

TIAGO COELHO DE ASSIS LAGE

**IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ESTUDO DE
BIOATIVIDADES DE INTERESSE AGROQUÍMICO E FARMACOLÓGICO
DE PLANTAS E LÍQUEN DA SERRA DO BRIGADEIRO – MG**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Agroquímica para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

L172i
2014 Lage, Tiago Coelho de Assis, 1981-
Identificação de metabólitos secundários e estudo de
bioatividades de interesse agroquímico e farmacológico de
plantas e líquen da Serra do Brigadeiro / Tiago Coelho de
Assis Lage. - Viçosa, MG, 2014.
xxxiv, 296f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Sergio Antonio Fernandes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.237-275.

1. Produtos naturais. 2. Óleos essenciais. 3. Fungicida.
4. Formicida. 5. Antioxidante. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Química. Programa de
Pós-graduação em Agroquímica. II. Título.

CDD 22. ed. 547.71

TIAGO COELHO DE ASSIS LAGE

**IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ESTUDO DE
BIOATIVIDADES DE INTERESSE AGROQUÍMICO E FARMACOLÓGICO
DE PLANTAS E LÍQUEN DA SERRA DO BRIGADEIRO – MG**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 10 de outubro de 2014.

Vanderlúcia Fonseca de Paula

João Paulo Viana Leite

Róbson Ricardo Teixeira

Erik Daemon de S. Pinto
(Coorientador)

Sergio Antonio Fernandes
(Orientador)

Dedico este trabalho a todos os meus mestres, dentre eles, meus pais e meus irmãos, que foram os pilares onde primeiramente me sustentei para erguer meus conhecimentos.

***“A natureza do mistério está na mente de
quem o contempla” (Marcelo Gleiser)”***

AGRADECIMENTOS

Esta para mim é a parte mais difícil desta tese. Nunca vou conseguir agradecer de maneira apropriada o auxílio daqueles que se envolveram direta e indiretamente durante o tempo em que passei pelo doutorado. Sem a ajuda destas pessoas eu não seria capaz de realizar este trabalho.

Agradeço a Deus e aos meus guias que me trouxeram inspiração e muita serenidade nos momentos mais difíceis pelos quais passei. Aos meus pais, José Ricardo e Marina, e meus irmãos, Matheus e Marco, que foram e sempre serão meu suporte e meu porto seguro. Também ao meu avô Joaquim Lage (*in memoriam*) e a minha Tia Milú que em muitos momentos também foram meus pais e sempre contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

A Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Química, CAPES, CNPq e FAPEMIG, por me permitirem realizar este trabalho.

Ao professor Sergio Fernandes que confiou no meu trabalho desde a primeira vez que o procurei em meados de 2010 com um projeto de baixo dos braços sobre produtos naturais e, mesmo não sendo a sua área de atuação, me aceitou como aluno. Eu não tenho como descrever o quanto sou grato a ele por ter me orientado, incentivado e muitas vezes ter feito o papel de irmão mais velho, me aconselhando e apontando o melhor caminho para realizar as coisas que eu almejava. Além de orientador o considero como um grande amigo.

Ao Ricardo Montanari, meu amigo mais próximo e praticamente meu coorientador. Sempre ao meu lado, não medindo esforços para auxiliar no planejamento, discussões científicas e produções acadêmicas que se originaram deste trabalho (também pela parceria etílica!).

Ao Prof. Erik Daemon da UFJF que me aceitou (um químico!) em seu Laboratório de Artrópodes Parasitos, onde aprendi muito sobre carrapatos e que posteriormente se tornou meu coorientador, me auxiliando e me orientando.

Tenho um profundo agradecimento a Camila Bauchspiess, que me deu sempre muito amor, companheirismo e foi fundamental para que eu conseguisse terminar este trabalho. Sem ela ao meu lado e o seu amor, praticamente incondicional, a vida seria muito triste.

Ao Prof. Laércio Zambolim pelos ensinamentos e conselhos que recebi ao longo desses anos, que desde os tempos de mestrado me permite utilizar seu laboratório para os testes contra fungos fitopatogênicos.

Ao Prof. Róbson Ricardo Teixeira, que sempre me ajudou com seus conselhos e conhecimentos em química orgânica, a quem admiro como um exemplo de professor.

A Profa. Terezinha Della Lucia que me abriu as portas do seu laboratório de formigas cortadeiras e me permitiu realizar os testes de atividade formicida.

A Profa. Luzia Modolo da UFMG que me recebeu no seu Grupo de Estudos em Bioquímica de Plantas e permitiu que eu realizasse parte dos testes de atividades antioxidante.

Ao Prof. Ângelo de Fátima da UFMG e a Dra. Luciana Silva da Fundação Ezequiel Dias que foram os responsáveis por realizar os testes de atividade antiproliferativa.

Ao Prof. Adão Sabino e a Profa. Rosemeire Brond da UFMG pela gentileza em obter os espectros de massas de alta resolução e pela realização dos experimentos de rotação específica, respectivamente.

Ao Prof. José Ricardo da UFG pela gentileza em realizar o experimento de Difração de Raios-X.

Gostaria de agradecer aos Professores Róbson Teixeira, Antonio Demuner e Ademar da Silva que muito contribuíram com suas valiosas sugestões para a finalização deste trabalho.

Aos membros da banca, Prof. Róbson Teixeira, Profa. Vanderlúcia Fonseca e Prof. João Paulo Leite. Suas contribuições serão fundamentais para o meu crescimento profissional.

Tenho um agradecimento imenso aos Professores Paulo Tostes, Ivoni de Freitas e Luisa del Carmen que foram os grandes responsáveis pelo início da minha caminhada científica.

Agradeço, em especial, a Profa. Mayura Rubinger, que foi minha orientadora de mestrado. Ela foi a responsável por me moldar e me dar base e confiança para seguir na carreira acadêmica. Sem o seu esforço naquela época eu não teria condições de me estabelecer como pesquisador.

Não posso me esquecer dos meus amigos do laboratório 428! A Natália Liberto, que ao longo de 14 anos tem sido minha companheira de bancada, desde os tempos de CEFET-MG, neste período me aturou e me brindou com sua amizade e valiosos conselhos. Ao Jefferson (Geraldão), que trabalhou comigo durante sua iniciação científica, tenho certeza que aprendi mais com ele do que ele comigo. A Maria do Socorro, pela amizade, pelos conselhos e ensinamentos sobre GC-MS. A Ju, pela amizade e pelas suas trapalhadas que sempre me divertiam, além da boa vontade de discutir espectros de RMN e química orgânica comigo.

Agradeço aos amigos João, Wagner, Angélica, Anyela, Diego, Cássia, Raíssa, Ruth, Ingredy, Francielle, Adalberto, Michelle, Poliana, Fabíola, Marcos, Sarah, Paula, Varejão e Eugênia pela paciência comigo durante estes anos e que fizeram meus dias mais felizes, mais engraçados e por estarem a todo o tempo dispostos a discutir resultados e tirar dúvidas.

Aos parceiros e amigos dos laboratórios pelo qual passei para realizar os diversos testes de atividade biológica: Ueder Lopes, Lívia Horta, Caio Monteiro, Viviane Zeringota, Tatiane Senra, Tatiane Lopes, Fernanda Calmon, Renata Matos, Ralph Maturano, Laila Gandra e Joel, vocês foram responsáveis por uma parte muito importante do meu crescimento profissional e por isso sou muito grato.

Aos Técnicos José Luiz, Márcio e Cristiane, que sempre solícitos me ajudaram bastante realizando boa parte das análises cromatográficas e espectroscópicas.

Aos funcionários do DEQ: Shyrlei, Irani, Heverton, Ademir, Karl, Eduardo, Chicão e todos os demais que sempre se empenharam em atender a todos nós.

Aos meus grandes amigos, que são os irmãos que pude escolher, que me acolheram em Viçosa e se tornaram minha família aqui desde 2008: Katalin, Firmino, Lílian, Vivi, Leandro, Rony, Marcos Túlio e Marcão.

Ao Eder Tavares, um dos meus melhores amigos e irmão que Viçosa me deu. Ao longo destes anos me ensinou muita coisa e dentre elas a valorizar a amizade verdadeira. Sempre me incentivou a buscar conhecimentos, acreditando que um dia, assim como ele, eu também veria a luz no fim do túnel.

Aos amigos Igor, Chipan, Pedroca, Jaca, Guto, Léo, Renan, Leandro e Nayane com quem tive o prazer de dividir uma república, que em diferentes etapas foram uma parte muito importante da minha vivência aqui em Viçosa.

