1000 a 8 μ g.mL⁻¹. De cada diluição, alíquotas de 200 μ L foram distribuídas em orifícios de placa de microdiluição. Como controle de crescimento e de esterilidade foi usado somente meio de cultura sem a adição do extrato e solvente. Como controle de toxidez do solvente foi usado o meio de cultura juntamente com o solvente. Como controles positivos foram usados o meio de cultura adicionado a tetraciclina, para as bactérias, e o meio de cultura adicionado a fluconazol, para os fungos. As concentrações usadas dos antibióticos de referência variaram de 10 a 0,08 μ g.mL⁻¹. Após a montagem das placas, cada orifício teste e controle de crescimento recebeu 5 μ L do inóculo microbiano, correspondendo, no local da aplicação, a 10⁸ UFC.mL⁻¹ para as bactérias e 0,2-1 X 10⁵.UFC.mL⁻¹ para os fungos. As placas foram incubadas por 24 horas a 36 \pm 1C para as

bactérias e reveladas com INT. Os fungos foram incubados durante 72 horas a 30-35? C (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2001).

As CIMs e as QIMs foram consideradas como a menor concentração do produto natural que inibiu o crescimento do microrganismo, após a incubação e foram expressas em ?g.mL⁻¹.

3. RESULTADOS

Os extratos epicuticular e hexânico da casca de *Citrus* spp., obtidos através da técnica desenvolvida no presente estudo, resultaram na produção de quantidades variáveis, como pode ser observado na tabela 1.

Tabela 1. Quantidades de extratos epicuticular e hexânico obtidas das diferentes espécies de *Citrus*.

Espécies	Quantidade de extrato (mg)	
	Epicuticular	Hexânico
<i>C. aurantifolia</i>	113	958
<i>C. sinensis</i> *	245	3240
<i>C. limon</i>	406	979
<i>C. reticulata</i>	178	213

* Extrato em estado oleoso

No extrato hexânico de *C. reticulata*, *C. aurantifolia* e *C. limon* observou-se a formação de precipitado após a redissolução em metanol, sendo esse de coloração amarela nos dois primeiros extratos e branca no de *C. limon*. Os precipitados foram separados do sobrenadante e pesados resultando nas quantidades de 178, 278 e 899 mg, respectivamente.

Para o monitoramento por CCD do precipitado de *C. limon*, utilizou-se benzeno:ácido acético (4:1), em vez de tolueno:ácido acético que foi usado nas outras espécies, a fim de comparar a composição destes com informações da literatura (TATUM & BERRY, 1977). Assim, pela análise do perfil cromatográfico (Tabela 2), foi observada uma banda com características cromatográficas (R_f 0,30) semelhantes às descritas para o composto 6,7-dimetoxi-cumarina (TATUM & BERRY, 1977). Além desta, foram encontradas outras duas bandas com R_f de 0,70 e 0,65. Através da

comparação entre os cromatogramas do precipitado, do extrato hexânico e do extrato da cera epicuticular, pode-se verificar a presença de compostos distintos na composição dos mesmos.

Tabela 2.- Perfil cromatográfico dos extratos e precipitados de *C. limon*.

<i>C. limon</i>	Extrato epicuticular	Extrato hexânico	Precipitado
R_f	0,96	0,83	0,70
	0,93	0,78	0,65
	0,84	0,71	0,30
	0,54	0,44	
Coloração	azul	azul	Azul
	azul	azul	azul
	azul	azul	azul
	azul		

^a Análise do R_f e coloração em placas de CCD (fase móvel benzeno:ácido acético (4:1)).

Em *C. aurantifolia* (Tabela 3), observou-se a presença de três bandas distintas no precipitado, e no extrato hexânico foram visualizadas duas bandas com R_f diferentes das encontradas no precipitado (0,76 e 0,69). No extrato epicuticular observou-se apenas uma banda de R_f 0,60, aproximado ao R_f do precipitado (de R_f 0,61), embora com diferente coloração.

No caso de *C. reticulata*, foram observadas duas bandas de R_f de 0,36 e 0,50 na CCD do precipitado. No extrato hexânico, foram encontradas duas bandas com características diferentes das encontrados no precipitado. No extrato da cera epicuticular, também foram observadas duas bandas, sendo que uma destas possui características iguais ao precipitado (R_f 0,50).

Através da observação do cromatograma em CCD do extrato epicuticular de *C. sinensis* (Tabela 3) foram visualizadas três manchas, com R_f que variaram de 0,44 a

0,51, sendo que 0,51 apresentou R_f e coloração semelhante à banda (0,50) encontrada no precipitado e no extrato epicuticular de *C. reticulata*. No extrato hexânico também aparecem manchas com coloração e localização similares às encontradas em *C. reticulata*, no mesmo tipo de extrato.

Tabela 3- Perfil cromatográfico^a dos extratos e precipitados das diferentes espécies de *Citrus* estudadas.

Extratos	<i>C. aurantifolia</i>		<i>C. reticulata</i>		<i>C. sinensis</i>	
	R_f	Coloração	R_f	Coloração	R_f	Coloração
Extrato epicuticular	0,60	Roxa	0,50	azul claro	0,51	azul claro
			0,43	azul	0,48	azul
					0,44	azul
Extrato hexânico	0,76	roxa	0,64	azul claro	0,69	azul claro
	0,69	verde	0,60	azul	0,64	azul
					0,60	
Precipitado	0,65	roxa	0,50	azul claro	Nd ^b	Nd ^b
	0,61	verde	0,36	azul		
	0,58	verde				

^a Análise do R_f e coloração em placas de CCD (fase móvel tolueno:ácido acético, 4:1);

Nd= não detectado

Os compostos obtidos dos precipitados (Tabela 4), foram identificados através de métodos espectroscópicos (UV, RMN e CG-EM) (JOHANN *et al.*, *in litt.*), como sendo uma cumarina, duas flavonas e dois flavonóis polimetoxilados. A substância isolada de *C. limon* foi identificada como a cumarina 6,7-dimetoxi-cumarina, também conhecida como escoparona (AFEX, SZTEINBERG, CARMEL, 1985), confirmando assim, a análise do perfil cromatográfico para esta espécie. As flavonas, 5,6,7,8,4'-pentametoxi-flavona, conhecida por tangeritina e 5,6,7,8,3',4'-hexametoxi-flavona também chamada de nobiletina (CHEN; MONTANARI, WIDMER, 1997) foram obtidas de *C. reticulata*, em mistura. Os novos flavonóis polimetoxilados, 8-hidroxi-

3,5,6,7,4'-pentametoxi-flavona e 8-hidroxi-3,5,6,7,3',4'-hexametoxi-flavona foram obtidos de *C. aurantifolia*, também em mistura (Figura 6).

Tabela 4. Compostos isolados de espécies de *Citrus*.

Espécies	Compostos isolados
<i>C. limon</i>	6,7-dimetoxi-cumarina
<i>C. reticulata</i>	5,6,7,8,4'-pentametoxi-flavona, 5,6,7,8,3',4'-hexametoxi-flavona
<i>C. aurantifolia</i>	8-hidroxi-3,5,6,7,4'-pentametoxi-flavona 8-hidroxi-3,5,6,7,3',4'-hexametoxi-flavona

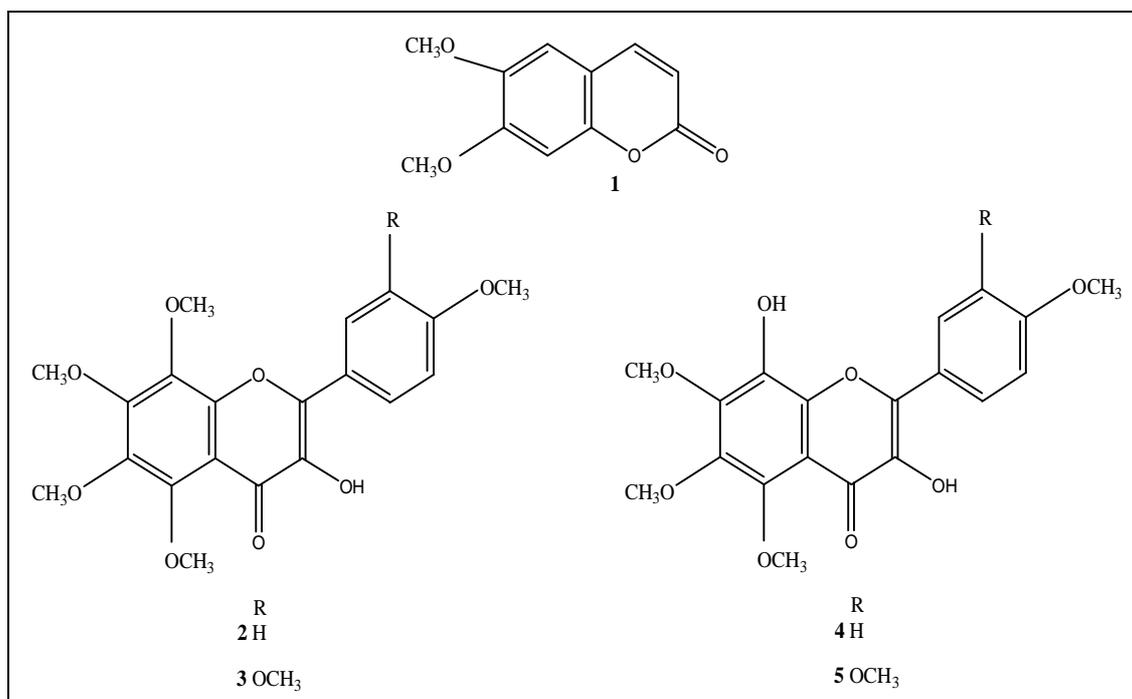


Figura 6. Estrutura dos compostos identificados nos precipitados de

C. limon (1); *C. reticulata* (2 e 3) e *C. aurantifolia* (4 e 5).

3. 2. Identificação dos fungos *Curvularia* sp. e *Colletotrichum*

sp.

Para o teste da atividade antimicrobiana, duas espécies de fungos foram isoladas de *C. sinensis* e identificados como: *Curvularia* sp. e *Colletotrichum* sp. Na identificação foram analisadas as características macro e microscópicas.

O fungo *Curvularia* sp. pertence à classe dos Deuteromycetes. Pela análise das suas características microscópicas, notou-se a presença de hifas septadas (Figura 7-a) de cor marrom e conídios bem visíveis (Figura 7-b), também chamados de proconídios. Esses conídios apresentaram formato fusiforme, com tamanho variando de 8-14 μ m x 21-35 μ m, tipicamente curvados, septados, além de exibir uma protuberância basal chamada de hila. Os septos eram transversos e dividiam cada conídio em múltiplas partes. O centro da célula era tipicamente mais escuro e alargado comparado com as outras partes (GUARRO *et al.*, 1999).

