

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E BIOTECNOLOGIA

**Avaliação da atividade antifúngica de saponinas de *Quillaja brasiliensis* (A.St.-Hil.
& Tul.) Mart.**

Luana Caroline Colling

Orientador: Arthur Germano Fett-Neto

Porto Alegre, julho de 2017

Luana Caroline Colling

Avaliação da atividade antifúngica de saponinas de *Quillaja brasiliensis* (A.St.-Hil. & Tul.) Mart.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como um dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da UFRGS, ênfase em Biotecnologia Molecular.

Orientador: Arthur Germano Fett-Neto

Porto Alegre, julho de 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Arthur por ter me acolhido de braços abertos desde o primeiro dia em que coloquei os pés na universidade, por ter me aceitado de volta, e pela confiança depositada durante todos esses anos. Obrigada pela oportunidade em conhecer este mundo encantador e apaixonante da fisiologia vegetal, por servir de motivação para continuar neste caminho e por ser exemplo de pessoa que faz ciência com consciência e responsabilidade.

À Anna e à Fer, pela orientação no dia-a-dia e todo conhecimento de bancada e campo passado desde o início. Pela ajuda científica e emocional, por serem meu braço direito e sempre muito pacientes comigo, e por terem permitido esta amizade tão importante, que continua até hoje e que quero para a vida.

À banca examinadora, Márcia e Paloma, pela disponibilidade.

Ao Prof Martinelli pela atenção e disponibilidade ao ceder os fungos utilizados no ensaio deste trabalho.

Ao pessoal do laboratório de Fisiologia Vegetal – aqueles que estão presentes e aqueles que já saíram - pelos momentos de café compartilhados, pelas festas, comemorações e por tornarem o ambiente muito mais agradável e descontraído. Em especial à Fran, pela ajuda nas análises estatísticas, pela amizade, e por me sequestrar para as saídas de campo.

Aos meus colegas de curso, pelas trocas de favores, pelos dias de convivência e pelos muitos momentos que compartilhamos dos mesmos sentimentos e questionamentos de quase formados.

À Dani, por ter se tornado uma grande irmã e praticamente minha bolsista. Obrigada por ser esta paciência e generosidade em pessoa, por toda ajuda, compreensão, por tornar meus dias mais leves e por ter sido minha calma em meio ao caos.

Às minhas amigas e colegas de apartamento, Lari e Bene, pelos mimos, por serem compreensivas e prestativas nos momentos em que mais precisei, e por serem companhia de estudo em diversas noites.

À minha amada família. Aos meus pais, José e Lisete, pela educação e suporte, por apoiarem minhas escolhas e me ensinarem a seguir meus próprios passos. Aos meus irmãos, Lucas e Luis Henrique, e minha cunhada Cristine, pelo constante apoio, pelos momentos de descontração e por serem simplesmente quem são. Às mascotes Meghy (*in memorian*) e Scher pelo inesgotável fonte de energia e carinho.

Aos demais amigos que mesmo de longe me acompanharam e auxiliaram de alguma forma a chegar até aqui. Em especial ao Rafael, pela infinita paciência e zelo, e por ser meu parceiro durante todo esse tempo.

RESUMO

Saponinas são glicosídeos de origem terpênica, com considerável valor econômico e ampla utilização nos setores têxtil, alimentício, cosmético e farmacêutico. Estes compostos fazem parte do grupo de metabólitos secundários vegetais, cuja função está envolvida nos mecanismos de proteção e comunicação das plantas. Sua acumulação ocorre em resposta a estresses bióticos, como herbívoros e patógenos, e abióticos, como radiação, salinidade e seca. *Quillaja brasiliensis* é uma espécie nativa do Rio Grande do Sul, cujas saponinas estão presentes majoritariamente nas folhas. Frações purificadas de saponinas foliares provenientes desta planta, denominadas QB-90 e QB-80, mostraram expressiva atividade adjuvante em vacinas experimentais em modelo murino contra diferentes vírus, indicando seu potencial farmacêutico. Tendo em vista melhor entendimento do papel *in planta* destas moléculas, é importante averiguar suas outras bioatividades e compreender sua dinâmica de acúmulo. Considerando a necessidade de novos fungicidas menos agressivos ao meio ambiente, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do extrato aquoso e de frações ricas em saponinas de *Q. brasiliensis* frente ao crescimento de importantes fungos patógenos de plantas. As frações purificadas de saponina, especialmente QB-90, foram capazes de inibir o crescimento de *Bipolaris micropus*, *Curvularia inaequalis* e *Fusarium incarnatum*. Este efeito fungicida está de acordo com o papel geral de saponinas relatado na literatura e suporta a ideia de um papel de defesa exercido por saponinas de *Q. brasiliensis* frente a patógenos fúngicos, além de potencializar seu possível uso no controle destes microrganismos.

Palavras chave: atividade antifúngica, metabolismo secundário, saponinas, *Quillaja brasiliensis*

ABSTRACT

Saponins are glycosides of triterpenoids or steroids with high economic value, being widely used in industry sectors, such as textile, food, cosmetic and pharmaceutical. These metabolites are plant secondary products, whose function is related to defense and communication mechanisms in plants. Accumulation of secondary metabolites often takes place in response to biotic and abiotic stresses. *Quillaja brasiliensis* is a native species of Rio Grande do Sul that accumulates triterpenic saponins in its leaves. Purified saponin-rich fractions of leaves of this species, named QB-90 and QB-80, showed strong immunoadjuvant properties in murine experimental vaccines against several viruses, indicating their pharmaceutical potential. To better understand *in planta* functions of these metabolites, it is useful to investigate their bioactivities and their accumulation dynamics. Considering the need for developing new fungicides less environmentally aggressive, this study aimed at evaluating the effect of aqueous extracts and saponin-rich fractions of *Q. brasiliensis* against three phytopathogenic fungi. Saponin-rich fractions, particularly QB-90, were able to significantly inhibit the growth of *Bipolaris micropus*, *Curvularia inaequalis* and *Fusarium incarnatum*. The data support a defense role for saponins of this tree against fungi and indicate a new potential application of these metabolites in fungal control.

Keywords: antifungal activity, secondary metabolism, saponins, *Quillaja brasiliensis*

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT.....	vi
1) INTRODUÇÃO	1
a) Metabólitos Secundários.....	1
i) Terpenos.....	2
(1) Saponinas	3
b) <i>Quillaja brasiliensis</i>	4
c) Fungos fitopatogênicos.....	6
i) <i>Bipolaris</i> sp.	6
ii) <i>Curvularia</i> sp.	7
iii) <i>Fusarium</i> sp.	8
2) JUSTIFICATIVA.....	10
3) OBJETIVOS.....	11
a) Objetivo Geral.....	11
b) Objetivos Específicos.....	11
4) MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
a) Biomassa Vegetal.....	12
b) Extração de folhas.....	12
c) Purificação de saponinas	12
d) Cultura de fungos.....	13
e) Avaliação de atividade antimicótica	13
f) Análise estatística	14
5) RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
6) CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	20
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

1) INTRODUÇÃO

a) Metabólitos Secundários

As plantas são capazes de produzir biomoléculas de variadas estruturas e abundância, em diferentes tecidos, órgãos e estágios fisiológicos, e que se mostram essenciais para sua adaptabilidade e sobrevivência (Caretto *et al.*, 2015). Estes metabólitos são classificados em dois grandes grupos: primário e secundário. Os primários possuem suas estruturas altamente conservadas e são indispensáveis para o crescimento, desenvolvimento e reprodução da planta (Hong *et al.*, 2016), atuando em processos como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, síntese proteica, assimilação de nutrientes e diferenciação celular (Taiz & Zeiger, 2006).