A la Profesora Susana Zacchino de la Universidad Nacional de Rosario, que como una madre me acogió y me dio la dirección para hacer los ensayos contra los hongos patogénicos. Nunca podré corresponder a ella, como merecería, por todo que he aprendido en su grupo, por la amistad y por su generosidad conmigo.

A la profesora Marcela y el Profesor Maximiliano Sortino por la orientación sobre los hongos, por sacar mis dudas y por los acertados aportes que enriquecieron mi trabajo y también por la orientación sobre los vinos!

Al profesor Marcos Derita y Profesora Silvia López por sus valiosas sugerencias y por la amistad.

A las chicas muy queridas, Laura Svetaz, Estefanía Butassi y Agustina Postigo quiero expresar mi más sincero agradecimiento por el apoyo invaluable en el laboratorio y por la amistad. Yo he aprendido un montón con ustedes. Y a los amigos del laboratorio de farmacognosia: Nathalie, Mario, Pablo, Ayelen, Gastón, Sandra, Melina que han contribuido con mi trabajo brindándome su apoyo y amistad.

A los chicos de La Casa de Arriba: Juan Manuel, Juan Cruz, Nacho y Yael. Ustedes me hicieron sentirme como en mi casa, tengo una deuda de gratitud que nunca podré pagar. Para mí los considero como mis hermanos y siempre los voy a extrañar.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE TABELAS	xxvii
RESUMO.....	xxxi
ABSTRACT	xxxiii
1. Introdução Geral.....	1
2. Objetivos.....	6
3. Justificativa	7
<i>CAPÍTULO 1. ANÁLISE FITOQUÍMICA</i>	9
1. Introdução.....	10
1.1. Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – PESB.....	11
1.2. Espécies investigadas neste trabalho – Revisão de Bibliografia	13
1.2.1. <i>Lippia triplinervis</i> Gardner	13
1.2.2. <i>Baccharis dracunculifolia</i> DC e <i>Baccharis platypoda</i> DC.....	16
1.2.3. <i>Myrsine squarrosa</i> (Mez) M.F. Freitas & L.S. Kinoshita	23
1.2.4. <i>Cladonia rappii</i> A Evans.....	25
2. Materiais e Métodos	28
2.1. Parte Experimental	28
2.1.1. Cromatografia em camada delgada.....	28
2.1.2. Cromatografia preparativa em camada delgada	28
2.1.3. Cromatografia em coluna	28
2.1.4. Medidas das temperaturas de fusão	29
2.1.5. Medidas de rotação específica	29
2.1.6. Espectroscopia no infravermelho	29
2.1.7. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	29
2.1.8. Cromatografia Gasosa – GC/MS – GC/FID	30
2.1.9. Espectrometria de massas de alta resolução.....	30
2.2. Coleta das plantas e do líquen	31
<i>Lippia triplinervis</i> Gardner	32
<i>Baccharis platypoda</i> DC.....	32
<i>Myrsine squarrosa</i> (MEZ) M. F. Freitas & L. S. Kinoshita	32

<i>Cladonia rappi</i> A. Evans.	32
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC	32
2.3. Determinação da massa seca das espécies analisadas.....	32
2.4. Extração e análise do óleo essencial	33
2.5. Obtenção dos extratos brutos	34
2.6. Fluxogramas para os processos de obtenção dos extratos, frações e substâncias isoladas das espécies utilizadas neste trabalho ...	37
2.6.1. <i>Lippia triplinervis</i>	37
2.6.2. <i>Baccharis platypoda</i>	39
2.6.3. <i>Baccharis dracunculifolia</i>	41
2.6.4. <i>Myrsine squarrosa</i>	42
2.6.5. <i>Cladonia rappii</i>	44
2.7. Substâncias identificadas/isoladas	48
2.7.1. Timol (1).....	48
2.7.2. Carvacrol (2).....	50
2.7.3. (-)-(S)-Ácido úsnico (3)	51
2.7.4. Ácido fumarprotocetrárico (4).....	53
2.7.5. Sal de trietilamina do ácido fumarprotocetrárico (4a)	55
2.7.6. Ácido rappiidico (5).....	56
3. Resultados e Discussões	58
3.1. Óleos essenciais	58
3.1.1. <i>Lippia triplinervis</i> – LT	58
3.1.2. <i>Baccharis platypoda</i> - BP	63
3.2. Substâncias isoladas/identificadas	71
3.2.1. Timol (1) e Carvacrol (2) em <i>Lippia triplinervis</i>	71
3.2.2. Mistura de substâncias (MS2) em <i>Myrsine squarrosa</i>	77
3.2.3. (-)-(S)-Ácido úsnico (3) em <i>Cladonia rappii</i>	79
3.2.4. Ácido fumarprotocetrárico (4) em <i>Cladonia rappii</i>	90
3.2.5. Ácido rappiidico (5) em <i>Cladonia rappii</i>	101
4. Conclusões.....	114
CAPÍTULO 2. TESTES DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	115
1. Avaliação da Atividade Antifúngica contra Fungos Patogênicos .	116
1.1. Introdução	116
1.2. Materiais e Métodos	120
1.2.1. Microrganismos utilizados	121
1.2.2. Meios de cultura utilizados.....	122
1.2.3. Contagem dos microrganismos	123

1.2.4.	Metodologias de testes	125
1.2.5.	Microdiluição em Caldo (CIM e CIM ₅₀)	128
1.2.6.	Sinergismo e Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF)	130
1.3.	Discussão dos resultados.....	134
1.3.1.	Método de microdiluição em caldo (CIM e CIM ₅₀) e Bioautografia.....	134
1.3.2.	Sinergismo e Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF)	146
2.	Avaliação da Atividade Antifúngica contra Fungos Fitopatogênicos 153	
2.1.	Introdução	153
2.2.	Materiais e Métodos	160
2.2.1.	Fungos avaliados.....	160
2.2.2.	Preparo do meio de cultura para repicagem dos fungos.....	160
2.2.3.	Preparo do meio de cultura para o teste de atividade antifúngica	160
2.2.4.	Repicagem dos fungos	161
2.2.5.	Preparo das soluções de trabalho – Óleos essenciais, timol e carvacrol	161
2.2.6.	Preparo das soluções de trabalho – extratos, ácido úsnico e ácido fumarprotocetrárico	162
2.2.7.	Metodologia <i>Poisoned Food</i>	163
2.2.8.	Metodologia <i>Poisoned Food</i> adaptada	166
2.3.	Resultados e Discussões	170
2.3.1.	Método <i>Poisoned Food</i> e <i>Poisoned Food</i> adaptado	170
2.3.2.	Avaliação da toxicidade dos solventes aos fungos	172
2.3.3.	Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais, timol e carvacrol contra o fungo <i>Botrytis cinerea</i> utilizando a metodologia <i>Poisoned Food</i>	176
2.3.4.	Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais, timol e carvacrol contra o fungo <i>Colletotrichum acutatum</i> utilizando a metodologia <i>Poisoned Food</i> adaptada	178
2.3.5.	Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos das plantas e do líquen, do ácido úsnico e ácido fumarprotocetrárico contra o fungo <i>Colletotrichum acutatum</i> utilizando a metodologia <i>Poisoned food</i> adaptada	181
3.	Avaliação da Atividade Acaricida.....	184
3.1.	Introdução	184
3.2.	Materiais e Métodos	187
3.2.1.	Teste do pacote de larvas	187
3.2.2.	Teste de imersão de fêmeas	189
3.3.	Resultados e Discussões	191
4.	Avaliação da Atividade Formicida.....	200
4.1.	Introdução	200

4.2.	Materiais e Métodos	204
4.3.	Resultados e Discussões	206
5.	Avaliação da Atividade Antioxidante.....	215
5.1.	Introdução	215
5.2.	Materiais e Métodos	219
5.2.1.	Preparo das soluções	219
5.2.2.	Sequestro de superóxido	219
5.2.3.	Sequestro de DPPH	219
5.3.	Resultados e Discussões	220
6.	Avaliação da Atividade Antiproliferativa	228
6.1.	Introdução	228
6.2.	Materiais e Métodos	231
6.2.1.	Linhagens celulares.....	231
6.2.2.	Cultura das células	231
6.2.3.	Ensaio de atividade antiproliferativa	232
6.3.	Resultados e Discussões	233
7.	Conclusões.....	236
	Referências Bibliográficas	237
	Anexos.....	276
	Dados cristalográficos para o (-)-(S)-ácido úsnico (3).....	277
	Autorizações de Coleta	288
	Artigos.....	290
	Congressos.....	293