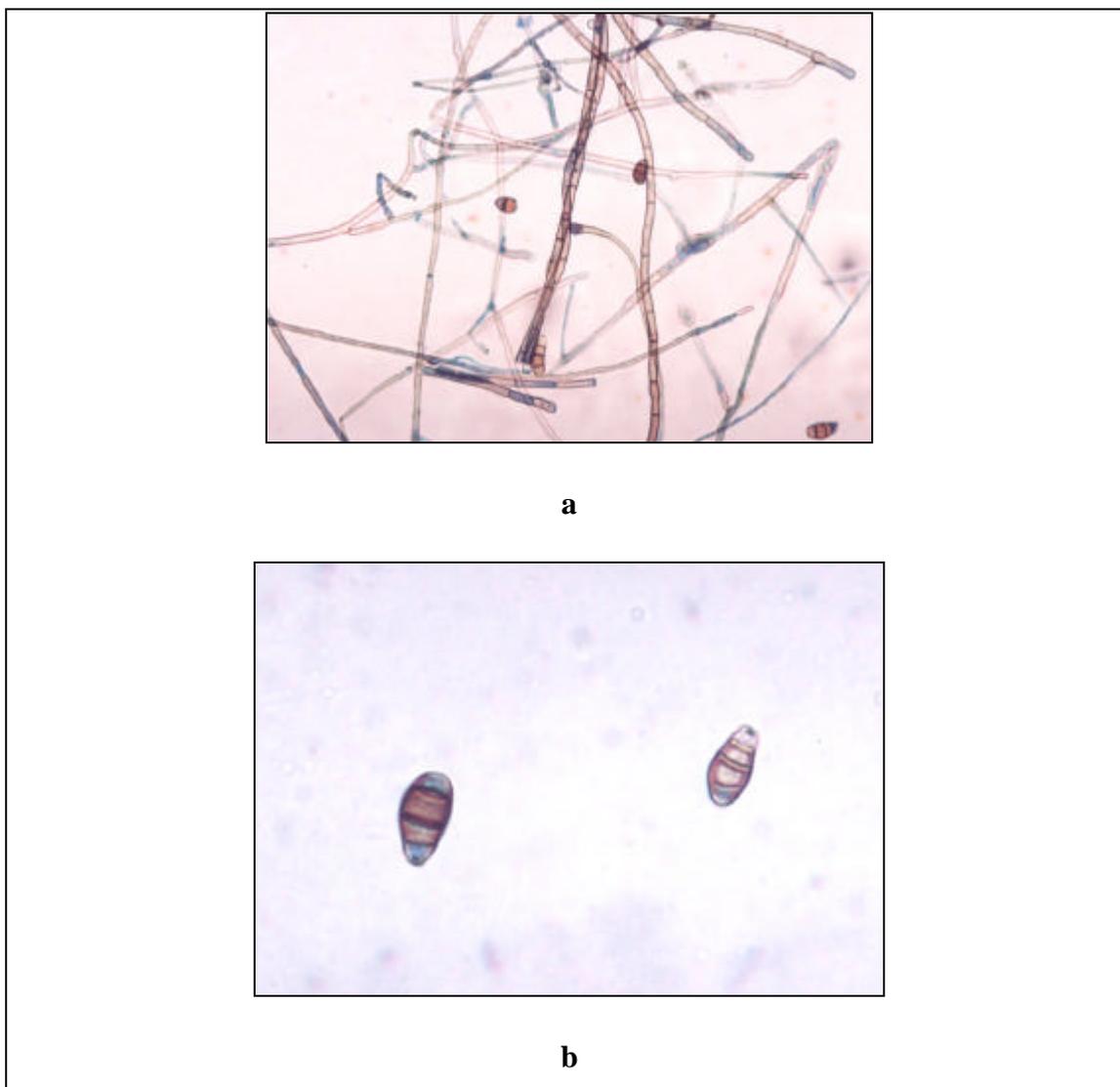


Figura 7. Fotomicrografias de *Curvularia* sp.: (a) hifas septadas e conídios (Aumento 250 x); (b) conídios.(Aumento 530 X) (poroconídios) de formato fusiforme e septos transversos. Corados com azul de algodão ao lactoglicerol

Quanto às características do crescimento em BDA, *Curvularia* sp. apresentou colônias de aspecto lanoso e de cor verde oliva na parte superior, e marrom escura ou preta na parte na inferior. Esse fungo alcançou 8,5 cm de diâmetro após sete dias de crescimento em BDA.

As características macroscópicas encontradas, como: número de septos, forma (curvado ou reto) e coloração dos conídios (escura ou marrom clara) e existência de septo escuro no centro sugerem que a espécie isolada poderá corresponder a *Curvularia lunata* (LARONE, 1995).

O gênero *Colletotrichum* faz parte da classe dos Deuteromycetes, os quais são fungos que na forma assexuada produzem esporos em acérvulos (conidiomatas). Essas estruturas são esféricas ou em forma de taça, com células conidiógenas que revestem a cavidade interna e formam uma barreira na superfície do conidiomata. Os conídios são produzidos abundantemente e puderam ser facilmente visualizados em microscópio óptico (Figura 8). Esses esporos se caracterizam pela ausência de cor, forma ovóide a cilíndrica e asseptados. Apesar de os conídios serem incolores quando observados separadamente, eles apresentam cor laranja quando reunidos em grandes quantidades (GUARRO *et al.*, 1998).

As colônias obtidas em BDA apresentaram coloração laranja e textura aveludada, com coloração acinzentada no reverso da placa. Esse fungo teve um crescimento em 7 dias ocupando toda a superfície da placa de Petri contendo o meio de cultura ágar batata dextrose.

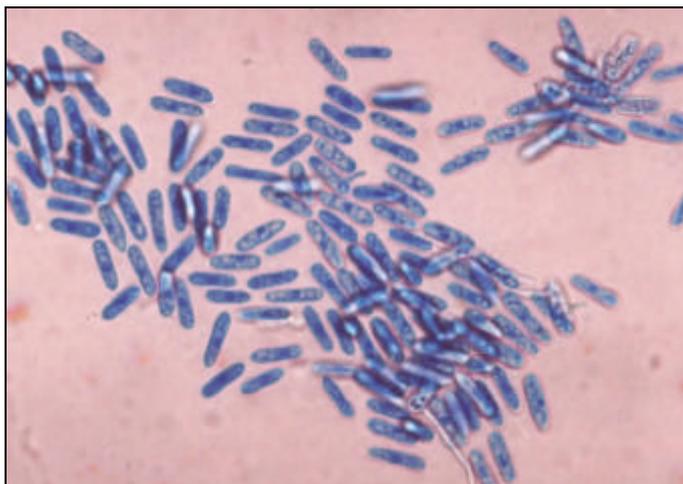


Figura 8. Conídios de *Colletotrichum* sp., corados com azul de algodão e lactoglicerol (Aumento 530 X)

3.3. Atividade antimicrobiana dos extratos e compostos isolados de *Citrus* spp.

Para os testes de atividade antimicrobiana, a densidade dos esporos no inóculo dos fungos foi avaliado pela leitura da absorbância utilizando-se os gráficos referentes às curvas de crescimento (Figuras 9 a 13) (ESPINEL-INGROFF *et al.*, (1997).

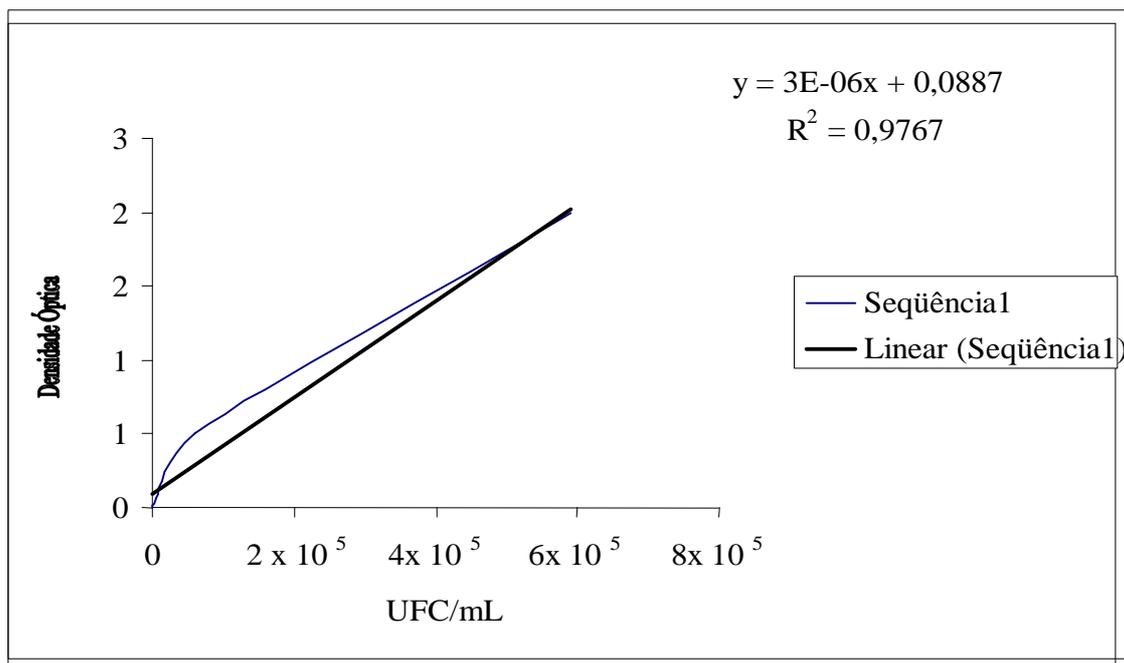
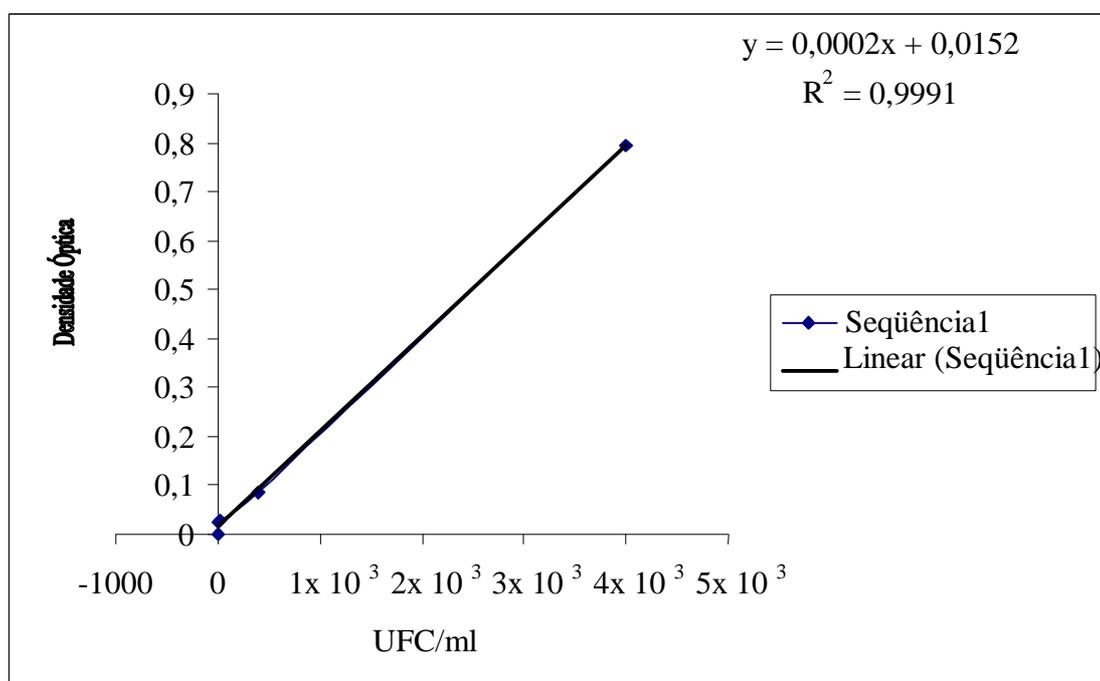
Figura 9. Curva de crescimento do fungo patogênico *Colletotrichum* sp.Figura 10. Curva de crescimento do fungo patogênico *Curvularia* sp.