Os metabólitos secundários pertencem a um grande grupo de fitoquímicos que, por sua vez, não estão envolvidos diretamente nos processos básicos da planta (Gupta *et al.*, 2017). Por outro lado, estes compostos de baixo peso molecular apresentam diversos papéis importantes para a fisiologia da planta e sua interação com o ambiente, sendo muitas vezes sintetizados quando se faz necessária adaptação a estresses bióticos e/ou abióticos (Korkina *et al.*, 2017). Em relação aos estresses bióticos, os metabólitos oferecem proteção contra patógenos (vírus, bactérias e fungos), contra predadores (tanto herbívoros invertebrados como vertebrados) e ainda contra plantas competidoras (alelopatia). Estresses abióticos cuja mitigação pode envolver metabólitos secundários incluem excessos de luz solar (ultravioleta, visível e infravermelha), mudanças de temperatura, seca, salinidade, deficiência de nutrientes e tratamento com herbicidas (Ramakrishna & Ravishankar, 2011).

Apesar destes dois grandes grupos de metabólitos serem muitas vezes estudados separadamente, existe uma grande interconexão entre eles, resultando em partição de alguns precursores e intermediários, doação de energia e sinalização molecular (Caretto *et al.*, 2015; Sheshadri *et al.*, 2016). De fato, o metabolismo primário fornece precursores para o secundário. Estes precursores incluem aminoácidos, carboidratos e lipídios que são modificados por enzimas do metabolismo secundário, dando origem a novas estruturas-mãe, que, por sua vez, sofrem reações modificadoras, tais como metilação, hidroxilação e glicosilação. De acordo com as estruturas químicas, os metabólitos secundários são divididos em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Korkina *et al.*, 2017).

i) Terpenos

Os terpenos, também chamados de isoprenoides ou terpenoides, constituem a maior classe dos metabólitos secundários, chegando a mais de 40.000 diferentes compostos já descritos. Sua síntese ocorre a partir da fusão repetitiva de unidades básicas de isopreno (C_5H_8), e o número de unidades determina sua classificação geral: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (Lu *et al.*, 2016).

Isopentenil difosfato (IPP) é a principal unidade básica utilizada na formação de terpenos e pode ser formada a partir de duas vias metabólicas: a rota do mevalonato (MVA), usada para a síntese de isoprenoides citosólicos e mitocondriais, ou a rota do MEP (metileritrol fosfato), produzindo isoprenoides plastídicos (Vranová *et al.*, 2012). O IPP é isomerizado à dimetilalil pirofosfato (DMAPP), e a condensação consecutiva das unidades IPP e DMAPP leva à formação de pirofosfatos prenilados, os precursores imediatos das diferentes classes de terpenoides (Lu *et al.*, 2016).

A grande diversidade química desta classe de compostos metabólicos se reflete nas mais variadas atividades biológicas *in vivo*. Temos como exemplo pigmentação fotossintética, composição de membrana, regulação hormonal, ação antioxidante, além de funções especializadas associadas às interações de plantas sésseis com outros organismos no contexto da reprodução, defesa ou simbiose, podendo agir como repelentes ou atrativos (Gershenzon & Dudareva, 2007). Baseado neste contexto, os terpenos tornaram-se um importante recurso natural para uso humano como produtos farmacêuticos, sabores, fragrâncias, suplementos alimentares (vitaminas ou edulcorantes), pesticidas e matérias-primas para a produção de um vasto conjunto de materiais industriais (Bohlmann & Keeling, 2008).

O terpenoide mais abundante produzido comercialmente é a borracha natural, atingindo produção anual de 10^7 toneladas. Outros terpenos de importância econômica incluem mentol, um monoterpenoide extraído da hortelã-pimenta e usado na indústria de sabor e perfume; ácido abiético, um diterpenoide isolado da resina de coníferas que é usado em lacas, vernizes e sabão; e os fármacos artemisinina e taxol, com atividade antimalária e anticâncer respectivamente (Bohlmann & Keeling, 2008).

(1) Saponinas

Saponinas são triterpenos (30 carbonos) glicosilados encontrados, na sua maioria, em espécies de plantas dicotiledôneas. Sua natureza é anfifílica, ou seja, parte da estrutura é lipofílica (sapogenina ou aglicona) e parte hidrofílica (sacarídeo). O termo saponina é derivado da palavra no latim *sapo* que significa “sabão” e reflete sua propriedade de formar espumas estáveis em soluções aquosas, de modo semelhante ao sabão (Augustin *et al.*, 2011). Saponinas possivelmente localizam-se nos vacúolos e possuem função de defesa (Kesselmeier & Urban, 1983; Yendo *et al.*, 2014).

Assim como na biossíntese dos demais terpenos, IPP e DMAPP agem como precursores da biossíntese de saponinas. A fusão de ambas as unidades básicas leva a formação do composto geranyl difosfato (GPP), e posteriores reações enzimáticas seguidas de oxidação conduzem à síntese de 2,3-oxidoescaleno, que é o precursor das saponinas esteroidais e triterpênicas (Lambert *et al.*, 2011). A diferença entre ambas as saponinas baseia-se na estrutura e na bioquímica de suas agliconas (Augustin *et al.*, 2011). A partir do precursor 2,3-oxidoescaleno podem ocorrer diversos tipos de reações de ciclização, além de outras modificações como oxidação, hidroxilação, glicosilação e demais substituições (Lambert *et al.*, 2011). O tipo de ciclase envolvido nessas reações é o que determina o tipo de esqueleto formado, sendo os principais damarenediol sintase (DDS), β -amirina sintase (β AS) e α -amirina sintase (α AS) (Vincken *et al.*, 2007; Shibuya *et al.*, 2009). Apesar da grande variabilidade estrutural, uma característica comum entre estes metabólitos é a presença de uma cadeia de açúcar ligada a uma aglicona (Lambert *et al.*, 2011).

A diversidade estrutural das saponinas é chave para suas numerosas propriedades físico-químicas e biológicas na planta. Sua importante ação de defesa está ligada às propriedades antimicrobiana, fungicida, alelopática, inseticida e moluscicida (Dinda *et al.*, 2010; Francis *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2011). O tratamento com elicitores pode elevar ainda mais o nível de saponinas *in vivo*. Dentre estes, podem ser citados extrato de levedura, ácido salicílico ou derivados de jasmonato, sendo estes dois últimos conhecidos por estimularem respostas de defesa da planta a patógenos e herbívoros, respectivamente (Yendo *et al.*, 2010). O aumento destas moléculas pode se dar de acordo com a disponibilidade de água e nutrientes, radiação luminosa ou efeitos combinados (Szakiel *et al.*, 2011).

Apesar de os mecanismos moleculares envolvidos nestes efeitos tóxicos e deterrentes não estarem completamente elucidados, a hipótese mais provável e mais estudada é a tendência das saponinas em causar perturbações na membrana (Francis *et al.*, 2002), em função de interações com esteróis e lipídeos (De Groot & Müller-Goymann, 2016). Em relação à atividade antifúngica, o mecanismo principal também está aparentemente relacionado à interação com membranas, causando perda de integridade das mesmas (Morrissey & Osbourn, 1999). Já sua atividade moluscicida pode ocorrer devido a seu efeito detergente nas membranas do trato digestivo ou epiderme dos moluscos. Estes metabólitos foram também identificados como prejudiciais a alguns protozoários. Certas saponinas e sapogeninas são capazes de desativar vírus (Francis *et al.*, 2002).