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%C	Percentual de controle
%IPO	Índice de produção de ovos
A	Acetona
AAC	Área Abaixo da Curva
AcOEt	Acetato de etila
ACP	Enzima Carreadora de grupo Acila
Ae	Acetato de etila
afl	<i>Aspergillus flavus</i>
afu	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Anfo	Anfotericina
ani	<i>Aspergillus niger</i>
ASG	Ágar Sabouraud-Glicose
ATCC	<i>American Type Culture Colection</i>
BD	<i>Baccharis dracunculifolia</i>
BDA	Batata-dextrose-ágar
BFS	enzima beta felandril sintase
BP	<i>Baccharis platypoda</i>
BPPG	<i>Baccharis platypoda</i> no Pico do Grama
BPPM	<i>Baccharis platypoda</i> no Pico do Mamute
C	Concentrações de trabalho
cal	<i>Candida albicans</i>
CAS	Chemical Abstract Service
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CEREMIC	Centro de Referência em Micología
CFM	Concentração Fungicida Mínima
cg	<i>Candida glabrata</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CIM₅₀	Concentração Inibitória Mínima para inibir 50%
ck	<i>Candida krusei</i>

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cn	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CoA	Coenzima A
cp	<i>Candida parapsilosis</i>
CR	<i>Cladonia rappi</i>
ct	<i>Candida tropicalis</i>
CT	constante de trabalho
d	Dupleto
D	Diclorometano
DCM	Diclorometano
Dept	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIC	Detector de ionização de chamadas
DMAPP	Dimetilalil Difosfato
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DMSO-<i>d</i>₆	Dimetil Sulfóxido Deuterado
DNA	Acido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazil
E	Etanol
E/mL	Esporos por mililitro
EACR	Fração de Acetato de Etila do extrato etanólico de <i>Cladonia rappii</i>
ECR	Extrato etanólico de <i>Cladonia rappii</i>
EM	Espectrometria de Massas
EPA	Agência de Proteção Ambiental Americana
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESD	Superóxido Dismutase
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FDS	Farnesil difosfato sintase
Fluco	Fluconazol
FM	Fórmula molecular

GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC/MS	Gas Chromatography – Mass Spectrometry
GC/FID	Gas Chromatography – Flame Ionization Detector
GDS	Geranil difosfato sintase
°GL	Graus Gay-Lussac
GPP	Geranil difosfato
GTS	Gama terpineno sintase
H	Hexano
HAc	Ácido acético
Hex	Hexano
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HTS	High Throughput Screening
Hz	Hertz
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionária
IEF	Instituto Estadual de Florestas
IER	Índice estimado de reprodução
IPP	Isopentenil difosfato
IR^A	Índice de retenção aritmético
IR^K	Índice de retenção de Kovats
IT	Ion Trap
Itra	Itraconazol
J	Constante de acoplamento
LCMS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LT	<i>Lippia triplinervis</i>
LTPG	<i>Lippia triplinervis</i> no Pico do Grama
LTPM	<i>Lippia triplinervis</i> no Pico do Mamute
M	Massa molar
M	Metanol
m/z	Relação massa/carga
mg	<i>Microsporum gypseum</i>
MHz	Mega Hertz
MS	<i>Myrsine squarrosa</i>

MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NBT	Nitroazul de tetrazólio
ND	Não detectado
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OPP	Pirofosfato
PE	Percentual de eclosão
PESB	Parque Estadual da Serra do Brigadeiro
PFA	Peso da fêmea antes da postura
PMO	Peso da massa de ovos
Ppm	Parte por milhão
<i>pt</i>	Pseudo tripleto
<i>q</i>	Quarteto
<i>p. quin</i>	<i>Pseudo</i> quinteto
Rf	Ratio front
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
SE	Enzima de ligação Tioéster
SIM	Monitoramento de íon Selecionado
SS	Sabineno sintase
TIC	Corrente Iônica Total
tm	<i>Trychophyton mentagrophytes</i>
TOF	Time of Flight
tr	<i>Trichophyton rubrum</i>
U/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UFG	Universidade Federal de Goiás
UNR	Universidad Nacional de Rosario
UR	Umidade relativa
VIC	Código do Herbário da Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral

Figura 1. Produtos naturais utilizados como medicamentos e agroquímicos. 3

Figura 2. Estratégia de síntese para a obtenção do análogo (Enol éter estilbeno mais estável devido à adição do grupo arila) a Estrobilurina A. AIBN = 2,2'-azobisisobutironitrila. NBS = *N*-bromosuccinimida. Produtos comerciais derivados de Estrobilurinas: Azoxystrobin e Kresoxim-metil. 4

Figura 3. Leptospermona e alguns análogos. 5

Capítulo 1

Figura 1.1. Localização do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro no estado de Minas Gerais. 11

Figura 1.2. Mapa de pré-zoneamento do PESB. 12

Figura 1.3. Metabólitos secundários encontrados no gênero *Lippia*. 15

Figura 1.4. *Lippia triplinervis* Gardner. 16

Figura 1.5. Espécies tóxicas de *Baccharis*. Na sequência, *B. halimifolia* (TOP TROPICALS, 2014); *B. megapotamica* (SCHNEIDER, 2014) e *B. coridifolia* (ROLIM, 2014). 18

Figura 1.6. Esqueleto tricoteceno (isotricodermol) e tricotecenos isolados em *Baccharis coridifolia* (DEWICK, 2009; VERDI et al., 2005). 18

Figura 1.7. Terpenóides mais comuns presentes nos óleos essenciais do gênero de *Baccharis*. 19

Figura 1.8. Principais classes de metabólitos secundários isolados de *Baccharis* spp. Gaudichaudona e gaudichaudol A isolados de *B. gaudichaudiana*. Ent-3,19-disucciniloxi-caur-16-eno (caurano) isolado de *Baccharis rufescens*. Luteolina (flavonóide) isolado de *Baccharis illinita*. Escopolina (cumarina glicosilada) isolada de *Baccharis tricuneata*. Ácido clorogênico (fenilpropanóide) isolado de *B. dracunculifolia*. 20

Figura 1.9. *Baccharis dracunculifolia*. 21

Figura 1.10. Alguns metabólitos secundários isolados de *B. dracunculifolia*. 21

Figura 1.11. *Baccharis platypoda*. 22

Figura 1.12. Alguns terpenos presentes no óleo essencial de <i>B. platypoda</i> .	23
Figura 1.13. Principais metabólitos secundários encontrados em Myrsinaceae. Ácido myrsinoico A (fenilpropanóide), quercetina (flavonóide), primulanina (saponina), <i>tachioside</i> (hidroquinona glicosilada), sulfato de isolarisiresinol (derivado de lignana), metilvilangina (benzoquinona).	24
Figura 1.14. <i>Myrsine squarrosa</i> .	24
Figura 1.15. Alguns metabólitos secundários encontrados em líquens.	26
Figura 1.16. <i>Cladonia rappii</i> A Evans.	27
Figura 1.17. Esquema da cromatografia líquida a vácuo	36
Figura 1.18. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos e frações de <i>L. triplinervis</i> (LT). O “x” indica que o processo não gerou material. (a) = hexano, três litros, sete dias. (b) = metanol, três litros, sete dias. (a1) = CLV, 16,1 g, hexano, dois litros. (a2) = CLV, diclorometano, dois litros. (a3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (a4) = CLV, metanol, dois litros. (b1) = 20,0 g, CLV, hexano, dois litros. (b2) = diclorometano, dois litros. (b3) = acetato de etila, dois litros. (b4) = metanol, dois litros.	38
Figura 1.19. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos e frações de <i>B. platypoda</i> (BP). O “x” indica que o processo não gerou material. (a) = hexano, três litros, sete dias. (b) = metanol, três litros, sete dias. (a1) = CLV, 20,0 g, hexano, dois litros. (a2) = CLV, diclorometano, dois litros. (a3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (a4) = CLV, metanol, dois litros. (b1) = CLV, 11,7 g, hexano, dois litros. (b2) = CLV, diclorometano, dois litros. (b3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (b4) = CLV, metanol, dois litros.	40
Figura 1.20. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos e frações de <i>B. dracunculifolia</i> (BD). (a) = etanol, quatro litros, sete dias. (a1) = CLV, 15,0 g, hexano, dois litros. (a2) = CLV, diclorometano, dois litros. (a3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (a4) = CLV, metanol, dois litros.	41
Figura 1.21. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos e frações de <i>M. squarrosa</i> (MS). (a) = hexano, três litros, sete dias. (b) = metanol, três litros, sete dias. (a1) = CLV, 20,0 g, hexano, dois litros. (a2) = CLV, diclorometano, dois litros. (a3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (a4) = CLV, metanol, dois litros. (b1) = CLV, 15,0 g, hexano, dois litros. (b2) = CLV, diclorometano, dois litros. (b3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (b4) = CLV, metanol, dois litros.	43