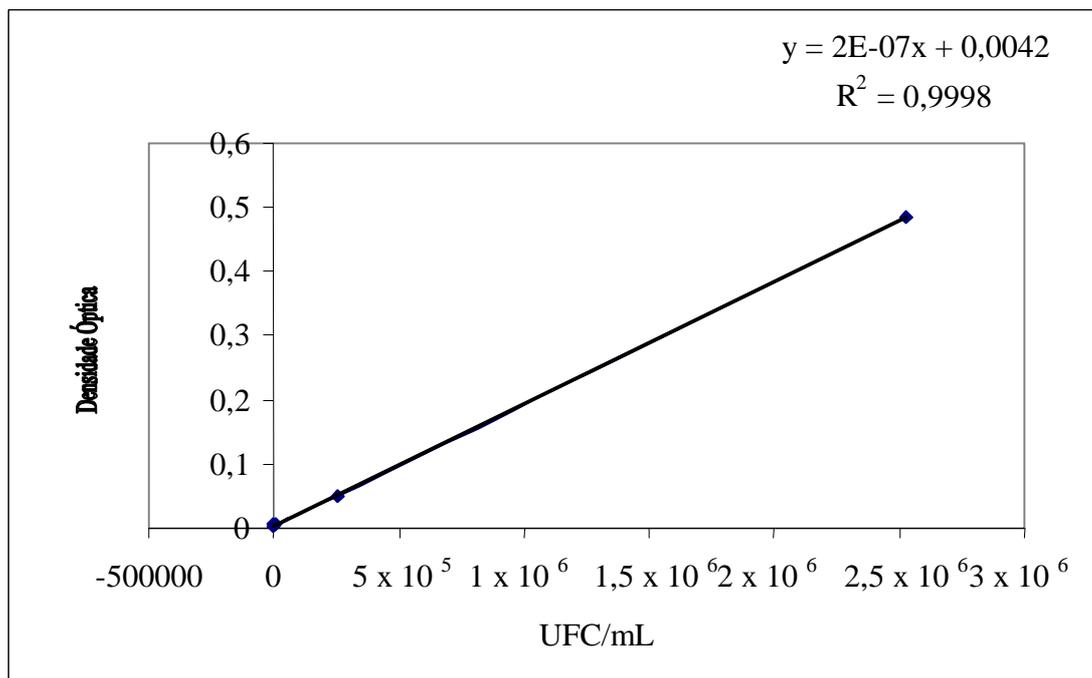
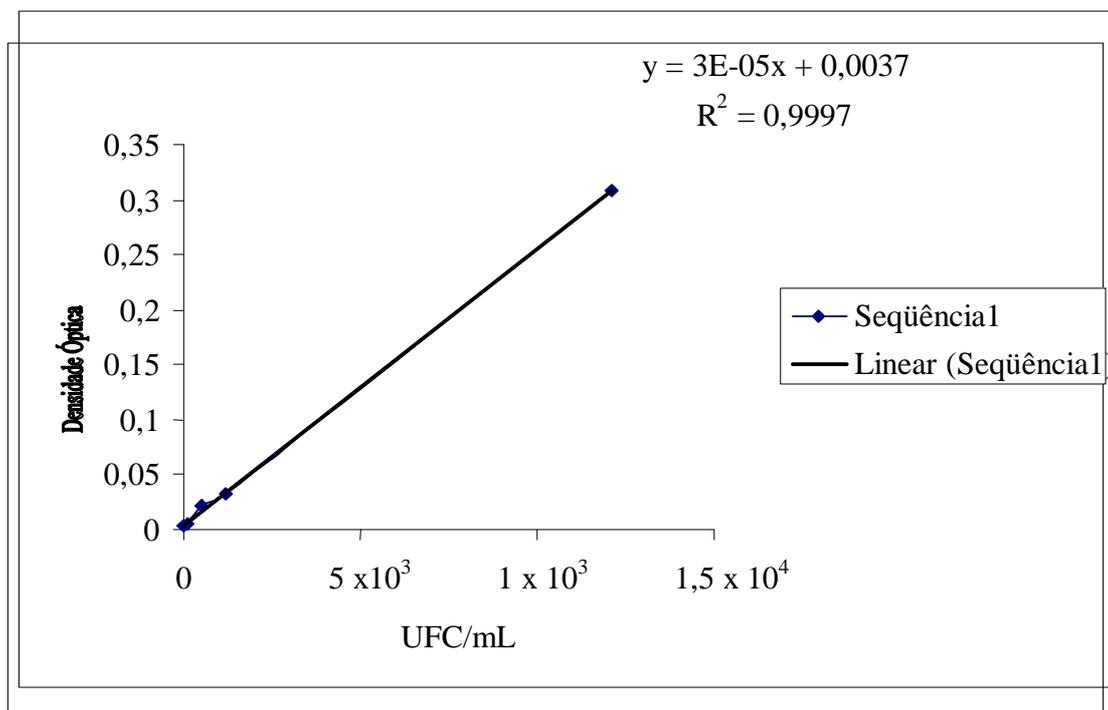
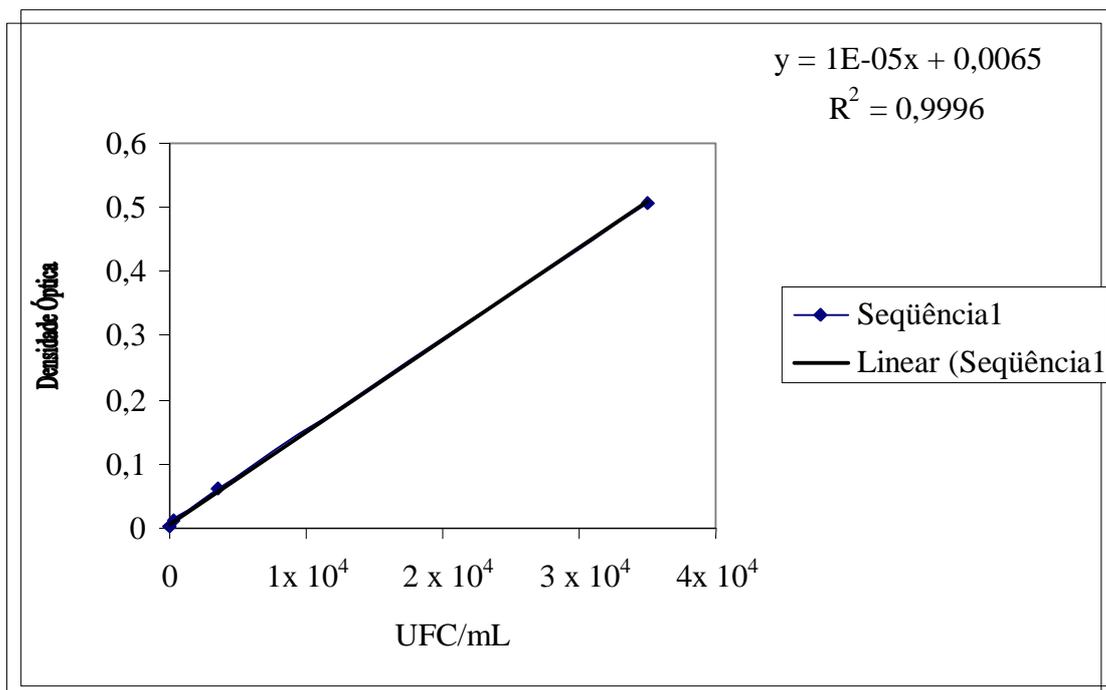
Figura 11. Curva de calibração do fungo dermatófito *Trichophyton mentagrophytes*.Figura 11. Curva de calibração do fungo dermatófito *Microsporium canis*.

Figura 13. Curva de calibração do fungo fitopatogênico *Penicillium digitatum*

Pelo método da bioautografia direta, foi observado que todos os compostos e extratos obtidos de *Citrus* spp. inibiram o crescimento dos microrganismos testados, proporcionando um halo de inibição de pelo menos 6 mm (Tabelas 5 a 10). Posteriormente, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e quantidades inibitórias mínimas (QIM) com os compostos e extratos.

Para facilitar a leitura dos testes bioautográficos diretos, nos quais foram utilizados bactérias e fungos dermatófitos como microrganismos-teste, o crescimento microbiano foi revelado com INT (Figura 14). Entretanto, nos testes em que foram usados fungos fitopatogênicos, não foi necessário a revelação da placa, uma vez que as regiões de crescimento miceliano foram bem distintas daquelas onde ocorreu a formação de halo de inibição (Figura 15).

Tabela 5. Atividade antifúngica de extratos^a da cera epicuticular de diferentes espécies de *Citrus*, pelo método biautográfico direto.

Microrganismos	Halo de inibição (mm)			
	<i>C. limon</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. sinensis</i>
<i>T. mentagrophytes</i>	12	12	6	12
<i>Curvularia</i> sp.	12	12	6	10
<i>Colletotrichum</i> sp.	15	18	10	12
<i>M. canis</i>	10	12	10	12
<i>P. digitatum</i>	12	12	10	12

^aNos testes foram usados 10 mg.mL⁻¹ de cada extrato

Tabela 6. Atividade antifúngica de extratos^a hexânicos de diferentes espécies de *Citrus* pelo método biautográfico direto.

Microrganismos	Halo de inibição(mm)			
	<i>C. limon</i>	<i>C. reticulata</i>	<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. sinensis</i>
<i>T. mentagrophytes</i>	10	15	6	12
<i>Curvularia</i> sp.	18	18	12	12
<i>Colletotrichum</i> sp.	6	12	12	10
<i>M. canis</i>	12	12	6	6
<i>P. digitatum</i>	12	12	10	12

^aNos testes foram usados 10 mg.mL⁻¹ de cada extrato

Tabela 7. Atividade antifúngica de substâncias^a extraídas de diferentes espécies de *Citrus*.

Microrganismos	Halo de inibição (mm)			
	Cumarina	2,3-Flavonas	4,5- Flavonas	Anfotericina B
<i>T. mentagrophytes</i>	6	15	10	30
<i>Curvularia</i> sp.	18	18	12	18
<i>Colletotrichum</i> sp.	18	18	18	18
<i>M. canis</i>	12	12	18	24
<i>P. digitatum</i>	18	15	15	12

^aNos testes foram usados 10 mg.mL⁻¹ de cada extrato

^bCumarina, 6,7-dimetoxi-cumarina; 2,3-Flavonas, 5,6,7,8,4'-pentametoxi-flavona e 5,6,7,8,3',4'-hexametoxi-flavona e 4, 5-Flavonas, 8-hidroxi-3,5,6,7,4'-pentametoxi-flavona e 8-hidroxi-3,5,6,7,3',4'-hexametoxi-flavona.

Tabela 8. Atividade antibacteriana de extratos^a da cera epicuticular de diferentes espécies de *Citrus*, pelo método biautomático direto.

Espécies	Halo de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>C. limon</i>	12	18
<i>C. reticulata</i>	15	24
<i>C. aurantifolia</i>	10	12
<i>C. sinensis</i>	12	20

^aNos testes foram usados 10 mg.mL⁻¹ de cada extrato

Tabela 9. Atividade antibacteriana de extratos^a hexânicos de diferentes espécies de *Citrus* pelo método bioautográfico direto.

Espécies	Halo de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>C. limon</i>	18 ^b	18
<i>C. reticulata</i>	18	20
<i>C. aurantifolia</i>	15	15
<i>C. sinensis</i>	18	18

^aForam usados 10 mg.mL⁻¹ de cada extrato

Tabela 10. Atividade antibacteriana de substâncias^a isoladas de diferentes espécies de *Citrus* pelo método bioautográfico direto.