Em modelos animais foi mostrado o efeito adjuvante de saponinas e seus derivados sobre a função específica do sistema imune, tanto celular quanto humoral, além de baixa toxidez para mamíferos (De Costa *et al.*, 2014). Efeitos citostáticos significativos contra células cancerígenas e a capacidade em diminuir o nível de colesterol no soro animal também foram relatados (Francis *et al.*, 2002). Em razão destas e demais propriedades já relatadas, esta classe de terpenos apresenta grande valor comercial e é utilizada na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia e na agricultura (Szakiel *et al.*, 2011). Sua ampla utilização abrange funções como agentes conservantes, espumógenos, modificadores de sabor e para remoção de colesterol em produtos lácteos, constituintes de muitos medicamentos populares tradicionais e adjuvantes em vacinas (Augustin *et al.*, 2011).

b) Quillaja brasiliensis

Quillaja brasiliensis (Quillajaceae) é uma árvore nativa do sul do Brasil, comumente conhecida como “pau-sabão” devido à característica de formar abundante espuma em água (Figura 1) (Fleck *et al.*, 2006). Esta espécie apresenta em suas folhas saponinas triterpênicas que são estrutural e funcionalmente similares àquelas encontradas em cascas de *Quillaja saponaria* (Figura 2). *Q. saponaria* é uma árvore chilena congênere cujas cascas são uma das principais fontes industriais de saponina, como Quil-A[®], fração que tem sido amplamente estudada e utilizada como adjuvante em formulações de vacinas (de Costa *et al.*, 2014). No entanto, a vasta exploração desta planta chilena tem causado grandes danos ecológicos e considerável escassez de

suprimentos disponíveis, o que torna as saponinas de *Q. brasiliensis* uma possível fonte destes compostos através de exploração mais sustentável e rápida por extração de folhas (Fleck *et al.*, 2006).

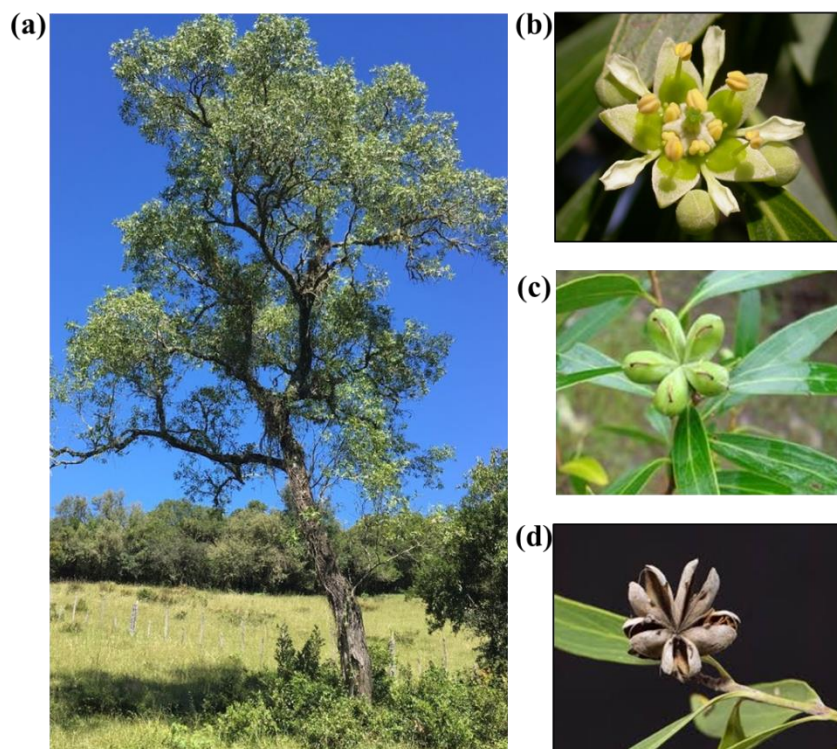


Figura 1. Indivíduo de *Q. brasiliensis*, localizado em Canguçu, RS (a). Flor (b), fruto verde (c) e fruto maduro (d) da espécie.

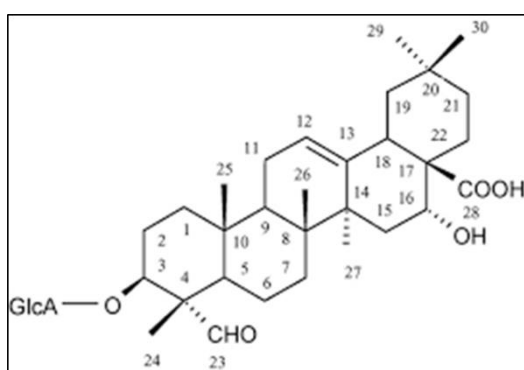


Figura 2. Pró-sapogenina do ácido 3-O- β -D-glicuronopiranosil-quiláico, isolada de folhas de *Q. brasiliensis*.

O conteúdo de saponinas presente em *Q. brasiliensis* pode ser induzido por estresses abióticos como exposição à radiação UV-C, alteração de regimes luminosos e

agentes osmóticos, bem como por estresses bióticos simulados pelo uso de moléculas sinalizadoras (jasmonato e ácido salicílico), além de dano mecânico controlado e ultrassom, indicando papel de defesa destes metabólitos na planta (De Costa *et al.*, 2013). Outros estudos demonstraram que tanto o extrato aquoso foliar de *Q. brasiliensis* quanto uma fração de saponina dele purificada (QB-90) estimularam resposta imune humoral e celular contra *herpesvirus* bovino tipo 1 (BoHV-1) e tipo 5 (BoHV-5), vírus da poliomielite humana, vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e vírus da raiva veterinária. Os extratos e a fração purificada empregados mostraram efeito adjuvante e baixa toxidez em modelo murino, de forma comparável ou superior à fração comercial chilena Quil-A[®] (Fleck *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2011; De Costa *et al.*, 2014; Cibulski *et al.*, 2016; Yendo *et al.*, 2016).

c) Fungos fitopatogênicos

i) *Bipolaris* sp.

Bipolaris é um grande gênero de hifomicetos demaciáceos, anamorfo dos gêneros de Ascomycota *Cochliobolus* e *Pseudocochliobolus*. Suas típicas características morfológicas incluem colônias escuras de crescimento rápido, conidióforos geniculados com conidiogênese simodial, grandes conídios em sua maioria curvados, e com germinação a partir das extremidades (bipolar). A maioria das espécies pertencentes a este gênero vive e se alimenta de matéria orgânica morta do solo e são patógenos de plantas tropicais e subtropicais, sendo algumas espécies ainda capazes de infectar humanos e animais (Da Cunha *et al.*, 2012).