Figura 1.22. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos, frações e do ácido úsnico isolado de <i>C. rappii</i> (CR). (a) = etanol 96 °GL, três litros, sete dias. (a1) = CLV, 19,7 g, hexano, dois litros. (a2) = CLV, diclorometano, dois litros. (a3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (a4) = CLV, metanol, dois litros. (a3.1) = CC, 1,0 g, hexano:AcOEt:acetona:ácido acético – 70:35:10:10.	45
Figura 1.23. Fluxograma para a obtenção do extrato, frações e substâncias isoladas de <i>Cladonia rappii</i> . (a) = acetona, 600 mL, sete dias, agitador orbital. (a1) = Freezer, - 10 °C, 12 horas. (a2) = Freezer, -10 °C, 12 horas. (b) = CLV, hexano, dois litros. (c) = CLV, diclorometano, dois litros. (d) = CLV, acetato de etila, dois litros. (e) = CLV, metanol, dois litros.	47
Figura 1.24. Esquema da biossíntese de terpenos e terpenóides, adaptado de Aharoni et al., 2005 e Dewick, 2009.	61
Figura 1.25. Proposta de biossíntese para o timol (1) e carvacrol (2).	62
Figura 1.26. Rota de biossíntese para o sabineno.	65
Figura 1.27. Rota de biossíntese para o β -felandreno.	65
Figura 1.28. Biossíntese do nerolidol.	68
Figura 1.29. Monoterpenos e fenilpropanóide identificados neste trabalho com seus respectivos índices aritméticos descritos por Adams (2007).	69
Figura 1.30. Demais terpenóides identificados neste trabalho com seus respectivos índices aritméticos descritos por Adams (2007).	70
Figura 1.31. Placa de CCD para T=timol, C=carvacrol, T/C=co-aplicação de timol e carvacrol. HLT = Extrato bruto em hexano para <i>L. triplinervis</i> . (eluente = hexano/AcOet – 9,8:0,2 - v/v). Revelador: Radiação ultravioleta.	71
Figura 1.32. Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de timol (1) (azul) e carvacrol (2) (vermelho) e do extrato bruto HLT (preto).	72
Figura 1.33. Espectros de massas (GC/MS-EI) do timol (1) e do carvacrol (2) obtidos no modo SIM.	73
Figura 1.34. Proposta mecanística para as fragmentações do timol (1) e carvacrol (2).	74
Figura 1.35. Curva de calibração obtida para as soluções de timol (1).	75

Figura 1.36. Curva de calibração obtida para as soluções de carvacrol (2).	75
Figura 1.37. Placas de CCD para as frações de HMS . Placa 1, eluente hexano:AcOEt 9:1; Placa 2, eluente hexano:AcOEt 6:1; Placa 3, eluente hexano:AcOEt 3:1; Placa 4, eluente hexano:AcOEt 1:1. 1 = HHMS , 2= HDMS , 3 = HAeMS , 4 = HMMS . Revelador: Vanilina ácida.	77
Figura 1.38. Cromatograma (GC-MS/EI) para a mistura MS2 .	78
Figura 1.39. Placas de CCD para as frações de ECR . Placa 1, eluente hexano:AcOEt 9:1; Placa 2, eluente hexano:AcOEt 6:1; Placa 3, eluente hexano:AcOEt 3:1; Placa 4, eluente hexano:AcOEt 1:1. 1 = EHCR , 2= EDCR , 3= EAeCR , 4= EMCR . Revelador: Vanilina ácida. Em detalhe a substância 4 (mancha azul).	79
Figura 1.40. Espectro no infravermelho do (-)-(S)-ácido úsnico (3) (Reflectância/ $\lambda_{\max}$).	81
Figura 1.41. Espectro de RMN de ^1H do (-)-(S)-ácido úsnico (3) (300 MHz, CDCl_3 - δ_{CHCl_3} 7,26).	83
Figura 1.42. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 - δ_{CHCl_3} 77,0) (-)-(S)-ácido úsnico (3).	84
Figura 1.43. Espectro de massas de alta resolução em modo negativo para 3 (LCMS-IT-TOF, Shimadzu).	86
Figura 1.44. Diagrama ORTEP obtido para 3.	87
Figura 1.45. Estruturas para o (-)-(S)-ácido úsnico (3) e (+)-(R)-ácido úsnico.	89
Figura 1.46. Esquema da biossíntese do ácido úsnico.	90
Figura 1.47. Placas de CCD para as frações de ECR . Placa 1, eluente hexano:AcOEt 9:1; Placa 2, eluente hexano:AcOEt 6:1; Placa 3, eluente hexano:AcOEt 3:1; Placa 4, eluente hexano:AcOEt 1:1. 1 = EHCR , 2= EDCR , 3= EAeCR , 4= EMCR . Revelador: Vanilina ácida. Em detalhe a substância 4 (mancha negra, próxima a linha).	91
Figura 1.48. Espectro no infravermelho do ácido fumarprotocetrárico (4) (Reflectância/ $\lambda_{\max}$).	92
Figura 1.49. A) Espectro de RMN de ^1H do ácido fumarprotocetrárico (4) (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ - $\delta_{(\text{CD}_3)_2\text{SO}}$ = 2,49). B) Espectro de RMN de ^1H do sal de trietilamina do ácido fumarprotocetrárico (4a) (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ - $\delta_{(\text{CD}_3)_2\text{SO}}$ = 2,49).	94

Figura 1.50. Espectro de RMN de ^{13}C do ácido fumarprotocetrário (4) (75 MHz, DMSO- d_6 , $\delta_{(\text{CD}_3)_2\text{SO}} = 39,5$).	96
Figura 1.51. Espectro de massas de alta resolução em modo negativo para o ácido fumarprotocetrário 4 (LCMS-IT-TOF, Shimadzu).	98
Figura 1.52. Rota biossintética para o ácido fumarprotocetrário (4).	100
Figura 1.53. Análise por CCD (DCM:Hex – 2:1) das frações I a VIII obtidas após a purificação de ADCR por cromatografia em coluna. A fração VIII foi identificada como o ácido úsnico após a comparação com o R_f do ácido úsnico (3) isolado anteriormente. Revelador: Vanilina ácida.	101
Figura 1.54. A – Mancha IV desdobrada em duas manchas após o isolamento por cromatografia em coluna (HEX: CHCl_3 :Acetona – 10:1:0,5) e mancha IV-A purificada. B – Mancha IV-A desdobrada em quatro novas manchas após a aplicação de um novo sistema eluente (HEX: CHCl_3 :Acetona – 15:1:0,5) em detalhe mancha IV-A-2. C – Mancha IV-A-2 desdobrada em três novas manchas após a aplicação do sistema eluente (Tolueno:HAc – 200:30), no detalhe a mancha IVA-2-1. D – Composto 5 (IVA-2-1) isolado por cromatografia em camada preparativa (Tolueno:HAc – 200:30).	102
Figura 1.55. Espectro no infravermelho do ácido rapiidico (5) (Reflectância/ λ_{max}).	103
Figura 1.56. Espectro de RMN de ^1H do ácido rapiidico (5) (300 MHz, CDCl_3 - δ_{CHCl_3} 7,26).	105
Figura 1.57. Mapa de contornos COSY (300 MHz, CDCl_3) para o composto 5.	106
Figura 1.58. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 - δ_{CHCl_3} 77,0) do ácido rapiidico (5).	108
Figura 1.59. Espectro de DEPT-135 (75 MHz, CDCl_3) do ácido rapiidico (5).	108
Figura 1.60. Mapa de contornos HETCOR do ácido rapiidico 5 (75 x 300 MHz, CDCl_3).	109
Figura 1.61. Espectro de massas (GC-MS/EI) para o ácido rapiidico 5.	110
Figura 1.62. Proposta mecanística para a fragmentação do ácido rapiidico (5) até o fragmento correspondente ao pico do íon molecular.	111

Figura 1.63. Esquema mostrando o intermediário chave, ácido olivetólico, presente na biossíntese do ácido tetrahydrocannabinólico e também como intermediário na proposta de biossíntese do ácido rappiídico (5).	113
--	------------

Capítulo 2

Figura 2.1. Esquema de uma célula de um fungo e seus principais sítios de ação para drogas antifúngicas (adaptado de MATHEW, NATH; 2009).	117
--	------------

Figura 2.2. Moléculas que atuam nos principais sítios de ação da célula do fungo.	118
--	------------

Figura 2.3. Alguns antifúngicos naturais.	119
--	------------

Figura 2.4. Câmara de Neubauer vista do microscópio. Destaque para a região central da placa onde foi realizada a contagem das leveduras.	124
--	------------

Figura 2.5. Câmara de Neubauer vista do microscópio. Destaque para as regiões “a” onde foi realizada a contagem dos conídios.	125
--	------------