Substâncias ^b	Halo de inibição (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Cumarina	24 ^b	20
2, 3-Flavonas	20	18
4, 5-Flavonóis	12	12
Tetraciclina	30	30

^aForam usados 10 mg.mL⁻¹ de cada extrato

^bCumarina, 6,7-dimetoxi-cumarina; 2,3-Flavonas, 5,6,7,8,4'-pentametoxi-flavona e 5,6,7,8,3',4'-hexametoxi-flavona e 4, 5-Flavonas, 8-hidroxi-3,5,6,7,4'-pentametoxi-flavona e 8-hidroxi-3,5,6,7,3',4'-hexametoxi-flavona

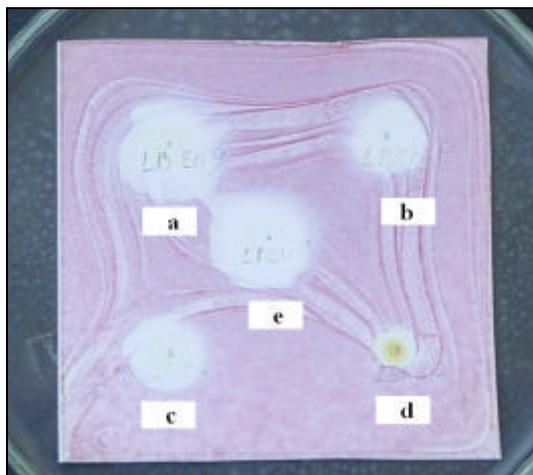


Figura 14. Teste de bioautografia direta após a revelação com INT contra a bactéria *S. aureus*, sendo (a) flavonas (2,3) (b) extrato hexânico de *C. sinensis*, (c) extrato epicuticular de *C. limon*, (d) extrato epicuticular de *C. aurantifolia* (e) 6,7-dimetoxi-cumarina.

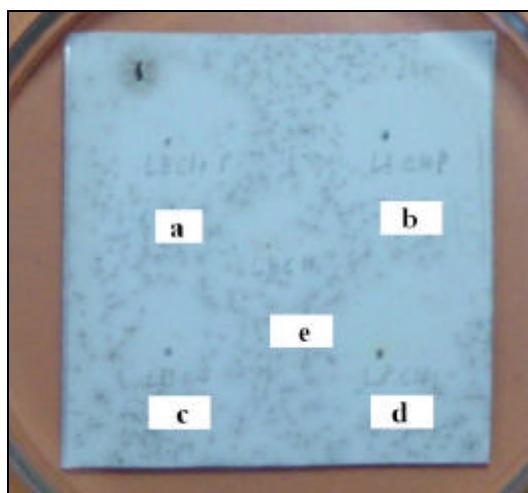


Figura 15. Teste de bioautografia direta contra o fungo *Curvularia* sp., sem a utilização do revelador INT, sendo (a) flavonas (2, 3), (b) 6,7-dimetoxi-cumarina, (c) extrato epicuticular de *C. reticulata*, (d) extrato hexânico de *C. sinensis* e (e) extrato epicuticular de *C. aurantifolia*.

O efeito da tetraciclina sobre *S. aureus* e *E. coli* foi semelhante aos obtidos para as cepas-refêrencia, nos testes de difusão (TRAUB & LEONHARD, 1995). Da mesma forma, o efeito da anfotericina B sobre *P. digitatum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *Colletotrichum* sp. e *Curvularia* sp. concordam com os resultados descritos na literatura (MCGINNIS & PASARELL, 1998; NOSTRO *et al.*, 2000; WEDGE & NAGLE, 2000).

3.3.2. Concentração Inibitória Mínima e Quantidade Inibitória Mínima das substâncias e extratos de *Citrus* spp.

Os resultados referentes à determinação da quantidade inibitória mínima (QIM), dos extratos das plantas cítricas, estão apresentados nas tabelas 11 e 12. Aqueles referentes às concentrações inibitórias mínimas (CIM) são apresentados na tabela 13.

Em ambos os testes de atividade antimicrobiana, foram utilizados dois controles positivos, tetraciclina para as bactérias e fluconazol para os fungos (Figura 16). Os resultados obtidos com o uso da tetraciclina corroboram com os dados citados na literatura (LENNETTE *et al.*, 1980). Entretanto, com relação ao uso do fluconazol as concentrações inibitórias obtidas no presente estudo, são cerca de dez vezes menores que a descrita na literatura (TUDELA, 1997).

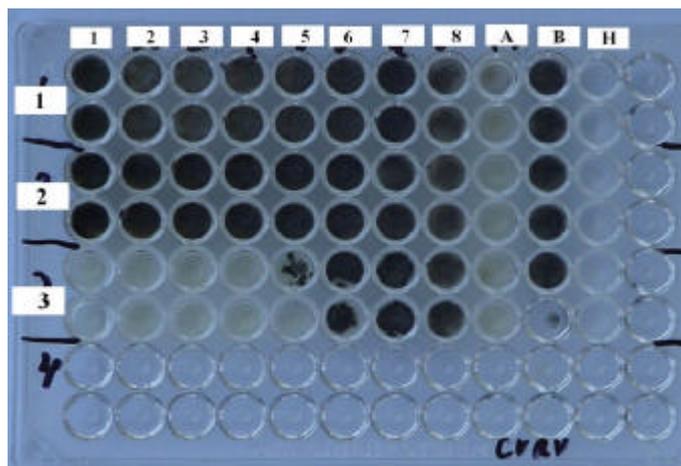


Figura 16. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de flavonas (1), flavonóis (2) e do antifúngico fluconazol (3) contra *Curvularia* sp., pela técnica da microdiluição em placa e sem a utilização do revelador de crescimento violeta p -iodonitrotetrazólio, sendo 1-8 as diluições das substâncias. A, controle de esterilidade, B, controle de crescimento e H água destilada.

Tabela 11. Quantidade Inibitória Mínima (QIM) do extrato da cera epicuticular de *Citrus* spp. contra bactérias e fungos

Microrganismos	Quantidade de extrato ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	<i>C. limon</i>	<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>C. reticulata</i>
<i>S. aureus</i>	1000	i	i	1000
<i>E. coli</i>	500	i	I	1000
<i>T. mentagrophytes</i>	1000	1000	500	500
<i>M. canis</i>	1000	1000	500	500
<i>Curvularia</i> sp.	i	i	I	I
<i>Colletotrichum</i> sp.	i	1000	I	i
<i>P. digitatum</i>	i	500	I	i

i- composto não ativo até a maior concentração usada nos testes ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 12. Quantidade Inibitória Mínima (QIM) do extrato hexânico de *Citrus* spp. contra bactérias e fungos

Microrganismo	Quantidade de extrato ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	<i>C. limon</i>	<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. sinensis</i>	<i>C. reticulata</i>
<i>S. aureus</i>	1000	1000	500	1000
<i>E. coli</i>	1000	1000	1000	1000
<i>T. mentagrophytes</i>	500	500	500	500
<i>M. canis</i>	250	1000	500	500
<i>Curvularia</i> sp.	1000	i	I	i
<i>Colletotrichum</i> sp.	1000	i	I	i
<i>P. digitatum</i>	500	500	1000	I

i- composto não ativo até a maior concentração usada nos testes ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Tabela 13. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos obtidos de *Citrus* spp. e dos antimicrobianos de referência contra bactérias e fungos.

Microrganismo	Concentração dos compostos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				
	1- Cumarina	2,3- Flavonas	4,5- Flavonóis	Tetraciclina	Fluconazol
<i>S. aureus</i>	500	500	500	0,15	-
<i>E. coli</i>	1000	500	i	0,6	-
<i>T. mentagrophytes</i>	250	500	500	-	0,6
<i>M. canis</i>	250	500	i	-	1,25
<i>Curvularia</i> sp	1000	I	i	-	1,25
<i>Colletotrichum</i> sp	I	I	i	-	0,6
<i>P. digitatum</i>	500	I	1000	-	0,6

1- cumarina isolada de *C. limon*, 2,3- flavonas isoladas de *C. reticulata*, e 4,5-flavonóis de *C. aurantifolia*.

i- composto não ativo até a maior concentração usada nos testes ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Na CIM e QIM só foi necessária a revelação das placas com os testes onde se usaram bactérias, por ser possível observar o micélio dos fungos sem a utilização do

revelador. Isto é apresentado nas figuras 17 e 18, onde observa-se a QIM de extratos da cera epicuticular de *Citrus* spp. contra o crescimento do fungo fitopatogênico *Curvularia* sp. (Figura 17), e a CIM das substâncias isoladas de *Citrus* spp. contra a bactéria *S. aureus* (Figura 18), com a utilização do revelador INT.

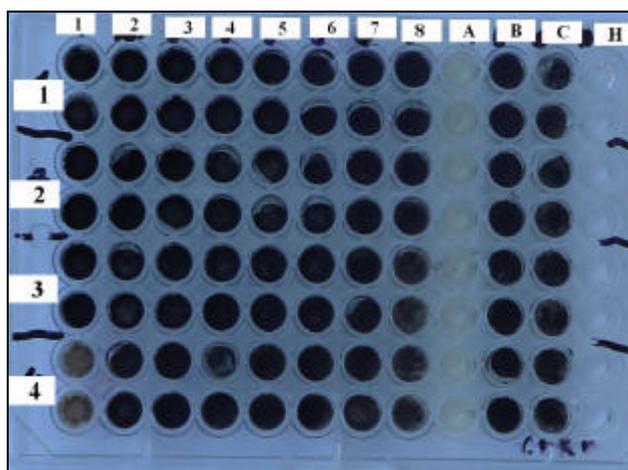


Figura 17. Quantidade Inibitória Mínima (QIM) dos extratos da cera epicuticular de *C. limon* (1), *C. aurantifolia* (2) *C. reticulata* (3) e *C. sinensis* (4), contra *Curvularia* sp., sendo 1-8 as diluições das substâncias. A, controle de esterelidade, B, controle de crescimento, C, controle de toxidez e H água destilada.

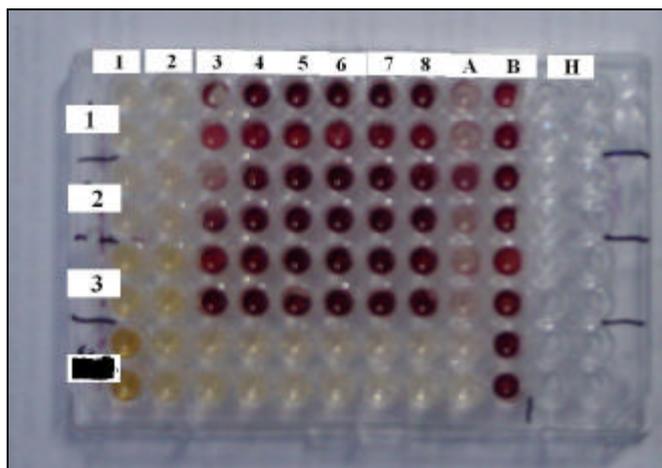


Figura 18. Concentração Inibitória Mínima dos compostos: Cumarina (1), 2,3-Flavonas (2), 4,5-Flavonois (3) contra a bactéria *S. aureus* com a utilização de violeta p -iodonitrotetrazólio, sendo 1-8 as diluições das substâncias. A, controle de esterelidade, B, controle de crescimento e H água destilada.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram utilizadas as cascas das frutas cítricas para o isolamento dos flavonóides polimetoxilados (FPMs). Os FPMs possuem uma alta solubilidade em lipídios e uma baixa solubilidade em água, tendendo a ocorrer principalmente na superfície do fruto. Essa localização também foi confirmada por outros autores (ROBBARDS & ANTALOVICH, 1997; ORTUÑO *et al.* 1999; GORINSTEIN *et al.*, 2001). Para a obtenção dos FPMs, utilizou-se uma metodologia rápida, eficiente e de fácil aplicação. Após a extração com hexano, os compostos foram obtidos por cristalização com o uso de metanol. Esse procedimento foi primeiramente descrito por BRANCO *et al.* (2001) para obter flavonóis C-alquilados de *Vellozia* sp.