As espécies mais relevantes do ponto de vista clínico são *B. australiensis*, *B. hawaiiensis*, *B. spicifera* e *B. papendorffii*. Estes fungos infectam pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes causando sinusite alérgica, queratite, endoftalmite, onicomiose, peritonite associada à diálise, infecções pulmonares e cutâneas e infecções pelo sistema nervoso central (SNC) (Da Cunha *et al.*, 2012). Referindo-se à infecção em plantas, atingem principalmente culturas de campo de alto valor da família *Poaceae*, incluindo arroz, milho, trigo e sorgo. A doença causa manchas e ferrugem foliares, derretimentos teciduais e podridões radiculares (Manamgoda *et al.*, 2014).

A distribuição global destes fungos fitopatogênicos ocorreu possivelmente como resultado da transferência geográfica de produtos agrícolas como plantas e sementes. Em consequência, surgiram doenças devastadoras em culturas básicas, causando fome em grandes populações humanas de diversas regiões do mundo. Como exemplo, podemos citar os problemas de fome na Índia (1943-1944) devido à doença do arroz, enormes perdas em culturas de milho nos Estados Unidos e Reino Unido (1970) resultantes da ferrugem foliar, e ainda o fungo *Bipolaris sorokiniana*, declarado em 1990 o patógeno foliar do trigo mais importante economicamente em regiões quentes (Manamgoda *et al.*, 2014). Recentes estudos moleculares identificaram outras três novas espécies pertencentes a este gênero, dentre elas *Bipolaris micropus* (Da Cunha *et al.*, 2012).

ii) *Curvularia* sp.

Assim como *Bipolaris*, o gênero *Curvularia* é anamorfo do gênero *Cochliobolus* e, portanto ambos compartilham diversas similaridades. Em relação às características morfológicas, *Bipolaris* e *Curvularia* diferem apenas pela morfologia dos conídios, sendo conídios de *Curvularia* menos alongados, com células medianas mais largas e euseptadas (Manamgoda *et al.*, 2014). No entanto, ainda assim podem existir conídios intermediários entre os dois gêneros o que dificulta a taxonomia de ambos (Manamgoda *et al.*, 2011).

Similarmente, estes fungos vivem a partir da matéria orgânica do solo ou são patógenos de plantas, com algumas espécies capazes de infectar humanos e animais. Casos clínicos relataram algumas espécies associadas a diferentes tipos de infecção, como queratite, sinusite, infecções cutâneas e subcutâneas, peritonite, onicomicose, endocardite, endoftalmite, feneofomicose cerebral e doença broncopulmonar alérgica e disseminada (Da Cunha *et al.*, 2013). Em relação às infecções em plantas, este gênero desencadeia os mesmos fenótipos da doença causada por *Bipolaris*, tornando impossível a distinção do patógeno apenas pelos sintomas (Amaradasa & Amundsen, 2016).

Nos EUA, estado de Nebraska, *Curvularia inaequalis* foi identificado em “grama de búfalo” (*Buchloe* sp.), causando sintomas de manchas foliares. Este mesmo fungo infecta folhas de gramados, iniciando por manchas castanhas escuras, seguidas de destruição da ponta das folhas e eventual ferrugem. À medida que a doença progride, as

manchas foliares diminuem e o dossel torna-se mais fino (Amaradasa & Amundsen, 2016).

iii) *Fusarium* sp.

O gênero *Fusarium* também pertence ao filo Ascomycota (Ramdial *et al.*, 2017). A identificação das diversas espécies, dependente de características morfológicas e fisiológicas, é muito limitada devido à grande similaridade entre elas, o que torna necessária a utilização de métodos moleculares a fim de fazer esta distinção (Castellá & Cabañes, 2014). A vasta distribuição e diversa ecologia das espécies de *Fusarium* retratam sua diversidade metabólica, podendo ser encontrados no solo como saprófitos e mutualistas, ou em diversos habitats como parasitas de plantas e animais (Pacheco Marino *et al.*, 2016).

Espécies como *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* mostraram ser patógenos cutâneos ou viscerais em peixes, podendo causar infecções letais (Pacheco Marino *et al.*, 2016). Em relação ao impacto vegetal, este gênero de fungos está entre os fitopatógenos mundiais mais importantes. Estão associados a várias doenças, incluindo murchas, manchas e necrose de várias espécies hortícolas, de campo, ornamentais e florestais em ecossistemas agrícolas e naturais. Sua estratégia de infecção baseia-se na produção das mais diversas micotoxinas que contaminam produtos agrícolas e os tornam inadequados para o consumo humano e animal (Ramdial *et al.*, 2017).

A título de exemplo, na ilha de Trinidad, a perda de 20–40 % na produção de pimentão foi resultado da infecção por *Fusarium* sp. (Ramdial *et al.*, 2017). Na Europa do norte e central, estes fungos estão associados à doença giberela em plantações de trigo e milho (Castellá & Cabañes, 2014). A infecção do sorgo resulta em doenças como apodrecimento das raízes e do caule, ferrugem das plântulas e mofo dos grãos (Divakara *et al.*, 2014). Tomates também são muito suscetíveis a estas infecções na pós-colheita devido ao seu epicarpo suculento que possibilita a penetração das hifas fúngicas na fruta (Bakar *et al.*, 2013).

Fusarium incarnatum é uma espécie amplamente distribuída, e, apesar de ser comum nos trópicos e subtropicais, é também encontrada no Mediterrâneo e em regiões temperadas. Este fungo está relacionado com a contaminação pela micotoxina zearalenona (ZEA) em sementes de sorgo na Índia, Argentina e Tunísia. O complexo de

espécies *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC) representa um complexo de cerca de 30 espécies morfológicamente similares, capaz de infectar uma vasta gama de culturas (Lahouar *et al.*, 2017).

2) JUSTIFICATIVA

Uma parte expressiva dos métodos de controle de fungos fitopatogênicos envolve o uso de fungicidas sintéticos ou baseados em metais pesados, como cobre. Apesar de geralmente muito eficientes, estes métodos podem causar efeitos ambientais indesejáveis, e o emprego incorreto é um potencial fator para o desenvolvimento de cepas resistentes de patógenos. Alternativas de controle fúngico mais ambientalmente amigáveis vêm sendo intensamente buscadas, incluindo controle biológico e uso de produtos naturais biodegradáveis e com mecanismos diversos de ação (Rahman *et al.*, 2010). Neste contexto, a avaliação de extratos e frações enriquecidas em saponinas de *Q. brasiliensis* como agentes de controle de fungos fitopatogênicos representa uma linha de investigação relevante, levando-se em consideração sua baixa toxidez para humanos (Fleck *et al.*, 2006), biodegradabilidade e possível mecanismo geral sobre a funcionalidade de membranas biológicas (presumivelmente com menor probabilidade de desenvolvimento de resistência).

3) OBJETIVOS

a) Objetivo Geral

Avaliar a potencial atividade biológica do extrato e frações purificadas de saponinas de *Quillaja brasiliensis* na inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos.

b) Objetivos Específicos

Obter o extrato aquoso e duas frações purificadas de saponinas foliares de *Quillaja brasiliensis*;

Analisar a atividade antimicótica das saponinas através da medição do raio de crescimento dos fungos.