Figura 2.6. Placa de sílica-gel utilizada para Bioautografia sem migração da fase móvel.	126
---	------------

Figura 2.7. Placa cromatográfica com migração da fase móvel. Em “A” detalhe para a co-aplicação entre 3 e 4 (estas substâncias foram aplicadas após o processo de migração da fase móvel).	127
---	------------

Figura 2.8. Placa de 96 poços utilizada para o ensaio.	129
---	------------

Figura 2.9. Montagem da placa de 96 poços para o ensaio de sinergismo/determinação de ICIF.	132
--	------------

Figura 2.10. a) Células leveduriformes de <i>C. neoformans</i> (UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2014a) b) Cabeça conidial de <i>A. niger</i> na ponta de uma hifa (UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2014b).	135
---	------------

Figura 2.11. a) Cultura de <i>C. neoformans</i> , destaque para as colônias pequenas e lisas (UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2014c). b) Cultura de <i>A. niger</i> , destaque para as colônias algodonosas e com esporos coloridos (UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2014d).	136
---	------------

Figura 2.12. Redução de MTT a formazana pelos processos mitocondriais.	143
---	------------

Figura 2.13. A) Bioautografia direta sem desenvolvimento de ECR nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL (de baixo para cima). B) Bioautografia direta com desenvolvimento da placa para o extrato bruto (ECR), o extrato bruto diluído, 3 , 4 e após o desenvolvimento cromatográfico foi realizada uma co-aplicação entre 3 e 4 .	144
Figura 2.14. Curva de dose-resposta obtida para realizar o cálculo do valor de IC ₅₀ para ECR contra o fungo <i>Candida albicans</i> (cal). IC ₅₀ = 217 µg/mL.	145
Figura 2.15. Placa de 96 poços utilizada para análise dos efeitos de combinação entre os antifúngicos e 4 e ECR . Placa de <i>C. albicans</i> x fluco + ECR100.	146
Figura 2.16. Curvas de dose-resposta para o ensaio de combinação entre fluconazol e ECR contra <i>C. albicans</i> .	151
Figura 2.17. (A) Sintomas típicos de antracnose em amêndoas, onde é possível observar um fruto menor coberto por esporos do fungo e uma lesão circular na parte superior do fruto maior (PERES et al., 2005). (B) Conídios de <i>C. acutatum</i> .	156
Figura 2.18. (A) Morango infectado por <i>B. cinerea</i> sobre morangos, principal sintoma da doença conhecida como mofo cinzento (WILLIAMSON et al., 2007). (B) Conídios de <i>B. cinerea</i> .	157
Figura 2.19. Principais classes de fungicidas.	159
Figura 2.20. Placa de Petri contendo o fungo <i>B. cinerea</i> . No detalhe, ilustração de como seriam cortados os discos de 6,0 mm de diâmetro do micélio do fungo.	164
Figura 2.21. Placa de Petri contendo, ao centro, o disco de micélio de 6,0 mm cortado da extremidade do fungo <i>B. cinerea</i> .	164
Figura 2.22. Placa de Petri contendo o fungo <i>B. cinerea</i> . No detalhe, ilustração de como são realizadas as medidas do diâmetro da colônia durante o teste.	165
Figura 2.23. A esquerda, a estrutura de uma câmara de Neubauer vista ao microscópio. Em destaque (setas vermelhas), o local onde foram contados os esporos dos fungos para realizar o teste <i>Poisoned Food</i> adaptado. A direita, esporos de <i>C. acutatum</i> vistos na câmara de Neubauer (LAGE, 2011e).	167
Figura 2.24. Ilustração de como foram realizados os cortes dos discos de micélio de 6,0 mm na placa de <i>C. acutatum</i> .	168
Figura 2.25. Ilustração de como foram realizadas as medidas do halo de crescimento em <i>C. acutatum</i> a cada 24 horas por um período de 96 horas.	169

Figura 2.26. Gráficos de inibição do crescimento micelial de <i>B. cinerea</i> por etanol e dimetilsulfóxido após dois dias e de <i>C. acutatum</i> após cinco dias. O controle positivo (Ctrl +) foi preparado utilizando uma solução do antifúngico Rovral® em DMSO, na concentração de 1000 ppm para <i>B. cinerea</i> e de Folicur® nas mesmas condições para <i>C. acutatum</i> .	173
Figura 2.27. Gráficos de inibição de crescimento micelial (toxicidade) das soluções de Tween 80® + etanol – 1:1 e Tween 80® + DMSO – 1:1 contra <i>B. cinerea</i> e <i>C. acutatum</i> . O controle positivo (Ctrl +) foi preparado utilizando uma solução do antifúngico Rovral® em DMSO, na concentração de 1000 ppm para <i>B. cinerea</i> e de Folicur® nas mesmas condições para <i>C. acutatum</i> .	175
Figura 2.28. Gráfico da inibição do crescimento micelial de <i>B. cinerea</i> pelos óleos essenciais das plantas utilizadas neste trabalho, timol e carvacrol. LT = <i>Lippia triplinervis</i> , TIM = timol (1), CAR = carvacrol (2), BP = <i>Baccharis platypoda</i> , BD = <i>Baccharis dracunculifolia</i> , ROV = Rovral®.	177
Figura 2.29. Gráfico da inibição do crescimento micelial de <i>C. acutatum</i> pelos óleos essenciais das plantas utilizadas neste trabalho, timol e carvacrol. LT = <i>Lippia triplinervis</i> , TIM = timol (1), CAR = carvacrol (2), BP = <i>Baccharis platypoda</i> , BD = <i>Baccharis dracunculifolia</i> , FOL = Folicur®.	179
Figura 2.30. Áreas abaixo da curva de inibição do crescimento micelial de <i>B. cinerea</i> e <i>C. acutatum</i> para o óleo essencial de <i>L. triplinervis</i> (LT) e seus constituintes majoritários, timol (TIM) e carvacrol (CAR).	180
Figura 2.31. Gráfico da atividade antifúngica dos extratos e substâncias testados contra <i>C. acutatum</i> . As substâncias isoladas 3 e 4 foram testadas na concentração de 2,0 mmol.L ⁻¹ . Os extratos e o controle positivo foram testados na concentração de 1000 µg/mL.	182
Figura 2.32. Fêmea ingurgitada do carrapato <i>R. microplus</i> (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). No detalhe um macho desta espécie. (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2014).	184
Figura 2.33. Ciclo biológico dos carrapatos <i>R. microplus</i> (BRITTO et al., 2006).	185
Figura 2.34. Principais acaricidas sintéticos encontrados no mercado.	186
Figura 2.35. Etapas da confecção dos pacotes de larvas.	188
Figura 2.36. Contagem das larvas utilizando uma ponteira de micropipeta adaptada a uma bomba de vácuo.	188

Figura 2.37. Etapas do teste de imersão de fêmeas ingurgitadas. No sentido horário: A) Imersão das fêmeas na solução do óleo essencial; B) fêmeas em decúbito dorsal para acompanhamento da postura; C) armazenamento em câmara climatizada; D) coleta dos ovos e armazenamento em uma seringa.	189
Figura 2.38. Terpenos que possuem atividade acaricida.	196
Figura 2.39. Estrutura do GABA.	197
Figura 2.40. GABA ligado à proteína transmembrana regulando os canais de Cl ⁻ . Estruturas do dieldrin e fipronil.	198
Figura 2.41. <i>Atta sexdens rubropilosa</i> (saúva-limão ou formiga cortadeira).	201
Figura 2.42. Fungo <i>L. gongylophorus</i> em uma colônia de <i>A. sexdens</i> . No detalhe uma folha sendo trazida para ser utilizada como substrato pelo fungo.	202
Figura 2.43. Feromônios de formigas cortadeiras. Destaque para (<i>R</i>)-(+)-limoneno e geranial que são os responsáveis pelo cheiro característico de limão liberado em formigas da espécie <i>A. sexdens</i> quando estas são esmagadas.	203
Figura 2.44. Formicidas disponíveis no mercado na forma de iscas granuladas.	203
Figura 2.45. Foto do momento da aplicação de uma das soluções de trabalho ao pronoto de <i>A. sexdens</i> (esquerda). À direita, placa de Petri perfurada por tubos contendo algodão por onde foram fornecidas a alimentação e água.	204
Figura 2.46. Visão geral da montagem dos testes de atividade formicida.	205
Figura 2.47. Probabilidade de sobrevivência para as formigas tratadas com as soluções em acetona de LTPM nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL. Os valores mais próximos de 1,0 indicam maior probabilidade de sobrevivência, enquanto os valores mais próximos de 0,0 (zero) indicam maior probabilidade de mortalidade.	209
Figura 2.48. Probabilidade de sobrevivência para as formigas tratadas com as soluções de timol (1) em acetona nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL.	208
Figura 2.49. Probabilidade de sobrevivência para as formigas tratadas com as soluções de carvacrol (2) em acetona nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL.	208