Para a extração foi utilizado somente o solvente hexano, uma vez que o objetivo deste estudo foi isolar os compostos polimetoxilados de natureza lipofílica, ou seja, solúveis em solventes apolares como o hexano. A composição desses compostos foi comparada por CCD (Tabelas 2 e 3). Em estudos semelhantes, outros autores utilizaram metodologias mais custosas e demoradas como: várias extrações em solventes de diferentes polaridades (MACHIDA & OSAWA, 1989; YAO-LAN *et al.*, 2002) e uso de HPLC, (AFEX *et al.*, 1986; MIZUNO *et al.*, 1991; ORTUÑO *et al.*, 1999). A recristalização em metanol também já foi empregada, como é o caso do isolamento de flavonóides das flores de *Trollius chinensis* (YAO-LAN *et al.*, 2002). Como a metodologia usada no presente estudo diferiu, em parte, daquelas empregadas por outros autores para a obtenção de metabólitos de *Citrus*, compreende-se que as substâncias isoladas diferem, em parte, daquelas descritas na literatura. A exemplo do observado na tabela 4, onde os PMFs não foram isolados de *C. limon*. No entanto,

BALDI *et al.* (1995), estudando frutos desta mesma espécie, isolaram a limocitrina, que é um FPM, ainda isolaram outros flavonóis (limocitrol, isolimocitrol e rutina), flavonas glicosiladas (diosmetina-7-rutinosidade) e flavononas (hesperedina, eriocitrina, naringenina-7-rutinosidase) a partir do extrato em acetato de etila. Do extrato em clorofórmio, foram isolados diversos derivados de triterpenos (limonóides). Concordando com este estudo, do extrato em éter de petróleo, que é o que mais se assemelha ao hexano por sua característica apolar, esses autores isolaram várias cumarinas. AFEX *et al.* (1985) também extraíram 6,7-dimetoxi-cumarina da casca de *C. limon*, além de isolar esse composto de outras espécies de *Citrus*, como: *C. aurantium*, *C. paradise* e *C. sinensis*, utilizando para a extração, acetato de etila e água e eluindo em uma coluna de sílica gel-H com porcentagem crescente de acetato de etila e petróleo.

Os compostos 5,6,7,8,4'-pentametoxiflavona e 5,6,7,8,3',4'-hexametoxiflavona (Figura 6), isolados da casca de *C. reticulata*, também foram encontrados em *C. hassaku* (CHEN *et al.* 1997; MACHIDA & OSAWA, 1989).

De *C. aurantifolia* foram obtidos dois novos flavonóis: 8-hidroxi-3,5,6,7,4'-pentametoxi-flavona e 8-hidroxi-3,5,6,7,3',4'-hexametoxi-flavona (Figura 6). A hidroxila no anel aromático A é o que torna esses compostos inéditos. Outros autores encontraram, ainda, nos frutos dessa espécie, compostos como cumarina (furanocumarina), alcalóides e taninos (JIWAJINDA, SANTISOPASRI, OHIGASHI, 2000; EGWIM *et al.*, 2002).

Através do perfil cromatográfico com o uso de cromatografia líquida de fase reversa aplicada ao suco de *C. sinensis*, foi observada a presença de compostos fenólicos, particularmente ácido ferúlico. Além desses compostos, foram confirmadas a

presença de ácido cinâmico, rutina, narirutina, hesperidina e várias flavonas polimetoxiladas (SWATSITANG *et al.*, 2000). A presença desses compostos no suco de citros pode ser atribuída ao processo de extração. Quando é usado um processo mais rigoroso, esse pode contribuir para a presença de componentes do flavedo, principalmente nos frutos muito maduros que estão mais frágeis e sujeitos a danos (ROBARDS *et al.*, 1997). MOULY *et al.* (1999) isolaram do suco de laranjas comerciais vários PMFs, como a sinetina, a hexametoxiflavona, a nobiletina, a heptametoxiflavona, a tetra-*O*-metil escutelareína e a tangeritina. Foi confirmado que esses flavonóides se encontravam no pericarpo do fruto e que, provavelmente, sua quantidade no suco depende do processo de extração utilizado. Nesse estudo, os autores citam que em suco obtido por um processo envolvendo baixa pressão, foram encontrados somente 0,33 mg.mL⁻¹ de PMF, contra 2.8 a 10.8 mg.mL⁻¹ do suco industrializado e extraído sob elevada pressão.

Além da casca dos frutos, quantidades consideráveis de PMFs, podem ser encontradas nas folhas de diversas espécies desse gênero, como a 5,6,7,8,4'-pentametoxy-flavona, 5,6,7,8,3',4'-hexametoxy-flavona e 5,4'-dihidroxi-6,7,8,3'-tetramethoxyflavona (PIATTELLI & IMPELLIZZERI, 1971). Outros compostos também podem ser encontrados em diversas partes dos frutos de *Citrus* spp. Do suco, foram isolados flavonóides glicosilados, como a hesperidina (hesperitina-7-?-rutinoside) e a eriocitrina (eriodictiol-7-?-rutinoside) (ROBARDS *et al.*, 1997). Nos óleos essenciais, presentes na casca dos frutos desse gênero, foram encontrados monoterpenos e sesquiterpenos (CACCIONI *et al.*, 1998).

Existem estudos que relacionam o estágio de crescimento do fruto com a produção de determinados compostos fenólicos. ORTUNO *et al.* (1999) desenvolveram

esse tipo de estudo com diferentes espécies de *Citrus* e observaram a presença de nobiletina, sinisetina e tangeretina na fase exponencial de crescimento e quercetogetina e heptametoxiflavona na fase linear. Segundo os autores, os primeiros compostos encontrados na fase exponencial podem ser precursores dos últimos. No entanto, no presente estudo, os compostos nobiletina e tangeritina foram encontrados na casca de plantas que já haviam passado pela fase exponencial de crescimento. TATUM & BERRY (1977) observaram a presença da 6,7-dimetoxicumarina em frutos de citros somente após a estocagem por seis dias. Esses autores citam, ainda, que o referente composto é formado quando o fruto está em senescência ou em condições de estresse. A correlação com o estresse pode ser observada durante a infecção da planta por microrganismos. Em estudo realizado com *C. aurantium*, *C. limon*, *C. paradise*, *C. sinensis*, *Poncirus trifoliata* e *Troyer citrange*, foi relatado um aumento gradativo da concentração de 6,7-dimetoxi-cumarina com a infecção pelo fungo *Phytophthora citrophthora*, mostrando ser um mecanismo de defesa da planta contra o patógeno (AFEX *et al.*, 1986).

A composição química de plantas medicinais, alimentos e bebidas é alvo de constantes estudos. Em alguns casos, foram encontrados flavonóides e cumarinas, como em *Daphne gnidium*, planta medicinal usada no tratamento de câncer. Nessa planta, foram encontrados sete diferentes flavonóides (luteolina, orientina, isoorientina, apigenina-7-*O*-glucosídeo, gencavanina, 5-*O*-?-D-primeverosilgencavanina, 2,5,7,4'-tetrahidroxisoflavonol) e quatro cumarinas (daphenetina, daphinina, acetilumbeliferona, daphonoretina) (CORTTIGLIA *et al.*, 2001). Além disso, muitos flavonóides tem sido isolados da cebola e do chá-preto, entre esses o predomínio foi de quercetina (O'REILLY *et al.*, 2001).

Seguindo uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Antibióticos da UFSC, os compostos isolados no presente estudo foram testados quanto à atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias. Porém, nesse caso, além de microrganismos de importância médica, foram usados também microrganismos fitopatogênicos. Entre esses últimos, dois foram obtidos do mesmo lote de frutos usados para a extração dos compostos, *Colletotrichum* sp. e *Curvularia* sp. isolados de *C. sinensis*.

As espécies de *Curvularia* (Figura 7), geralmente são patógenos facultativos de plantas, vivendo no solo, plantas e cereais. São comuns em áreas tropicais e subtropicais, como também em algumas épocas do ano em zonas temperadas. Entretanto, encontram-se na literatura citações de infecções em humanos e animais, sendo esses um dos agentes causadores de micetomas, oncomicoses, queratite, sinusite alérgica, abscesso cerebral, pneumonia, doenças alérgicas nos brônquios, endocardites e diversas infecções (ANAISSIE, BODEY, RINALDI, 1989; DESHAZO & SWAIN *et al.*, 1995).

O fungo *Colletotrichum* sp. (Figura 8) é o mais importante e comum agente da doença antracnose. Embora seja um fungo fitopatogênico, existem relatos de infecção pós-traumática em córnea de humanos. Também já foi diagnosticada a infecção por *C. gloeosporioides* em indivíduos diabéticos com histórico de lesão, causando nesse local uma hialofitomicose cutânea (GUARRO *et al.*, 1998).

Em algumas espécies, os conídios de *Colletotrichum* spp. podem ter a forma um pouco curvada e ser confundidos com os esporos de *Fusarium* sp., mas o fungo isolado neste estudo não apresenta tal característica (GUARRO *et al.*, 1998).

Para os testes de atividade antibacteriana, o inóculo bacteriano foi preparado segundo metodologia conhecida e reprodutível. Para os testes de atividade antifúngica,

o inóculo foi padronizado conforme ESPINEL-INGROFF *et al.*, (1995), onde a turvação da suspensão fúngica foi ajustada de acordo com a curva de crescimento dos microrganismos (Figuras 9-13).

A triagem da atividade antimicrobiana dos extratos e compostos foi realizada utilizando-se a técnica de bioautografia direta (Figuras 14 e 15). Uma das vantagens da utilização dessa técnica é a sua alta elevada sensibilidade, observando-se uma “zona clara” onde o crescimento microbiano é inibido (RAHALISON *et al.*, 1993). VALGAS, (2002) detectou atividade antibacteriana em extratos e substâncias puras de diversas plantas pela técnica de bioautografia direta com uso de concentração dos extratos 10 vezes menor que a usada no método de difusão. WEDGE & NAGLE, (2000) também consideram vantajosa a utilização da bioautografia como método de triagem, devido às propriedades cromatográficas (polaridade relativa, absorvância em UV, reatividade química) associadas a resultados rápidos. Entretanto, é prudente enfatizar que os resultados dessa técnica tem apenas caráter qualitativo e que não é recomendado o uso de qualquer comparação quantitativa, como por exemplo, caracterizar uma substância como mais ativa em função do tamanho do halo de inibição formado (VALGAS, 2002). O caráter meramente qualitativo do método bioautográfico, pode até ser ilustrado pela observação de que por esse método *Curvularia* sp. e *Colletotrichum* sp. foram os microrganismos que, de maneira geral, sofreram maior ação inibitória dos extratos e produtos (Tabelas 5 a 7). Entretanto, quando foram desenvolvidos os métodos de diluição, esses organismos foram os mais resistentes (Tabelas 11 a 13). YOUSEF & TAWIL (1980) observaram também essa relação inversa no estudo da atividade fungistática e bacterioristática de óleos essenciais, comparando o tamanho das zonas de inibição da bioautografia com a concentração inibitória mínima (CIM). Observaram,

ainda, que nem sempre os maiores halos de inibição na bioautografia direta corresponderam à menor CIM. Dessa forma, embora, o tamanho da zona de inibição no teste bioautográfico possa depender da sensibilidade do organismo ao antimicrobiano, isso não pode ser usado para comparar a potência das amostras. RAHALISON *et al.* (1993) fizeram um estudo comparativo do método de bioautografia e da CIM, testando um limite de concentração inibitória também no método bioautográfico. Nessa comparação, foi observada uma grande diferença nos resultados dos dois métodos. Tal diferença pode ocorrer devido ao fato de que, no teste de CIM, a amostra testada é diretamente adicionada ao meio liquefeito e fica diretamente em contato com o microrganismo, enquanto que na bioautografia a amostra entra em contato com o microrganismo somente após a difusão para o meio (LIMA *et al.*, 1992). Assim, após a confirmação da atividade antimicrobiana dos extratos e compostos (Tabelas 5 a 10), foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) (Tabelas 11 e 12) e quantidades inibitórias mínimas (QIM) (Tabela 13), para detectar a quantidade limite do extrato ou composto capaz de inibir o crescimento microbiano.