4) MATERIAIS E MÉTODOS

a) Biomassa Vegetal

Folhas de indivíduos adultos de *Quillaja brasiliensis* foram coletadas no município de Canguçu, RS, Brasil (31.3965° S, 52.6788° W). Estas folhas foram selecionadas de acordo com a sua saúde, integridade e ausência de contaminação por fungos ou outros parasitas. O material vegetal foi seco em estufa de ar circulante em temperatura abaixo de 40°C, triturado em moinho de facas e conservado em local ao abrigo de luz e umidade. Um voucher da espécie está depositado no herbário ICN da UFRGS (ICN 142953).

b) Extração de folhas

As folhas moídas e secas foram mantidas sob agitação *overnight* com água destilada na proporção 1:8 (m/v). A mistura foi deixada em repouso a fim de decantar o material vegetal, e a solução foi pré-filtrada em algodão e posteriormente em funil de Büchner com papel filtro duplo. O processo de agitação *overnight* e filtração foram repetidos utilizando o mesmo material vegetal, a fim de aumentar o rendimento do extrato. Foram misturadas ambas as soluções aquosas filtradas obtendo um volume total de 1500 mL, e foram adicionados 50 mL de solução de gelatina 2% com o objetivo de precipitar taninos condensados. Após a formação do precipitado, o extrato foi filtrado em funil de Büchner com papel filtro triplo. A solução resultante foi particionada em um funil de separação utilizando 200 mL de acetato de etila. A fase apolar foi descartada e a etapa de partição foi repetida ainda duas vezes. Foi feita uma pré-secagem em rotavapor a 45°C e posterior secagem completa em liofilizador, obtendo assim o extrato aquoso (EA) (Fleck *et al.*, 2006).

c) Purificação de saponinas

Nos experimentos de atividade antifúngica, foram utilizadas duas frações de saponina, denominadas QB-80 e QB-90, obtidas a partir do extrato aquoso. A fim de obter estas frações, o EA foi purificado através de cromatografia de fase reversa utilizando sílica Lichroprep[®] Merck RP-18 (40-63 µm) como fase estacionária, e

gradiente de solução aquosa de 0 a 100% de metanol como fase móvel. As alterações da fase móvel foram feitas modificando a sua concentração a cada 10%, e as frações de interesse foram coletadas em dois pontos específicos. Estas frações obtidas foram secas em rotavapor a 45°C e sua composição foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). A CCD foi executada em placas de alumínio revestidas por sílica gel tendo butanol:ácido acético:água (5:1:4, v/v/v) como fase móvel e anisaldeído-sulfúrico seguido de aquecimento como reagente de revelação (Fleck *et al.*, 2006).

d) Cultura de fungos

Fungos fitopatogênicos *Bipolaris micropus*, *Curvularia inaequalis* e *Fusarium incarnatum* foram cedidos pela Faculdade de Agronomia da UFRGS (Departamento de Fitossanidade – Prof^o José Martinelli). A escolha dos fungos utilizados no experimento foi dependente da disponibilidade destes no departamento de fitossanidade e por sua relevância como fitopatógenos. Culturas fúngicas foram mantidas no Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRGS em meio BDA (batata 140 g.L⁻¹, dextrose 10 g.L⁻¹, ágar 20 g.L⁻¹) com temperatura controlada (25 ± 3°C), sob ciclo de claro/escuro de 12h.

e) Avaliação de atividade antimicótica

Para os ensaios antifúngicos foram utilizadas quatro replicatas por tratamento por fungo. Os ensaios foram repetidos duas vezes de modo independente. Os tratamentos submetidos ao teste foram EA à base de saponina (4% e 40%, m/v), frações QB-80 (1% e 2%, m/v) e QB-90 (1% e 2%, m/v), controle negativo (água destilada) e controle positivo (Maxim XL[®] – 1 ppm). A escolha das concentrações de cada tratamento foi feita tendo como base outros estudos de atividade deterrente de saponinas realizados previamente pelo grupo. 200 µL dos diferentes tratamentos e controles foram separadamente distribuídos sobre as placas de Petri (25 mm de raio) contendo meio BDA solidificado, e deixado secar. Um fragmento de 2 mm de diâmetro do ágar contendo micélio ativo de cada fungo foi colocado no centro de cada placa, com o auxílio de uma lâmina de bisturi e uma pinça. As placas foram invertidas e incubadas a 25 °C ± 3°C sob ciclo de claro/escuro 12h, e os raios de crescimento foram medidos em milímetros após 4 e 7 dias de incubação.

f) Análise estatística

Os resultados foram analisados para distribuição normal e avaliados por ANOVA seguido de teste Tukey, utilizando o pacote estatístico Sisvar 5.6 para Windows.

5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 4 dias de experimento, nenhum dos tratamentos de extrato aquoso e frações de saponina mostraram diferença significativa na inibição do crescimento dos fungos analisados. O grupo correspondente ao controle negativo apresentou crescimento padrão, enquanto o controle positivo com fungicida comercial foi efetivo na inibição. Este dado sugere que as saponinas não atuam na fase inicial de desenvolvimento dos fungos, e sim nas fases posteriores. De fato, após 7 dias de experimento, foi observada inibição do crescimento dos fungos sob efeito de tratamento com saponinas e em alguns casos da concentração proposta, sendo observadas algumas diferenças no padrão de inibição entre os microorganismos analisados.

Bipolaris micropus apresentou inibição de crescimento quando submetido ao tratamento com uma das frações de saponina. QB-90 2% e 1% inibiram o crescimento do fungo em 68% e 58% respectivamente, comparado com o controle (Figura 3), confirmando ação fungicida das saponinas presentes na fração, conforme esperado para esta classe de metabolitos (Francis *et al.*, 2002). No entanto, estes tratamentos foram menos eficazes do que a referência positiva Maxim XL[®], cujo efeito inibitório foi praticamente 100%. Em relação à fração QB-80 e extrato aquoso, nenhuma das concentrações inibiu o crescimento do fungo de forma significativa (Figura 3). Isto indica que o nível de inibição do crescimento é dependente do tipo de extrato de saponina analisado. É possível que pequenas diferenças nas estruturas destes compostos possam interferir na sua bioatividade específica (Chapagain *et al.*, 2007). Esta propriedade pode também ser influenciada por especificidades de composição do extrato bruto e das diferentes frações enriquecidas em saponinas.