Figura 2.50. Probabilidade de sobrevivência para as formigas tratadas com as soluções do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> (superior) e de nerolidol (inferior) nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL.	209
Figura 2.51. Substâncias isoladas de plantas com atividade contra formigas cortadeiras.	211
Figura 2.52. Probabilidade de sobrevivência para as formigas tratadas com as soluções do extrato bruto hexânico de <i>Myrsine squarrosa</i> (MS) nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL.	212
Figura 2.53. Probabilidade de sobrevivência para as formigas tratadas com as soluções de HDMS (superior) e de HAeMS (inferior) nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL.	213
Figura 2.54. Radical DPPH.	217
Figura 2.55. Redução do NBT a formazana.	217
Figura 2.56. Substâncias avaliadas quanto a capacidade de sequestrar radicais livres. O resveratrol foi utilizado como controle positivo.	220
Figura 2.57. Gráfico da capacidade do (-)-(S)-ácido úsnico (3), ácido fumarprotocetrárico (4), ácido rappiidico (5) e (+)-(R)-ácido úsnico (6) em sequestrar o radical superóxido comparada com a capacidade do resveratrol.	221
Figura 2.58. Gráfico da capacidade do (-)-(S)-ácido úsnico (3), ácido fumarprotocetrárico (4), ácido rappiidico (5) e (+)-(R)-ácido úsnico (6) em sequestrar o radical DPPH.	222
Figura 2.59. Processo de redução dos radicais livres por flavonóides catecólicos.	223
Figura 2.60. Estrutura básica de um flavonóide e estruturas do kaempferol e quercetina.	224
Figura 2.61. Proposta de mecanismo para a redução de radicais livres por grupos –OH nas posições 1,3; levando a uma estrutura <i>instável</i> .	225
Figura 2.62. Estabilização do radical do ácido úsnico por deslocalização eletrônica (a e b) e por doação de densidade eletrônica (c).	226
Figura 2.63. Estabilização do radical do ácido fumarprotocetrárico por deslocalização eletrônica.	226
Figura 2.64. Ciclo celular e suas fases.	228

Figura 2.65. Substâncias extraídas de plantas que são utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer.	230
Figura 2.66. Estruturas das lignanas ariltetralínicas podofilotoxina e etoposídeo.	234
Figura 2.67. Metabólitos de líquen que possuem atividade antitumoral.	235

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1.1. Espécies estudadas neste trabalho. As coordenadas superiores são referentes à coleta realizada no Pico do Mamute e os inferiores ao Pico do Grama, ambos no PESB. <i>Baccharis dracunculifolia</i> foi coletada no Campus da UFV-MG	32
Tabela 1.2. Resumo dos códigos utilizados para as plantas, óleos essenciais, extratos, frações e substâncias isoladas	48
Tabela 1.3. Constituintes presentes (%) nos óleos essenciais de <i>L. triplinervis</i> (LTPM e LTPG)	59
Tabela 1.4. Constituintes presentes (%) nos óleos essenciais de <i>B. platypoda</i> (BPPM e BPPG)	63
Tabela 1.5. Constituintes presentes (%) no óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> (BD)	66
Tabela 1.6. Concentração de timol (1) e carvacrol (2) presentes nos extratos e frações de <i>L. triplinervis</i> (LT)	76
Tabela 1.7. Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C de 3 e do ácido úsnico descrito na literatura* (RASHID et al., 1999 – obtido em CDCl_3).	85
Tabela 1.8. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de 4, 4a e do ácido fumarprotocetrárico e seu respectivo sal de trietilamina descritos na literatura (*SU et al., 2003)	97
Tabela 1.9. Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{13}C , Dept e as correlações em duas dimensões para COSY e HETCOR de 5	110

Capítulo 2

Tabela 2.1. Concentração das soluções de trabalho/concentração máxima atingida ao final do teste (µg/mL) dos antifúngicos Itraconazol (Itra), Anfotericina (Anfo), Fluconazol (Fluco) e do ácido fumarprotocetrárico (4) utilizados contra as cepas ATCC de <i>Candida albicans</i> (Ca) e <i>Cryptococcus neoformans</i> (Cn)	130
Tabela 2.2. Concentração das soluções de trabalho/concentração máxima atingida ao final do teste (µg/mL) dos antifúngicos Itraconazol (Itra), Anfotericina (Anfo), Fluconazol (Fluco) e do extrato bruto em etanol de <i>Cladonia rappii</i> (ECR) utilizados contra as cepas ATCC de <i>Candida albicans</i> (Ca) e <i>Cryptococcus neoformans</i> (Cn)	130
Tabela 2.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos óleos essenciais, extratos e frações de <i>Lippia triplinervis</i> (LT) contra os fungos testados	137
Tabela 2.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais, extratos e frações de <i>Baccharis platypoda</i> (BP) contra os fungos testados	139
Tabela 2.5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos óleos essenciais, extratos e frações de <i>Baccharis dracunculifolia</i> (BD1) contra os fungos testados	141
Tabela 2.6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos extratos, frações e substâncias de <i>Cladonia rappii</i> (CR) contra os fungos testados	142
Tabela 2.7. Valores de CIM ₅₀ (µg/mL) dos extratos, frações e substâncias de <i>Cladonia rappii</i> (CR) contra as leveduras testadas	145
Tabela 2.8. Valores de CIM ₅₀ da curva de dose-resposta obtida para cada tratamento. Valores de ICIF calculados com base nos dados adquiridos no ensaio de combinação entre os antifúngicos e ECR contra <i>C. neoformans</i>	148

Tabela 2.9. Valores de CIM ₅₀ da curva de dose-resposta obtida para cada tratamento. Valores de ICIF calculados com base nos dados adquiridos no ensaio de combinação entre os antifúngicos e 4 contra <i>C. neoformans</i>	149
Tabela 2.10. Valores de CIM ₅₀ da curva de dose-resposta obtida para cada tratamento. Valores de ICIF calculados com base nos dados adquiridos no ensaio de combinação entre os antifúngicos e ECR contra <i>C. albicans</i>	150
Tabela 2.11. Valores de CIM ₅₀ da curva de dose-resposta obtida para cada tratamento. Valores de ICIF calculados com base nos dados adquiridos no ensaio de combinação entre os antifúngicos e 4 contra <i>C. albicans</i>	152
Tabela 2.12. Principais fitopatógenos encontrados no Brasil, doenças que causam, sintomas e perdas nos diversos cultivares brasileiros. (BAIBI-PEÑA et al., 2006; OLIVEIRA, 2007; POZZA et al., 2001; KIMATI et al., 2005; GRIFFITHS et al., 1971; MARIN et al., 2003; COSTA, 2002; ALVES; DEL PONTE, 2009; FUGUEIRA et al., 2003; TATAGIBA et al., 2002; ZAMBOLIM et al., 2007; ROBERTSON, 2005, KRCMERY et al., 1997; WILLIAMSON et al., 2007).	155
Tabela 2.13. Ocorrência de resistência contra fungicidas (DEISING et al., 2008)	158
Tabela 2.14. Inibição do crescimento micelial (%) de <i>B. cinerea</i> após quatro dias	177
Tabela 2.15. Inibição do crescimento micelial (%) de <i>C. acutatum</i> após seis dias	178
Tabela 2.16. Mortalidade média de larvas não ingurgitadas de <i>R. microplus</i> tratadas com diferentes concentrações dos diversos óleos essenciais	191
Tabela 2.17. Parâmetros obtidos dos testes do óleo essencial de <i>L. triplinervis</i> (LTPM) x fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	192

Tabela 2.18. Parâmetros obtidos dos testes do óleo essencial de <i>B. dracunculifolia</i> (BD) x fêmeas ingurgitadas de <i>R. microplus</i>	194
Tabela 2.19. Mortalidade média de larvas não ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações dos componentes de majoritários e do óleo essencial de BD (Teste realizado em duplicata)	195
Tabela 2.20. Concentração de (-)-(S)-ácido úsnico (3), (+)-(R)-ácido úsnico (6) e etoposídeo necessária para inibir em 50% (CI ₅₀) a proliferação de células tumorais humanas	234

RESUMO

LAGE, Tiago Coelho de Assis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Outubro de 2014. **Identificação de metabólitos secundários e estudo de bioatividades de interesse agroquímico e farmacológico de plantas e líquen da Serra do Brigadeiro – MG.** Orientador: Sergio Antonio Fernandes. Coorientador: Erik Daemon de Souza Pinto