Nos testes de atividade biológica é sempre esperado que os compostos isolados sejam mais ativos que os extratos de origem. Entretanto, no caso de *C. limon* e *C. aurantifolia*, os extratos hexânicos foram mais ativos que os compostos isolados. Isso pode ter ocorrido devido à presença de algum outro composto com atividade antimicrobiana nesse extrato, que combinado com os compostos majoritários resultou em ação sinérgica sobre os microrganismos. Em outros estudos, fatos semelhantes têm sido observados. CORTIGLIA *et al.* (2001), estudando folhas da planta *Daphne gnidium*, observaram a maior atividade do extrato total, contendo flavonóides (luteonina, orientina, isoorientina, apigenina-7-O-?-D-primeverosilgenkavanina,

2,5,7,4'-tetrahidroxisoflavonol) e cumarinas (daphnetina, daphnina, acetilumbeliforme, daphnoretina) do que dos compostos separadamente. Assim também a atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos isolados de *Thalassia testudinum* (uma alga marinha) foi menor que a do extrato total (JENSEN *et al.*, 1998).

Neste estudo, os microrganismos mais sensíveis aos extratos e compostos foram os fungos dermatófitos, seguidos pelas bactérias e fungos fitopatogênicos (Tabelas 11 a 13). A maior resistência dos microrganismos fitopatogênicos é um resultado que não surpreende, e esse fato pode ser uma indicação, de que esses fungos apresentam certos níveis de resistência natural aos compostos ou que desenvolveram estratégias adaptativas para invadir a planta.

Se for observada a ação antimicrobiana dos extratos obtidos de *C. limon* e da cumarina, pode-se perceber que o perfil antimicrobiano do composto isolado (Tabela 13) é mais compatível com a atividade do extrato hexânico (Tabela 12) do que o extrato da cera epicuticular (Tabela 11). Essa relação também é válida para o extrato hexânico de *C. reticulata* e as flavonas, embora, pela análise em CCD o extrato epicuticular apresenta-se maior semelhança com o precipitado que o extrato hexânico (Tabela 3)

O perfil da atividade antimicrobiana do extrato epicuticular de *C. sinensis* e de *C. reticulata* (Tabela 11) foram comparáveis, sendo que, apenas com as duas bactérias testadas é que ocorre uma diferença entre as espécies. Pela análise em CCD, esses dois *Citrus* spp. também apresentam perfil cromatográfico semelhante (Tabela 3), podendo, isso, ser indício de uma composição química próxima, entre a cera epicuticular dessas duas espécies.

Comparando-se os resultados obtidos de *C. reticulata*, planta cultivada organicamente, livre de agrotóxicos, com as demais espécies não foram observadas

grandes diferenças na inibição dos microrganismos. Tal fato indica que a possível presença de agrotóxicos no epicarpo do fruto não estaria interferindo com os resultados.

Além da atividade antibacteriana e antifúngica, existem relatos de atividade inseticida na casca de *C. aurantifolia* e *C. sinensis*, contra mosquitos, baratas e mosca doméstica. Tais estudos foram realizados com compostos voláteis presentes nos óleos essenciais (KOTKAR *et al.*, 2002).

A atividade antimicrobiana dos flavonóides também foi estudada em extratos de outras plantas, além de *Citrus* spp. Extratos de folhas de *Helichrysum italicum*, flores de *Nepeta cataria* (NOSTRO *et al.*, 2000) e da cera epicuticular de *Arrabidaea brachypoda* (ALCERITO *et al.*, 2001), quando testados pelo método bioautográfico, inibiram os microrganismos nas bandas referente aos flavonóides. De *Annona squamosa*, foram purificados flavonóides com atividade antimicrobiana contra microrganismos contaminantes comuns. JENSEN *et al.* (1998) observaram, que a atividade antimicrobiana do extrato de *Thalassia testudinum* estava relacionada à presença de flavonóides glicosilados. YAO-LAN *et al.* (2002) testaram a atividade antiviral de flavonóides isolados de *Trollius chinensis* (planta medicinal chinesa utilizada para o tratamento de doenças respiratórias) obtendo, no entanto, fraca inibição contra o vírus da parainfluenza tipo 3.

Apesar de todos os efeitos positivos, os flavonóides, segundo alguns autores, podem ter efeitos adversos a saúde humana, como genotoxicidade, principalmente em aplicações comerciais nas misturas que ocorrem nos alimentos (DAS *et al.*, 1987; CREBELLI *et al.*, 1990). Esse efeito foi atribuído à presença de quercetina, mas outros flavonóides como a rutina e a rhametina também são citados. Devido ao fato de serem glicosilados, o que lhes confere maior polaridade, esses flavonóides retêm mais água,

tornando-se solúveis e entrando nas células mais facilmente (ROBARDS & ANTALOVICH, 1997).

Quanto à mutagenicidade dos PMFs, ainda não há resultados seguros. Em estudo realizado com compostos isolados de *Citrus* spp., observou-se um efeito protetor contra a mutagenicidade. Os compostos naringina, hesperidina, nobiletina e tangeretina inibiram a mutagenicidade de B[a]P, 2-AF, nitroquinolina N-óxido e também da quercetina, em *Salmonella typhimurium* TA1538 (CALOMME *et al.*, 1996).

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram conclusões importantes na investigação de novas substâncias com propriedades antimicrobianas. Eles, também, contribuíram para o entendimento sobre a correlação entre a ingestão de sucos e derivados de *Citrus* spp., contendo flavonóides e cumarinas, e a resistência a infecções e doenças causadas por microrganismos.

Dos resultados aqui descritos, pode-se concluir que:

- a) O método usado para o isolamento de flavonóides polimetoxilados de cascas de *Citrus* spp. é eficiente para as espécies de *Citrus* utilizadas, com exceção de *C. limon*, onde foi isolada apenas uma cumarina, a 6,7-dimetoxi-cumarina e *C. sinensis*, onde não foi isolado nenhum composto. Nas demais espécies observou-se a presença das já conhecidas flavonas 5,6,7,8,4'-pentametoxi-flavona e 5,6,7,8,3',4'-hexametoxi-flavona de *C. reticulata*, em mistura, e dos novos flavonóides polimetoxilados 8-hidroxi-3,5,6,7,4'-pentametoxi-flavona e 8-hidroxi-3,5,6,7,3',4'-hexametoxi-flavona a partir de *C. aurantifolia*, também em mistura.
- b) A bioautografia revela que todos os extratos e substâncias obtidos são ativos contra os fungos e as bactérias testadas, sendo observados halos de inibição do crescimento microbianos a partir de 6mm;
- c) Pela CIM, observa-se que as flavonas 6,7,8,4'-pentametoxi-flavona e 5,6,7,8,3',4'-hexametoxi-flavona são as mais ativas contra as bactérias, inibindo as duas bactérias testadas com $500\mu\text{g.mL}^{-1}$;

- d) Os extratos em hexano de *Citrus* spp. têm maior espectro de ação contra o crescimento microbiano do que os compostos isoladamente. Esses resultados sugerem que os compostos fenólicos podem ser uma barreira ao crescimento microbiano, mas em combinação com outros compostos presentes na casca.
- e) Os fungos fitopatogênicos são mais resistentes do que os outros microrganismos estudados aos compostos e extratos, evidenciando o possível desenvolvimento de estratégias para a invasão e sobrevivência da planta;
- f) Dos compostos isolados, 6,7-dimetoxi-cumarina é mais ativa, inibindo *M. canis* e *T. mentagrophytes* com apenas $250\mu\text{g.mL}^{-1}$.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABECITRUS. Subprodutos da laranja. disponível na Internet via: www.abecitrus.com.br/subprod. Arquivo capturado em julho de 2001.
- ADASKAVEG, J.E. - Defence mechanisms in leaves and fruits of trees to fungal infection. In ___ **Defence Mechanisms of Woody Plants Against Fungi**. Berlin, Springer-Verlag, 1992. p.207-45.
- AFEX, U.; SZTEINBERG, A.; CARMEL, S. - 6,7-Dimethoxycoumarin, a *Citrus* phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora gummosis*. **Phytochemistry**, **25**: 1855-6, 1986.
- ALCERITO, T.; BARBO, F.E.; NEGRI, G.; SANTOS, D.Y.A.C.; MEDA, C.L.; YOUNG, M.C.M.; CHÁVEZ, D.; BLATT, C.T.T. - Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. **Biochemical Systematics and Ecology**, **30**: 677-83, 2001.
- ALVES, S.H.; LOPES, J.O.; CURY, A.E. Teste de susceptibilidade aos antifúngicos: Por que, quando e como realizar. Disponível na Internet via: www.newlab.com.br/antifung.htm. Arquivo capturado em abril de 2001.
- ANAISSE, E.J.; BODEY, G. P.; RINALDI, M.G. - Emerging fungal pathogens. **European Journal of Clinical Microbiology Infections Disease**, **8**:323-30, 1989.
- ARDLE, M.C.; LETOURNEAU, R.N.; STEPHEN, A. - Method of making a flaved powder for enhancement of orange juice and product thereof. **United States Patent**, **54**: 1870, 2000.

- ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H.; FESKENS, E.J.M.; MESQUITA B.H.B.; KROMHOUT, D. - Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen elderly study. **American Journal of Clinical Nutrition**, **74**: 227-32, 2001.
- ASHBEL, C.O.C.; PAHLO, G.; DINTER, B.; WEIBERG, Z.C.O. - Dynamics of orange peel fermentation during ensiling. **Journal Applied Bacteriology**, **63**: 70, 1987.
- BAILEY, J.A. & JEGER, M.J. – **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Melksham, CAB International, 1992. p. 54-87.
- BALDI, A.; ROSEN, R.T.; FUKUDA, E.K.; HO, C.T. - Identification of nonvolatile components in lemon peel by high-performance liquid chromatography with confirmation by mass spectrometry and diode-array detection. **Journal Chromatograph**, **718**: 89-97, 1995.
- BARTHOLOTT, W.; NEINHUIS, C.; CUTLER, D.; DISTSCH, F.; MEUSEL, I.; THEISEN, I.; WILHELMI, H. - Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society**, **126**: 237-60, 1998
- BASTIANETTO, S. & QUIRION, R. - Natural extracts as possible protective agents of brain aging. **Neurobiology of Aging**, 2635–640, 2002.
- BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A. - Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. **Nutrition and Cancer**, **18(1)**: 1-29, 1992.
- BOHM, B.A.; Chemistry and biochemistry of organic natural products. In: _____ **Introduction to flavonoids**. Editora Harwood academic publishers, India, 1998. 339-65.
- BOWLES, D.J.- The wound response of plants. **Current Biology**, **1**: 165-7, 1991.