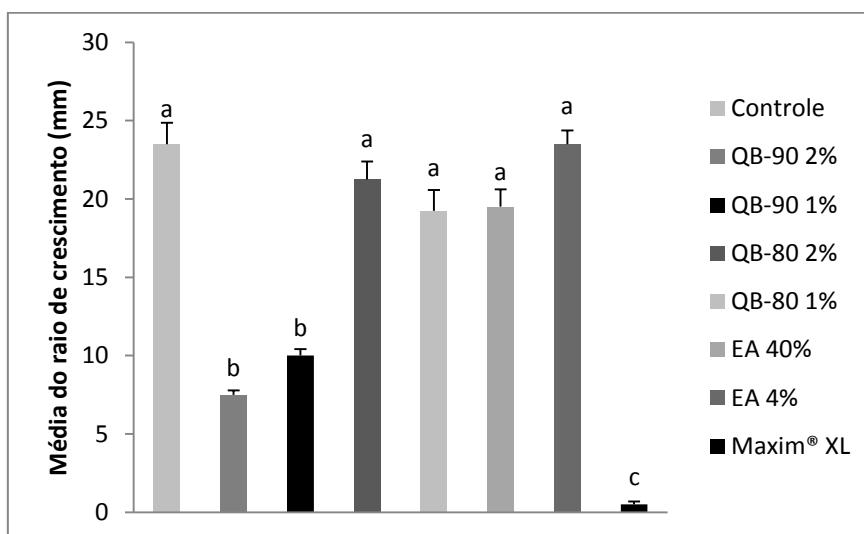


Figura 3. Raio de crescimento do fungo *B. micropus* após 7 dias incubação em ágar contendo EA ou frações de saponina de *Q. brasiliensis*. Os tratamentos foram formulados com frações (m/v) QB-90 2% ou 1%, QB-80 2% ou 1%, EA 40% ou 4%, Maxim® XL 1 ppm (controle positivo) ou água (controle negativo). As barras representam a média \pm erro padrão. As diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Similarmente, as análises com *Curvularia inaequalis* indicaram inibição de crescimento em 63% e 59%, comparado ao controle negativo, pelos tratamentos QB-90 2% e 1%, respectivamente, mas este efeito fungicida foi menos efetivo do que o antifúngico controle Maxim XL®. A menor concentração de QB-80 reduziu o crescimento fúngico em 25%, enquanto a maior concentração apresentou apenas 10% de inibição, sendo a primeira significativamente diferente do controle negativo (Figura 4). Portanto, em *C. inaequalis*, ambas as frações purificadas de saponina, QB-80 e QB-90, mostraram ação inibitória, embora a última tenha sido mais eficaz, o que está de acordo com os dados obtidos para *B. micropus*. Os tratamentos com extrato aquoso foram similares ao controle negativo (Figura 4). A ocorrência de atividade inibitória pela fração QB-80 em *C. inaequalis* e não em *B. micropus* indica que diferentes espécies apresentam diferentes sensibilidades a algumas frações de saponinas, talvez refletindo modos de ação distintos ou variações na composição das membranas biológicas (Chapagain *et al.*, 2007).

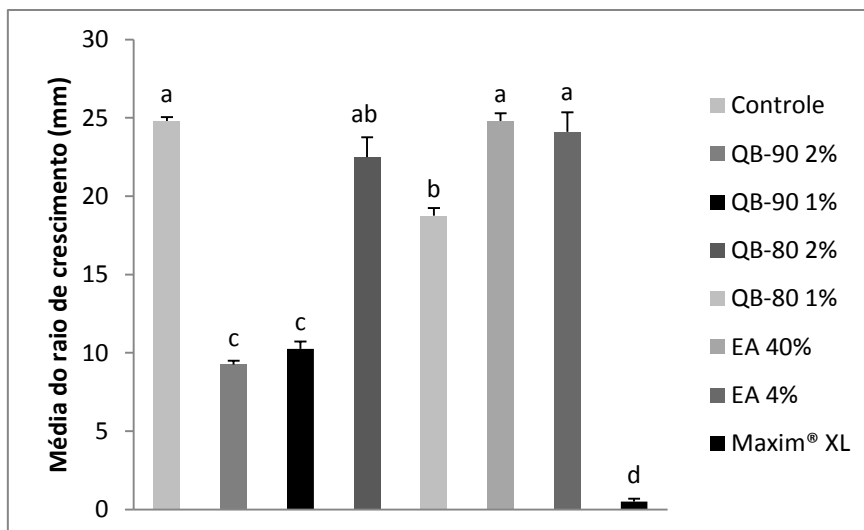


Figura 4. Raio de crescimento do fungo *C. inaequalis* após 7 dias incubação em ágar contendo EA ou frações de saponina de *Q. brasiliensis*. Os tratamentos foram formulados com frações (m/v) QB-90 2% ou 1%, QB-80 2% ou 1%, EA 40% ou 4%, Maxim® XL 1 ppm (controle positivo) ou água (controle negativo). As barras representam a média \pm erro padrão. As diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Foi observado um efeito dose dependente na inibição de crescimento do fungo *Fusarium incarnatum*. A maior concentração de QB-90 inibiu o seu crescimento em 60%, enquanto a menor concentração desta mesma fração de saponina inibiu o fungo em 13%, não apresentando efeito significativo (Figura 5). Efeito dose dependente já havia sido observado em estudos anteriores de ação bioativa de saponinas provenientes de outras espécies de plantas (Chapagain *et al.*, 2007; Sparg *et al.*, 2004). Entre a fração QB-80, os extratos e controle negativo não ocorreram diferenças significativas no crescimento (Figura 5).

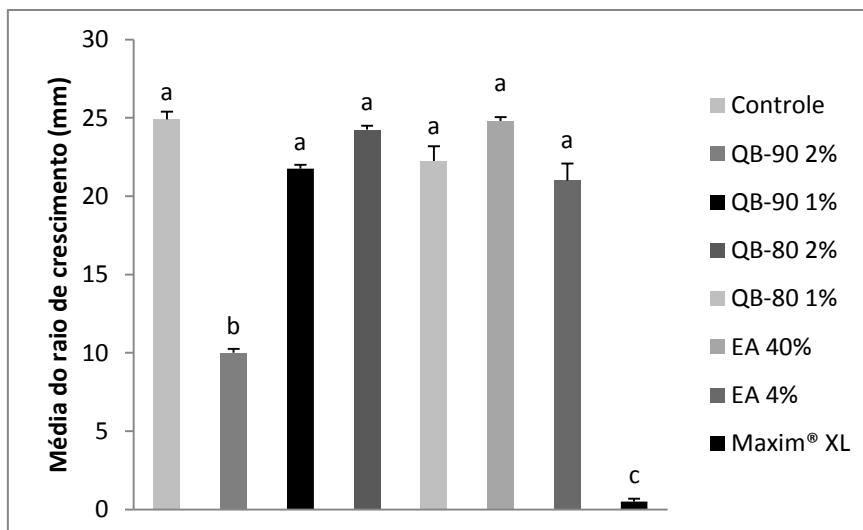


Figura 5. Raio de crescimento do fungo *F. incarnatum* após 7 dias incubação em ágar contendo EA ou frações de saponina de *Q. brasiliensis*. Os tratamentos foram formulados com frações (m/v) QB-90 2% ou 1%, QB-80 2% ou 1%, EA 40% ou 4%, Maxim® XL 1 ppm (controle positivo) ou água (controle negativo). As barras representam a média \pm erro padrão. As diferentes letras indicam diferença significativa pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

De forma geral, pode ser observado pelos ensaios aqui propostos que saponinas de folhas de *Q. brasiliensis* mostraram ter efeito inibitório no crescimento dos três fungos. Estes dados condizem com estudos anteriores que consideram as saponinas em geral como tendo ampla atividade antifúngica. Extratos de *Balanites aegyptiaca*, *Quillaja saponaria* e *Yucca schidigera*, inibiram o crescimento de alguns fungos patógenos de plantas (Chapagain *et al.*, 2007). Saponinas triterpenóides a partir de *Chenopodium quinoa* e diferentes espécies do gênero *Phytolacca* inibiram o crescimento de variados fungos patógenos de plantas e humanos. Demais extratos ricos nestes metabólitos secundários, incluindo as saponinas esteroidais, mostraram efeito fungicida contra *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis carinii*, entre outros patógenos (Sparg *et al.*, 2004).