Para a realização deste trabalho, no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – MG (**PESB**) foram coletadas as plantas *Lippia triplinervis* e *Baccharis platypoda*, em dois pontos: Pico do Mamute e Pico do Grama, *Myrsine squarrosa* e o líquen *Cladonia rappii* somente no pico do Mamute. No Campus da UFV foi coletada *Baccharis dracunculifolia*. Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram estudar a constituição química dos óleos essenciais (OE), dos extratos e substâncias isoladas destas espécies, bem como avaliar as suas atividades biológicas. A caracterização química dos óleos essenciais levou à distinção entre as amostras de *B. platypoda* nos dois pontos de coleta, sendo o mesmo observado para *L. triplinervis*. Através dos resultados obtidos dos testes de atividade biológica, foi observada atividade fungicida contra fungos dermatófitos para *B. platypoda*, sendo o sabineno a provável substância ativa nesta planta. Foram determinadas também atividades ectoparasiticida, formicida e fungicida para *L. triplinervis*. Em todos os casos, seja no seu óleo essencial ou nos extratos, a atividade foi desempenhada pelos monoterpenos timol e carvacrol. Em *B. dracunculifolia*, foi possível determinar a atividade contra larvas e fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*, sendo este resultado inético para esta planta. O nerolidol, componente majoritário do seu óleo essencial, foi confirmado como sendo a substância ativa. De *M. squarrosa* foi possível observar a atividade formicida para as frações em diclorometano e em acetato de etila. Em ambas as frações foi isolada uma mistura de duas substâncias que podem ser as responsáveis pela atividade formicida desta planta contra a formiga cortadeira *Atta sexdens* Rubropilosa. Em *C. rappii* foi isolado e caracterizado o (-)-(S)-ácido úsnico, ácido fumarprotocetrárico e a substância inédita ácido rappiídico, sendo essa a primeira descrição da presença desta espécie no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, bem

como a primeira descrição de metabólitos secundários originados dela. O (-)-(S)-ácido úsnico e o ácido fumarprotocetrárico apresentaram uma considerável capacidade para sequestrar espécies reativas e oxigênio, como o radical superóxido, enquanto não foram capazes de sequestrar espécies reativas de nitrogênio. Além disso, o (-)-(S)-ácido úsnico foi avaliado como sendo superior ao etoposídeo para inibir a atividade antiproliferativa de linhagens celulares de Cólon e neuroblastoma. Neste trabalho também foi realizada a proposta para a modificação da metodologia de teste de atividade antifúngica conhecida como “*Poisoned food*” de forma a aumentar a precisão do teste. Por esta nova metodologia, foi possível reduzir os desvios padrões entre os tratamentos utilizados e assim gerar resultados mais confiáveis.

ABSTRACT

LAGE, Tiago Coelho de Assis, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2014. **Identification of secondary metabolites and study of the bioactivities of agrochemical and pharmacological interest of four plants and one lichen from the Serra do Brigadeiro range, Minas Gerais.** Adviser: Sergio Antonio Fernandes. Co-adviser: Erik Daemon de Souza Pinto

The aim of this study was to ascertain the chemical composition of the essential oils (EO) of four plant species (*Lippia triplinervis*, *Baccharis platypoda*, *Myrsine squarrosa* and *Baccharis dracunculifolia*) and one lichen (*Cladonia rappii*) and to determine the biological activities of these oils, extracts and isolated substances. *L. triplinervis* and *B. platypoda* specimens were collected from two points in Serra do Brigadeiro State Park (**PESB**) in Minas Gerais, Brazil: Mamute Peak and Grama Peak. *M. squarrosa* and the lichen *C. rappii* were only collected on Mamute Peak. Finally, *B. dracunculifolia* samples are collected on the campus of Viçosa Federal University (UFV). The chemical characterization of the essential oils revealed a distinction between the oils of *B. platypoda* obtained from the two peaks, and also between the oils from the specimens of *L. triplinervis* from the two collection sites. *B. platypoda* had fungicidal activity against dermatophytic fungi, with sabinene being the likely active substance. *L. triplinervis* showed activity against ectoparasites, ants and fungi. In all cases, the activity was due to the monoterpenes thymol and carvacrol, contained in both the essential oils and extracts of this plant. *B. dracunculifolia* had activity against larvae and engorged females of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*, a result not previously reported for this plant. Nerolidol, the major component of its essential oil, was confirmed as the active substance. Formicidal activity was observed for the extracts from *M. squarrosa*, both the fractions obtained by using dichloromethane and ethyl acetate. A mixture of two substances was isolated from both fractions, possibly responsible for the activity of this plant against the leafcutter ant *Atta sexdens* Rubropilosa. Three substances were isolated and characterized from *C. rappii*: (-)-(S)-usnic acid, fumarprotocetraric acid and rappiidic acid, in the last case a novel substance.

Also, this is the first description of secondary metabolites from this lichen and the first report of its presence in Brigadeiro State Park. (-)-(S)-usnic acid and fumarprotocetraric acid have considerable ability to sequester oxygen-reactive species, such as the free radical superoxide, while they are unable to sequester nitrogen-reactive species. Besides this, (-)-(S)-usnic acid was superior to etoposide in inhibiting the antiproliferative activity of cell lines from the colon and neuroblastomas. Finally, a modified version of the poisoned food technique was developed to test antifungal activity, to make it more precise (reducing the standard deviations between treatments to generate more reliable results).

1. Introdução Geral

A biodiversidade existente no nosso planeta fornece aos ecossistemas uma estrutura de apoio essencial à manutenção dos seres vivos, incluindo as faunas silvestres e a flora, contribuindo para a provisão das necessidades humanas básicas tais como alimentos e medicamentos (BIAVATTI et al., 2007). A prospecção ética da biodiversidade, visando agregar ciência e tecnologia a seus produtos, passa a ser de importância estratégica para os países em desenvolvimento, como alternativa para o tratamento de doenças, expansão da agricultura e estímulo ao crescimento econômico (MIGUEL; MIGUEL, 2004).

Os produtos farmacêuticos e os agroquímicos atualmente podem ser reconhecidos como marcos de sustentação da civilização moderna. Os produtos naturais, de uma forma geral, têm uma importância sem precedentes como fármacos e agroquímicos menos danosos à saúde humana (PINTO et al., 2002).

A manutenção da vida está intimamente associada à descoberta de novos produtos químicos para serem utilizados como agroquímicos e medicamentos. Há uma preocupação crescente quanto ao impacto que estas substâncias causam ao meio ambiente e ao homem, o que leva a adoção de políticas cada vez mais severas para o registro destas (KOEHN; CARTER, 2005; DAYAN et al., 2009). Além disso, o desenvolvimento de resistência aos agroquímicos e aos medicamentos, associado ao uso indiscriminado e incorreto destes produtos, leva a uma busca por novas substâncias com novos modos de ação e em muitos casos com um espectro amplo de atividade (BUTLER; BUSS, 2006; DEISING et al., 2008; DAYAN et al., 2009; HÜTER, 2011; SAHA; BUKHSH, 2013).

Para um novo produto entrar no mercado, seja um agroquímico ou um medicamento, são necessários pelo menos dez anos de pesquisa. Este precisa ser altamente ativo contra as espécies alvo e ter um considerável espectro de atividade biológica de acordo com a necessidade e do portfólio da companhia que o produz. Não deve apresentar resistência cruzada aos

produtos existentes e se possível, um novo modo de ação é desejável (BARBOSA, 2004; KOEHN; CARTER, 2005)

Neste contexto, a síntese aleatória de novas substâncias ou o planejamento racional de moléculas são alternativas interessantes na busca por novos agroquímicos ou fármacos. No entanto, estas técnicas não vêm alcançando o desempenho que delas se espera (KOEHN; CARTER, 2005; BARBOSA et al., 2008).

Em um estudo realizado por Lipkus e colaboradores (2008), sobre a diversidade estrutural dos 24 milhões de compostos orgânicos sintéticos registrados no CAS, eles observaram que estes compostos podem ser reduzidos a 143 grupos estruturais básicos. De fato, o pilar estrutural molecular utilizado em química orgânica sintética é limitado (LIPKUS et al., 2008).

Por outro lado, estudos complementares entre grupos farmacofóricos sintéticos e naturais indicam que nos grupos naturais há uma grande diversidade estrutural. Embora poucos produtos naturais possuam halogênios, estes tendem a serem ricos em oxigênio e nitrogênio e podem conter grupos sulfatos e fosfatos, apresentarem maior número de centros quirais, carbonos sp^3 e anéis do que os grupos sintéticos (HENKEL et al., 1999; KOCH et al., 2005; CONSTANTINO; BARLOCO, 2006; HARVEY, 2007).