- BRANCO, A.; PEREIRA, A.S.; CARDOSO, J.N.; AQUINO NETO, F. R.; PINTO, A. C.; BRAZ FILHO, R. **Phytochemical Analysis**, **12**: 266, 2001.
- BRINKWORTH, R.I.; STOERMER, R.J.; FAIRLIE, D.P. Flavones are inhibitors of HIV-1 proteinase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **188** (suppl. 2): 631-7, 1992.
- BROCK, T.D. Interactions between microbial populations. In _____ - Principles of microbial ecology. New Jersey, Prentice Hall, 1966.
- CACCIONI, D.R.L.; GIZZARDI, M; BIONDI, D.M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. - Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal Food Microbiology**, **43**: 73-9, 1998.
- CALOMME, M.L.; PIETERS, A; VLIENTINCK; BERGHE, D.V. - Inhibition of bacterial mutagenesis by citrus flavonoids. **Planta Medica**, **62**: 222-6, 1996.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR R.L. - Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, **1**: 749-60, 1997.
- CHEN, Y.S.; LEE, C.S.; CHOU, C.T.; CHANG, Y.S. - The chemical constituents of the peels of citrus. **Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society**, **32**: 85-8, 1985.
- CHEN, J.; MONTANARI, A.M.; WIDMER, W.W. – Two new polymethoxylated flavones, a class of compounds with potential anticancer activity, isolated from cold pressed Dancy Tangerina peel oil solids. **Journal Agricultural Food Chemistry**, **45**: 364-368, 1997.

- CORTIGLIA, F.; LOY, G.; GARAU, D.; FLORIS, C.; CASU, M.; POMPEI, R.; BONSIGNORE, L. - Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. **Phytomedicine**, **8** (suppl. 4): 302-5, 2001.
- COWAN, M.M. - Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, **12**: 564-82, 1999.
- CREBELLI, R.; AQUILINA, G.; CONTI, L.; CARERE, A. - Microbial mutagenicity screening of natural flavouring substances. **Microbiologica**, **13**: 115-19, 1990.
- CUBERO, J. & GRAHAM, J.H. - Genetic relationship among worldwide strains of xanthomonas causing canker in *Citrus* species and design of new primers for their identification by PCR **Applied and Environmental Microbiology**, **68**: 1257-64, 2002.
- CUBERO, J.; GRAHAM, J.H.; GOTTWALD, T. R. - Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. **Applied and Environmental Microbiology**, **67**: 2849-52, 2001.
- DAS, M.; KHAN, W.A.; ASOKAN, P.; BIKECKRS, D.R.; MUKHTAR, H. - Inhibition of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation in epidermis and lungs of SENCAR mice by naturally occurring plant phenols. **Cancer Research**, **47**: 767-773, 1987.
- DEFELICE, S.L. - The nutraceutical initiative: a recommendation for U.S. Economic and regulatory reforms. **Genetic Engineering New**, **12**: 13-15, 1992.
- DESHAZO, R.D. & SWAIN, R.E. -. Diagnostic criteria for allergic fungal sinusitis. **Journal of Allergy & Clinical Immunology**, **96**:24-35, 1995

- DEPYPERE, H.T.; BRACKE, .E.; BOTERBERG, T.; MAREEL, M.M.; NUYTINCK, M.; VENNEKENS,K., SERREYN, R. - Inhibition of tamoxifen's therapeutic benefit by tangeretin in mammary cancer. **European Journal of Cancer**, **36**: 73, 2000.
- DERRICK, K.S. & TIMMER, L.W. - Citrus blight and other diseases of recalcitrant etiology. **Annual Reviews of Phytopathology**, **38**: 181-205, 2000.
- EGWIN, E.C.; ADEROTIMI, B.; ADEYEMO, S.O. - Efficacy of some nupe medicinal plants against *Salmonella typhi*: an in vitro study. **Journal of Ethnopharmacology**, **80**: 21-4, 2002.
- ENDT, D.V.; KIJNE, J.W.; MEMELINK, J. - Transcription factors controlling plant secondary metabolism: what regulates the regulators? **Phytochemistry**, **61**: 107-14, 2002.
- ESAÚ, K. - **Anatomia das Plantas com sementeiras**. São Paulo, 1974. 251 p.
- ESPINEL- INGROFF, A.; DAWASON, K.; PFALLER, M.; ANAISSIE, E.; BRESLIN, B.; DIXON, D.; FOTHERGILL, A.; PAETZNICK, V.; PETTER, J.; RINALDIM, M.; WALSH, T. - Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility for filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **39**: 314-19, 1995.

- ESPINEL - INGROFF, A.; BARTLETT, M.; BOWDEN, R.; CHIN, N.X.; COOPER, JR. C.; FOTHERGILL, A.; MCGINNIS, M.R.; MENEZES, P.; MESSER, A.; NELSON, P.W.; ODDS, F.C.; PASARELL, L.; PETER, J.; PFALLER, M.A.; REX, J.H.; RINALDI, M.G.; SHANKLAND, G.S.; WALSH, T.J.; WEITZMAN, I. - Multicenter evaluation of purposes standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal Clinical Microbiology**, **35**:139-43, 1997.
- ESPINEL – INGROFF, A.; BARTLETT, M.; CHATURVEDI, M.; GHANNOUM, K.; HAZEN, K.C.; PFALLER, M.A.; RINALDI, M.; WALSH, T.J. – Optimal susceptibility testing conditions for detection azole resistance in *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative evaluation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **45**: 1828-35, 2001.
- FANG, X.; QIU, F.; YAN, B.; WANG, H.; MORT, A.J.; STARK, R.E. - NMR studies of molecular structure in fruit cuticle polyester. **Phytochemistry**, **57**: 1035-1042, 2001.
- FRANÇA, S.C.; ROBERTO, P.G.; MARINS, M.A.; PUGA, R.D.; RODRIGUES, A.; PEREIRA, J.O. - Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**, **24**: 1-4, 2001.
- GORINSTEIN, S.; BELLOSO-MARTIN, O.; PARCK, Y-S.; HARUENKIT, R.; LOJEK, A.; CÍZ, M.; CASPI, A.; LIBMAN, I.; TRAKTHENBERG, S. – Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. **Food Chemistry**, **74**: 309-15, 2001.

- GROTEWOLD, E.; CHAMBERLIN, M.; SNOOK, M.; SIAME, B.; BUTLER, L.; SWENSON, J.; MADDOK, S.; CLAIR, G. S.; BOWEN, B. - Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. **Plant Cell**, **10**: 721-40, 1998.
- GRUNWALD, J. - The European phytomedicines market figures, trends, analyses. **Herbal Gram**, **34**: 60-5, 1995.
- GUARRO, J.; AKITI, T.; ALMADA-HORTA, R.; LEITE, L.A.M.; GENE, J.; FERREIRA-GOMES, S.; AGUILAR, C.; ORTONEDA, M. - Mycotic keratitis due to *Curvularia senegalensis* and *in vitro* antifungal susceptibilities of *Curvularia* spp. **Journal Clinical Microbiology**, **37**: 4170-3, 1999.
- GUARRO, J.; SVIDZINSKI, T.E.; ZAROR, L.; FORJAZ, M.H.; GENÉ, J.; FISCHMAN, O. - Subcutaneous hyalohyphomycosis caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal Clinical Microbiology**, **36**: 3060-5, 1998.
- HARBORNE, J.B. - Higher plant-lower plant interaction: phytoalexins and phytotoxins. In: _____ - **Introduction to Ecological Biochemistry**. 2. ed. New York, Academic Press, 1982. p. 227-61.
- HARBORNE, J.B.; INGHAM, J.L.; KING, L.; PAYANE, M. - The isopentenyl isoflavone luteone as a pre-infectious antifungal agent in the genus *Lupinus*. **Phytochemistry**, **15**:1485-7, 1976.
- HAWKSWORTH, B.C.; SUTTON; AINSWORTH, G.C. - **Dictionary of the Fungi**. England, Commonwealth Mycological Institute, 1983. 445p.
- HEERDEN, I.; CRONJÉ, C.S.; SWART, H.; KOTZÉ, J.M. - Microbial, chemical and physical aspects of citrus waste composting. **Bioresource Technology**, **81**:71-6, 2002.

- HIRANO, T.; ABE, K.; OKA, K. - Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. **British Journal of Cancer**, **72**: 1380-8, 1995.
- HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L.; RODRIGUEZ, S. - Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Medica**, **63**: 2-10, 1997.
- IWASE, Y.; TAKEMURA, Y.; JU-ICHI, M.; YANO, M.; ITO, C.; FURUKAWA, H.; MURUKAINAKA, T.; KUCHIDE, M.; TOKUDA, H.; IVISHINO, H. - Cancer chemopreventive activity of 3, 5, 6, 7', 8', 3', 4'-heptamethoxyflavone from the pulp of *Citrus* plant. **Cancer letter**, **163**: 7-9, 2001.
- JENSEN, P. R.; JENJINS, K. M.; PORTER, D.; FENICAL, W. - Evidence that a new antibiotic flavone glycoside chemically defends the sea grass *Thalassia testudinum* against zoosporic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, **64**: 1490-6, 1998.
- JIWAJINDA, S.; SANTISOPASRI, V.; OHIGASHI, H. - Coumarin-related compounds as plant growth inhibitors from two rutaceous plants in Thailand. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, **64**: 420-3, 2000.
- JOHAL, G.S.; GRAY, J.; GRUIS, D.; BRIGGS, S.P. - Convergent insights into mechanisms determining disease and resistance response in plant-fungal interactions. **Canadian Journal of Botany** **73**: 468-74, 1995.
- JOHANN, S.; SMÂNIA, A.J.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ, R.F.; PIZZOLATTI, M.G.; BRANCO, A. Polymethoxylated flavonoids isolated from Brazilian *Citrus* species and their antifungal activity. **Helvetica Chimica Acta**. [*in litt.*].

- KENNETH, J.; O'CALLAGHAN, STONE, P.J.; HU, X.; GRIFFITHS, D.W.; DAVEY, M.R.; COCKING, E.C. - Effects of glucosinolates and flavonoids on colonization of the roots of *Brassica napus* by *Azorhizobium caulinodans* ORS571. **Applied and Environmental Microbiology**, **66**: 2185-91, 2000.
- KERSTIENS, G.- Cuticular water permeability and its physiological significance. **Journal of Experimental Botany**, **47**: 1813-32, 1996.
- KIMURA, Y.; AOKI, T.; AYAE, S. - Chalcone isomerase isozymes with different substrate specificities towards 6'-hydroxy and 6'-deoxychalcones in cultured cells of *Glycyrrhiza echinata*, a leguminous plant producing 5-deoxyflavonoids. **Plant and Cell Physiology**, **42**: 1169- 73, 2001.
- KOBAYASHI, H.; NAMIKOSHI, M.; YOSHIMOTO, T.; YOKOCHI, T. - A screening method for antimitotic and antifungal substances using conidia of *Pyricularia oryzae*, modification and application to tropical marine fungi. **The Journal of Antibiotics**, **49**: 873-9, 1996.
- KOLLER, O.C.- **Citricultura, laranja, limão e tangerina**. São Paulo, 1994. 125 p.
- KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; PARK, Y.K.; BOWEN, W.H - Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **46**:1302-9, 2002.
- KOTKAR, H.M.; MENDKI, P.S.; SADAN, S.V.; JHA, S.R.; UPASANI, S.M.; MAHESHWARI, V.L. - Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, **1**: 33-7, 2002.