Um mesmo extrato rico em saponinas pode apresentar efeitos distintos na atividade antifúngica diante de diferentes fungos. Por exemplo, extrato de *Balanites aegyptiaca* demonstra ter alta atividade inibitória contra *Pythium ultimum* e leve atividade estimulante contra *Colletotrichum coccodes*. A variação pode estar relacionada a mudanças na composição de esteróis e lipídeos de membranas das células

de diferentes fungos (Chapagain *et al.*, 2007). De fato, esta característica já foi relatada como possível causa de diferentes sensibilidades de fungos fitopatogênicos (e.g. *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium sambucinum*, *Pythium sulcatum*) ao lipopetídeo cíclico antimicrobiano fengicina de *Bacillus subtilis* CU12, com particular relevância atribuída a variações em conteúdo de ergosterol e fosfolípídeos aniônicos (Wise *et al.*, 2014). Saponinas de casca de *Q. saponaria* sabidamente interagem com componentes de membrana (De Groot & Müller-Goymann, 2016), o que é um forte indicativo que o mesmo possa ocorrer com as saponinas foliares de *Q. brasiliensis*, as quais são estruturalmente muito similares às da casca da espécie chilena. A associação das saponinas, principalmente com os esteróis, pode resultar em complexos que alteram a integridade da membrana celular fúngica e/ou causam a formação de poros transmembranares. A atividade fungicida de saponinas também pode estar relacionada com a sua estrutura, visto que o número, o tipo e a sequência de seus resíduos de açúcar possuem grande efeito nesta bioatividade (Morrissey & Osbourn, 1999; Sparg *et al.*, 2004).

Considerando o crescente aumento de doenças vegetais causadas por fungos fitopatogênicos, acoplado aos problemas ambientais e de resistência gerados pelo mau uso de fungicidas químicos, o desenvolvimento de novos mecanismos de controle destes patógenos se torna necessário. Uma boa alternativa de fungicidas são aqueles de origem natural, visto que podem apresentar menor toxicidade a outros organismos e baixo efeito residual no meio ambiente devido à biodegradabilidade. Como observado neste estudo, no entanto, seu espectro de ação não é sempre homogêneo para diferentes fungos, indicando a necessidade de usos específicos. Apesar disso, os três fitopatógenos examinados neste trabalho foram inibidos de modo significativo pela maior concentração de QB-90 avaliada (2% p/v). Em suma, as frações QB-90 2% e 1% apresentaram os melhores resultados de inibição de crescimento dos fungos *Bipolaris micropus* e *Curvularia inaequalis*, e QB-90 2% também inibiu *Fusarium incarnatum* de forma significativa. A fração QB-80 1% apresentou atividade apenas contra *C. inaequalis*. Os resultados indicam papel das saponinas de *Q. brasiliensis* na proteção contra fungos e potencial para seu uso como agentes no controle de fungos fitopatogênicos.

6) CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Saponinas provenientes de folhas de *Quillaja brasiliensis* mostraram efeito significativo na inibição de fungos filamentosos fitopatogênicos. Além de auxiliar na caracterização do papel *in planta* destes compostos, os dados presentes neste trabalho indicam a possível aplicação de saponinas como uma alternativa ambientalmente amigável para o controle de fungos patógenos de plantas, reduzindo a necessidade de aplicação de fungicidas químicos.

Este trabalho faz parte de um projeto mais amplo, cujo objetivo é o de analisar o potencial bioativo das saponinas como agentes deterrentes de herbívoros generalistas, bem como inibidores do crescimento de fungos. Estudos futuros visam avaliar o efeito de maiores concentrações de extrato aquoso no crescimento de fungos patógenos de plantas, bem como estudar a ação de extratos ricos em saponina frente a fungos patógenos de humanos.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARADASA, B. S.; AMUNDSEN, K. (2016). Transcriptome Profiling of Buffalograss Challenged with the Leaf Spot Pathogen *Curvularia inaequalis*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 715. doi:10.3389/fpls.2016.00715

AUGUSTIN, J. M.; KUZINA, V.; ANDERSEN, S. B.; BAK, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72(6): 435-457. doi:10.1016/j.phytochem.2011.01.015

BAKAR, A. I. A.; IZZATI, M. Z. N. A.; KALSOM, Y. U. (2013). Diversity of *Fusarium* Species Associated with Post-harvest Fruit Rot Disease of Tomato. *Sains Malaysiana*, 42(7): 911-920.

BOHLMANN, J.; KEELING, C. I. (2008). Terpenoid biomaterials. *The Plant Journal: for cell and molecular biology*, 54(4): 656-669. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03449.x

CARETTO, S.; LINSALATA, V.; COLELLA, G.; MITA, G.; LATTANZIO, V. (2015). Carbon Fluxes between Primary Metabolism and Phenolic Pathway in Plant Tissues under Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11): 26378-26394. doi:10.3390/ijms161125967

CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. (2014). Phylogenetic diversity of *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex isolated from Spanish wheat. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(2), 309-317. doi:10.1007/s10482-014-0200-x

CHAPAGAIN, B. P.; WIESMAN, Z.; TSROR, L. (2007). *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 26(2): 109-115. doi:10.1016/j.indcrop.2007.02.005

CIBULSKI, S. P.; SILVEIRA, F.; MOURGLIA-ETTLIN, G.; TEIXEIRA, T. F.; DOS SANTOS, H. F.; YENDO, A. C.; DE COSTA, F.; FETT-NETO, A. G.; GOSMANN, G.; ROEHE, P. M. (2016). *Quillaja brasiliensis* saponins induce robust humoral and cellular responses in a bovine viral diarrhoea virus vaccine in mice. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 45: 1-8. doi:10.1016/j.cimid.2016.01.004

DA CUNHA, K. C.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; CANO, J.; GENÉ, J.; MADRID, H.; DE HOOG, S.; CROUS, P. W.; GUARRO, J. (2012). Diversity of *Bipolaris* species in clinical samples in the United States and their antifungal susceptibility profiles. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12): 4061-4066. doi:10.1128/JCM.01965-12

DA CUNHA, K. C.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; GENÉ, J.; CANO, J.; MADRID, H.; HOOG, S. D.; CROUS, P. W.; GUARRO, J. (2013). *In vitro* antifungal susceptibility and molecular identity of 99 clinical isolates of the opportunistic fungal genus *Curvularia*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 76(2): 168-174. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.034

DE COSTA, F.; YENDO, A. C.; CIBULSKI, S. P.; FLECK, J. D.; ROEHE, P. M.; SPILKI, F. R.; GOSMANN, G.; FETT-NETO, A. G. (2014). Alternative inactivated poliovirus vaccines adjuvanted with *Quillaja brasiliensis* or Quil-a saponins are equally effective in inducing specific immune responses. *PLoS One*, 9(8): e105374. doi:10.1371/journal.pone.0105374

DE COSTA, F.; YENDO, A. C.; FLECK, J. D.; GOSMANN, G.; FETT-NETO, A. G. (2013). Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. *Plant Physiol Biochem*, 66: 56-62. doi:10.1016/j.plaphy.2013.02.003

DE GROOT, C.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. (2016). Saponin interactions with model membrane systems-Langmuir monolayer studies, hemolysis and formation of ISCOMs. *Planta Medica*, 82: 1496-1512. doi: 10.1055/s-0042-118387.