- KUPCHAN, S.; KNOX, J.R.; UDAYAMURTH, M.S. - Tumor inhibitors VIII. eupatorin, new cytotoxic flavone from *Eupatorium semiserratum*. **Journal of Pharmacology Science**, **54**: 929-30, 1965.
- LARONE, D.H. - **Medically Important Fungi - A Guide to Identification**, 3. ed., Washington, ASM Press, 1995.
- LENNETTE, E.H.; BALOWS, A.; HAUSLER, JR.W.J.; TRUANT, J.P. - **Manual of clinical microbiology**, 3^o ed, 1980, p.548-50.
- LIMA, E.O.; GOMPERTZ, O.F.; PAULO, M.Q.; GIESBRECHT, A.M. - *In vitro* antifungal activity of essential oils against clinical isolates of dermatophytes. **Review Microbiology**, **23** (4): 235-8, 1992.
- MACHIDA, K. & OSAWA, K. - On the flavonoid constituents from the peels of *Citrus hassaku* hort. Ex Tanaka. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, **37**: 1092-4, 1989.
- MANTHEY, J.A. & GROHMANN, K. - Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing by-products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **44**: 811-14, 1996.
- MCGINNIS, M.R. & PASARELL, L. - *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous ascomycetes to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implication. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **36**: 2353-5, 1998.
- MIDDLETON, E. & KANDASWAMI, C. - Potential healthy-promoting proprieties of Citrus flavonoids. **Food Technology**, 115-119.1994.

- MIZUNO, M.; LINUMO, M.; OHARA, M.; TANOKA, T.; IWAMAS, M. - Chemotaxonomy of the genus *Citrus* based on polymethoxy-flavones. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, **39**:945-9, 1991.
- MORIGUCHI, T.; KITA, M.; OGAWA, K.; TOMONO, Y.; ENDO, T.; OMURA, M. - Flavonol synthase gene expression during citrus fruit development. **Physiologia Plantarum**, **114** (suppl. 2): 251-8, 2002.
- MORRISSEY, J.P. & OSBOURN, A.E. - Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **63**: 708-24, 1999.
- MOULY, P.P.; GAYDOU, E.M.; ARZOUYAN, C. - Separation and quantification of orange juices using liquid chromatography polymethoxylated flavones. **Analisis**, **27**: 284-8, 1999.
- MUDAY, G.K.& DELONG, A. - Polar auxin transport: controlling where and how much. **Trends in Plant Science**, **6**: 535-42, 2001.
- MUIR, S.R.; COLLINS, G.J.; ROBINSON, S.; HUGHES, S.; BOVY, A.; DE VOS, C.H.R.; VAN TUNEN, A.J.; VERHOEYEN, M.E. - Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. **Nature Biotechnology**, **19**: 470-74, 2001.
- NAIR, N.; MAHAJAN, S.; CHAWDA, R.; KANDASWAMI, C.; SHANAHAN, T.C.; SCHWARTZ, S. - Grape Seed Extract Activates Th1 Cells In Vitro. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, **9**: 470-476, 2002.
- NEVES E. M.; DAYOUB, M.; DRAGONE, D.S.; NEVES, M. F. – Citricultura brasileira efeitos econômicos-financeiros, 1996-2000. **Revista Brasileira de Fruticultura**, **23(2)**: 432-6, 2001.

- NIELSEN, S.E.; BREINHOL, V.; CORNETT, C.; DRAGSTED, L.O. - Biotransformation of the citrus flavone tangeretin in rats. Identification of metabolites with intact flavane nucleus. **Food and chemical Toxicology**, **38**: 739-46, 2000.
- NOSTRO, A.; GERMANÒ, M.P.; D'ANGELO, V.; MARINO, A.; CANNATELLI, M.A. - Extraction methods and bioautography of medicinal plant antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, **30 (5)**: 379-84, 2000.
- O'REILLY, J.D.; MALLET, A.I.; MCANLIS, G.T.; YOUNG, I.S.; HALLIWELL, B.; SANDERS, T. AB.; WISEMAN, H. - Consumption of flavonoids in onions and black tea: lack of effect on F₂-isoprostanes and autoantibodies to oxidized LDL in healthy humans **American Journal of Clinical Nutrition**, **73**: 1040-4, 2001.
- ORTUNO, A.M.; ARCAS, M.C.; e GARCIA, B.O.; DEL RÍO, J.A. - Evolution of polymethoxy flavones during development of tangelo Nova fruits. **Food Chemistry**, **66**: 217-20, 1999.
- PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI P.L.; MORELLI, I. - In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, **79**: 165-8, 2002.
- PAO, S. & DAVIS, C.L. - Enhancing microbiological safety of fresh orange juice by fruit immersion in hot water and chemical sanitizers. **Journal of Food Protection**, **62**: 756-60, 1999.
- PENNA, C.; MARINO, S.; VIVOT, E.; CRUAÑES, M.C.; MUÑOZ, J.D.; FERRARO, G.; GUTKIND, G.; MARTINO, V. - Antimicrobial activity of argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, **77**: 37-40, 2001.

- PELEGRINE, M.& GALEMBECK, S.E. - Compostos de coordenação de flavonóides com metais. Disponível na Internet via: www.iq.ufrj.br FFCLRP-USP, Arquivo capturado em julho de 2001.
- PETERSON, J.; DWYER, J.; DSC, RD. - Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, **18**: 1995-2018, 1998.
- PIATTELLI, M.& IMPELLIZZERI. - Fungistatic flavones in the leaves of citrus species resistant and susceptible to *Deuterophoma tracheiphila*. **Phytochemistry**, **10**: 2657-2659, 1971.
- PINTO, A.; SIQUEIRA, D.H.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. - Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, **25**: 45-61, 2002.
- RAHALISON, L.; HAMBURGER, M.; MONOD, M.; FRENK, E.; HOSTETTMANN, K. - Antifungal tests in phytochemical investigations: comparison of bioautographic using phytopathogenic and human pathogenic fungi. **Planta Medica**, **60**: 41-4, 1993.
- ROBARDS, K. & ANTALOVICH, M; Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: A review. **The Analyst**, **122**:11-34, 1997.
- ROBARDS, K.; ANTALOVICH, M.; BOYD, S. - Characterisation of citrus by chromatographic analysis of flavonoids. **Journal Science Food Agricultural**, **75**: 87-101, 1997.
- ROBBINS, R.C. - Regulatory action of Phenylbenzo-pyrone (PBP) derivatives on blood constituents affecting rheology in patients with coronary heart disease (CHD). **International Journal for Vitamin Nutrition Research**, **46**: 338-47, 1976.

- ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. - **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. Editorial Premier, 1997. 372p.
- ROBERTS, D.A. & BOOTHROYD, C.W. In: _____ - Fundamentos de patologia vegetal. Zaragoza, Acribia, 1978. p. 121-34.
- ROSSETTI, V. MÜLLER, G.W. COSTA, A.S. - **Doenças dos citros causadas por algas, fungos, bactérias e vírus**. Fundação Cargill, 1993. 84p.
- SCOLA, R. - Fruticultura é boa alternativa. **Diário Catarinense**, 12 de setembro de 2001.
- SHIRLEY, W.B. - Flavonoid biosynthesis: “new” function for an “old” pathway. **Trends in Plant Science**, **1**: 377-81, 1996.
- SHIRLEY, W.B. - Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. **Current Opinion in Plant Biology**, **5**:218-23, 2002.
- SIMMERING, R.; PFORTE, H.; JACOBASCH, G.; BLAUT, M. - The growth of the flavonoid-degrading intestinal bacterium, *Eubacterium ramulus*, is stimulated by dietary flavonoids in vivo *FEMS. Microbiology Ecology*, **10**: 2640, 2002.
- SASLOWSKY, D. & SHIRLEY-W.B. - Localization of flavonoid enzymes in *Arabidopsis* roots. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, **27**: 37-48, 2001.
- SMÂNIA JR, A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, E.A.F.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. – Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, **45**: 177-81, 1995.

- STEVENS, J.F.; WOLLENWEBER, E.; IVANIC, M.; HSU, V.L.; SUNDBERG, S.; DEINZER, M. - Leaf surface flavonoids of *Chrysothamnus*. **Phytochemistry**, **51**: 771-80, 1995.
- SWATSITANG, P.; TUCKER, G.; ROBARDS, K.; JARDINE, D. - Isolation and identification of phenolic compounds in *Citrus sinensis*. **Analytica Chimica Acta**, **417**: 231-40, 2000.
- TATUM, J.H. & BERRY, R.E. - 6,7-Dimethoxycoumarin in the peel of *Citrus*. **Phytochemistry**, **16**: 1091-2, 1997.
- TRAUB, N.H. & LEONHARD, B. - Antibiotic susceptibility tests with fastidious and non fastidious bacterial reference strains: effects of aerobic ver hypercapnic incubation. **Chemotherapy**, **41**: 18-27, 1995.
- TUDELA, J.L.R. - Resistencia de los hongos patógenos oportunistas a los antifúngicos. **Revista Clinica Espanhola**, **197**: 67-74, 1997.
- UGAZ, O.L. - **Investigación fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales**. Lima, Pontifica Universidad Catolica Del Peru, 1998. 213p.
- UZI, A.; SZTEINBERG, A; CARMELY, A. - 6,7-Dimethoxycoumarin, a *Citrus* phytoalexin conferring resistance against *Phytophthora gummosis*. **Phytochemistry**, **25**: 1855-6, 1986.
- VALGAS, C. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina. Avaliação de métodos de triagem para determinação de atividade antibacteriana de produtos naturais, 2002.
- VASCONCELLOS, J.A. - Alimentos Funcionales. Conceptos y beneficios para la salud. Disponível na internet via: www.worldfoodscience.org/vol1_3/feature1-3a.html. Arquivo capturado em outubro de 2001.

- VELÁZQUEZ, N.C. & RONDÓN A. - Etiologia de la mancha parda de los cítricos em Venezuela. **Agronomía Tropical**, **35**(supl.1-3): 111-15, 1980.
- VILAS, A.T. - Qualidade superior / Especial Citricultura. Disponível na Internet via: www.snagricultura.org.br **Agroanalysis**, **20**, 1999.
- YAKOBY, N.; KOBILER, I.; DINOOR, A.; PRUSKY, D. - pH regulation of pectate lyase secretion modulates the attack of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruits. **Applied and Environmental Microbiology**, **66**: 1026-30, 2000.
- YAO-LAN, L.; SHUANG-CHENG, M.; YI-TING, Y.; SHAO-MING, Y.; PAUL, H.B. - Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. **Journal of Ethnopharmacology**, **79**: 365-8, 2002.
- YOUSEF, R.T.& TAWIL, G.G. - Antimicrobial activity of volatile oils. **Pharmazie**, **35**: 698-701, 1980.
- ZUANAZZI, J.S.S. - Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.*-**Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Ver. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000, p.489-515.
- WEDGE, D.E. & NAGLE, D.G. – A new 2D-TLC bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens. **Journal of Natural Products**, **63**: 1050-4, 2000.
- WILLIAMSON, G.; FAULKNER, K.; PLUMB, G.W. - Glucosinolates and phenolics as antioxidants from plant foods. **European Journal of Cancer Prevention**, **7**: 17-21,1998.