DINDA, B.; DEBNATH, S.; MOHANTA, B. C.; HARIGAYA, Y. (2010). Naturally occurring triterpenoid saponins. *Chemistry & Biodiversity*, 7(10): 2327-2580. doi:10.1002/cbdv.200800070

DIVAKARA, S. T.; SANTOSH, P.; AIYAZ, M.; RAMANA, M. V.; HARIPRASAD, P.; NAYAKA, S. C.; NIRANJANA, S. R. (2014). Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(6): 1132-1139. doi:10.1002/jsfa.6380

FLECK, J. D.; KAUFFMANN, C.; SPILKI, F.; LENCINA, C. L.; ROEHE, P. M.; GOSMANN, G. (2006). Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. *Vaccine*, 24(49-50): 7129-7134. doi:10.1016/j.vaccine.2006.06.059

FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H. P.; BECKER, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *The British Journal of Nutrition*, 88(6): 587-605. doi:10.1079/BJN2002725

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7): 408-414. doi:10.1038/nchembio.2007.5

GUPTA, O. P.; KARKUTE, S. G.; BANERJEE, S.; MEENA, N. L.; DAHUJA, A. (2017). Contemporary Understanding of miRNA-Based Regulation of Secondary Metabolites Biosynthesis in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8: 374. doi:10.3389/fpls.2017.00374

HONG, J.; YANG, L.; ZHANG, D.; SHI, J. (2016). Plant Metabolomics: An Indispensable System Biology Tool for Plant Science. *International Journal of Molecular Science*, 17(6). doi:10.3390/ijms17060767

KESSELMEIER, J.; URBAN, B. (1983). Subcellular localization of saponins in green and etiolated leaves and green protoplasts of oat (*Avena sativa* L.). *Protoplasma*, 114(1): 133-140. doi:10.1007/BF01279877

- KORKINA, L. G.; MAYER, W.; DE LUCA, C. (2017). Meristem Plant Cells as a Sustainable Source of Redox Actives for Skin Rejuvenation. *Biomolecules*, 7(2). doi:10.3390/biom7020040
- LAHOUAR, A.; MARIN, S.; CRESPO-SEMPERE, A.; SAÏD, S.; SANCHIS, V. (2017). Influence of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and production of ochratoxin A and zearalenone by toxigenic *Aspergillus tubingensis* and *Fusarium incarnatum* isolates in sorghum seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 242: 53-60. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.015
- LAMBERT, E.; FAIZAL, A.; GEELLEN, D. (2011). Modulation of triterpene saponin production: in vitro cultures, elicitation, and metabolic engineering. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(2): 220-237. doi:10.1007/s12010-010-9129-3
- LU, X.; TANG, K.; LI, P. (2016). Plant Metabolic Engineering Strategies for the Production of Pharmaceutical Terpenoids. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1647. doi:10.3389/fpls.2016.01647
- MANAMGODA, D. S.; CAI, L.; BAHKALI, A. H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. (2011). *Cochliobolus* : an overview and current status of species. *Fungal Diversity*, 51: 3-42. Retrieved from doi:10.1007/s13225-011-0139-4
- MANAMGODA, D. S.; ROSSMAN, A. Y.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K. D. (2014). The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*, 79: 221-288. doi:10.1016/j.simyco.2014.10.002
- MORRISSEY, J. P.; OSBOURN, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(3): 708-724.
- PACHECO MARINO, S. G.; CABELLO, M. N.; DINOLFO, M. I.; STENGLEIN, S. A.; SAPARRAT, M. C. N.; SALIBIÁN, A. (2016). Pathogenic ability and saline stress tolerance of two *Fusarium* isolates from *Odontesthes bonariensis* eggs. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(1): 13-20. doi:org/10.1016/j.riam.2015.02.005
- RAHMAN, A.; HOSSAIN, M. A.; KANG, S. C. (2010). Control of phytopathogenic fungi by the essential oil and methanolic extracts of *Erigeron ramosus* (Walt.) B.S.P. *European Journal of Plant Pathology*, 128(2): 211-219. doi:10.1007/s10658-010-9645-6
- RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11): 1720-1731. doi:10.4161/psb.6.11.17613
- RAMDIAL, H.; LATCHOO, R. K.; HOSEIN, F. N.; RAMPERSAD, S. N. (2017). Phylogeny and Haplotype Analysis of Fungi Within the *Fusarium incarnatum-equiseti* Species Complex. *Phytopathology*, 107(1):109-120. doi:10.1094/PHYTO-05-16-0209-R
- SHESHADRI, S. A.; NISHANTH, M. J.; SIMON, B. (2016). Stress-Mediated *cis*-Element Transcription Factor Interactions Interconnecting Primary and Specialized Metabolism in *planta*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1725. doi:10.3389/fpls.2016.01725

SHIBUYA, M.; KATSUBE, Y.; OTSUKA, M.; ZHANG, H.; TANSAKUL, P.; XIANG, T.; EBIZUKA, Y. (2009). Identification of a product specific beta-amyrin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 47(1): 26-30. doi:10.1016/j.plaphy.2008.09.007

SILVEIRA, F.; CIBULSKI, S. P.; VARELA, A. P.; MARQUÉS, J. M.; CHABALGOITY, A.; DE COSTA, F.; YENDO, A. C.; GOSMANN, G.; ROEHE, P. M.; FERNÁNDEZ, C.; FERREIRA, F. (2011). *Quillaja brasiliensis* saponins are less toxic than Quil A and have similar properties when used as an adjuvant for a viral antigen preparation. *Vaccine*, 29(49): 9177-9182. doi:10.1016/j.vaccine.2011.09.137

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3): 219-243. doi:10.1016/j.jep.2004.05.016

SZAKIEL, A.; PAĆZKOWSKI, C.; HENRY, M. (2011). Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants. *Phytochemistry Reviews*, 10(4): 471-491. doi:10.1007/s11101-010-9177-x

TAIZ, L.; ZEIGER, E. (2006). *Plant physiology* (4th ed.). New York: W. H. Freeman; Basingstoke : Palgrave [distribuidor].

VINCKEN, J. P.; HENG, L.; DE GROOT, A.; GRUPPEN, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68(3), 275-297. doi:10.1016/j.phytochem.2006.10.008

VRANOVÁ, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. (2012). Structure and dynamics of the isoprenoid pathway network. *Molecular Plant*, 5(2): 318-333. doi:10.1093/mp/sss015

WISE, C.; FALARDEAU, J.; HAGBERG, I.; AVIS, T.J. (2014). Cellular lipid composition affects sensitivity of plant pathogens to fengycin, an antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* strain CU12. *Phytopathology*, 104: 1036-1041. doi:10.1094/PHYTO-12-13-0336-R

YENDO, A. C.; DE COSTA, F.; CIBULSKI, S. P.; TEIXEIRA, T. F.; COLLING, L. C.; MASTROGIOVANNI, M.; SOULÉ, S.; ROEHE, P. M.; GOSMANN, G.; FERREIRA, F. A.; FETT-NETO, A. G. (2016). A rabies vaccine adjuvanted with saponins from leaves of the soap tree (*Quillaja brasiliensis*) induces specific immune responses and protects against lethal challenge. *Vaccine*, 34(20): 2305-2311. doi:10.1016/j.vaccine.2016.03.070

YENDO, A. C.; DE COSTA, F.; GOSMANN, G.; FETT-NETO, A. G. (2010). Production of plant bioactive triterpenoid saponins: elicitation strategies and target genes to improve yields. *Molecular Biotechnology*, 46(1): 94-104. doi:10.1007/s12033-010-9257-6

YENDO, A. C. A.; DE COSTA, F.; DA COSTA, C. T.; COLLING, L. C.; GOSMANN, G.; FETT-NETO, A. G. (2014). Biosynthesis of Plant Triterpenoid Saponins: Genes, Enzymes and their Regulation. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 11(3): 292-306. doi:org/10.2174/1570193X1103140915111425