Esta diversidade estrutural encontrada na natureza pode ser útil para o desenvolvimento de novas classes de compostos biologicamente ativos. Em geral, a complexidade dos esqueletos carbônicos é resultado de um “*screening*” natural de milhares de anos que confere a esses compostos propriedades biológicas adequadas, fazendo com que possam ser utilizados diretamente como agroquímicos, medicamentos ou ainda como moléculas líderes para a síntese de novas substâncias (DAYAN et al., 2009; CRAGG; NEWMAN, 2013).

No contexto de agroquímicos e medicamentos naturais, podem-se destacar as piretrinas e a quinina, respectivamente. As piretrinas (**Figura 1**) foram descobertas no século XIX, isoladas das folhas de *Chrysanthemum* sp. e são utilizadas como inseticidas, com sucesso, até os dias de hoje (COPPING; DUKE, 2007).

A quinina (**Figura 1**) é um medicamento antimalárico, também descoberto no século XIX, isolado das cascas de *Cinchona* spp. e também é utilizado até os dias de hoje (CRAGG; NEWMAN, 2013).

A estreptomicina (**Figura 1**) é outra molécula natural que também merece destaque. Esta substância é um potente bactericida que foi isolada do fungo *Streptomyces griseus* em 1944, sendo sua estrutura caracterizada em 1947. Ela também é indicada para combater as pragas de frutas cítricas, batatas e tomates, além disso, é também utilizada em conjunto com outros medicamentos para tratar a tuberculose (COPPING; DUKE, 2007).

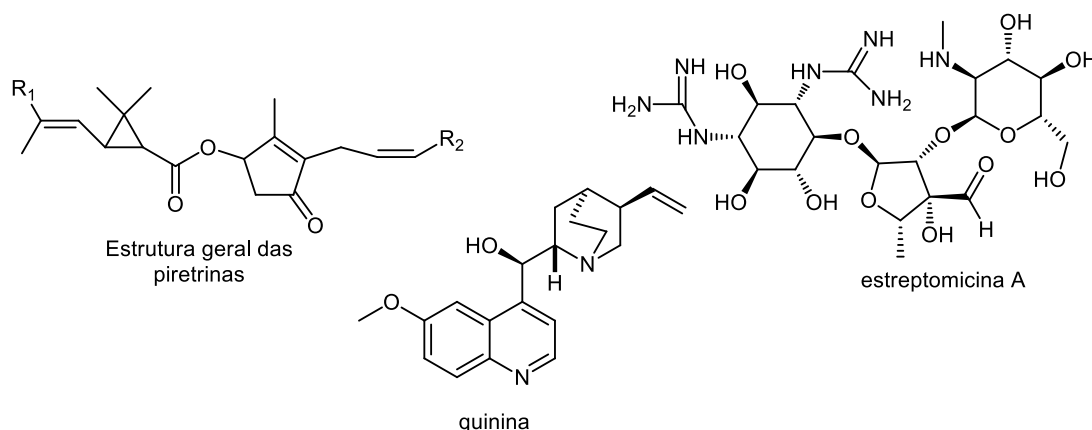


Figura 1. Produtos naturais utilizados como medicamentos e agroquímicos.

Outra aplicação para substâncias obtidas de fontes naturais é o seu uso como inspiração para a síntese de novas substâncias mais ativas, como é o caso das estrobilurinas, como a estrobilurina A, (**Figura 2, pag. 4**) produzidas por fungos basidiomicetos (SAUTER et al., 1999).

A princípio, estas moléculas apresentaram intensa atividade antibiótica *in vitro*, mas os testes em campo mostraram que estes compostos eram inativos. Isto ocorreu devido a sua foto-instabilidade, em consequência do grupo alqueno conjugado como o que ocorre na estrobilurina A (**Figura 2**). Mais de 50.000 análogos foram sintetizados ao longo dos anos, de forma a entender e otimizar a sua atividade biológica (SAUTER et al., 1999; HÜTER, 2011).

Após anos de pesquisa, a substituição de um dos grupos alqueno por um grupo arila (**Figura 2**) contornou o problema de foto-instabilidade. Estas estratégias permitiram a grandes empresas, como a BASF e a NOVARTIS, produzirem diversos produtos comerciais derivados das estrobilurinas (**Figura 2**) (SAUTER et al., 1999; HÜTER, 2011).

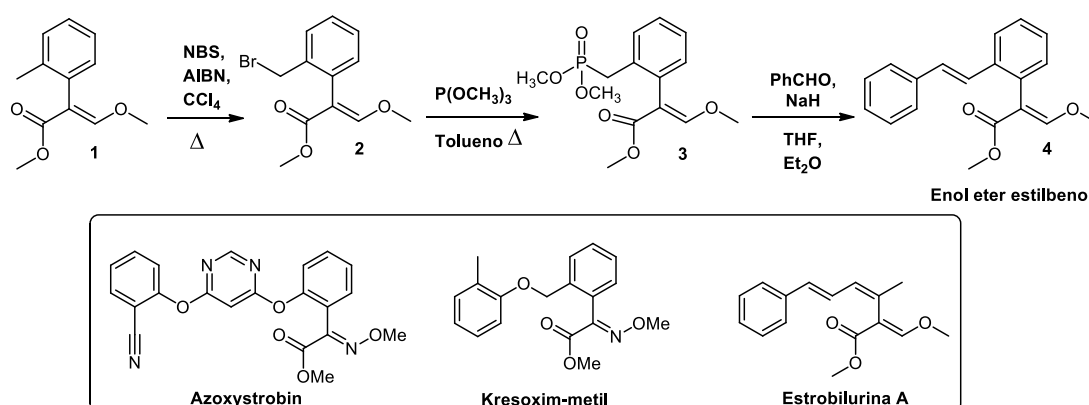


Figura 2. Estratégia de síntese para a obtenção do análogo (Enol éter estilbeno mais estável devido à adição do grupo arila) a Estrobilurina A. AIBN = 2,2'-azobisisobutironitrila. NBS = *N*-bromosuccinimida. Produtos comerciais derivados de Estrobilurinas: Azoxystrobin e Kresoxim-metil.

As modificações moleculares que ocorrem nas moléculas líderes, obtidas de produtos naturais, são semelhantes e podem ser aplicadas tanto para a área de agroquímicos ou fármacos. Neste contexto, os principais parâmetros físico-químicos estabelecidos por Briggs (1997), Lipinski (1997) e Clarke-Delaney (2003) para a síntese de moléculas bioativas podem ser aplicados em ambos os campos de pesquisa (LINDEL et al., 2009).

Um exemplo interessante deste tipo de aplicação pode ser mencionado para a leptospermona (**Figura 3**). Este sesquiterpenóide é um dos componentes principais do óleo essencial de *Leptospermum scoparium* J.R. Forst & G. Forst (KLINK et al., 1999) e possui atividade herbicida. Esforços para melhorar a sua atividade biológica levaram à síntese de dois análogos, a sulcotriona e mesotriona (**Figura 3**), que são utilizados como princípios ativos de herbicidas comerciais (HÜTER, 2011).

Surpreendentemente, o espectro de atividades biológicas para análogos da leptospermona é diversificado. A nitisiona (**Figura 3**) possui uma estrutura semelhante à mesotriona, porém possui um grupo $-CF_3$ no lugar do grupo $-SO_2CH_3$ e vem sendo utilizada como medicamento para o tratamento de uma doença conhecida como tirosinemia hepatorenal do tipo I (LAROCHELLE et al., 2012).

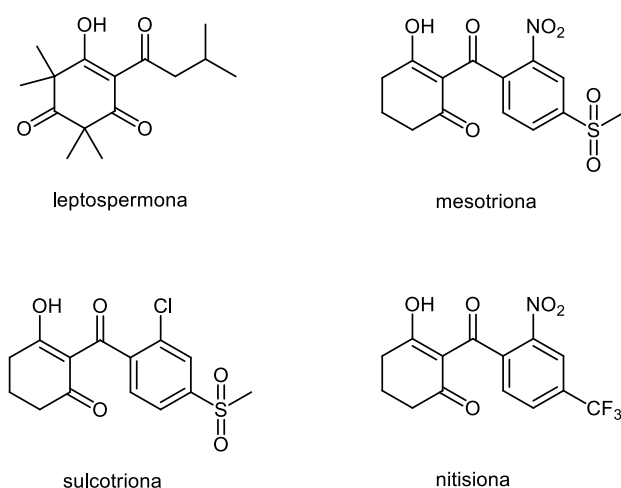


Figura 3. Leptospermona e alguns análogos.

Todos estes exemplos citados mostram como as substâncias extraídas de produtos naturais podem ser utilizadas como medicamentos e/ou agroquímicos ou ainda como precursores para a síntese de outras moléculas mais ativas. Este amplo espectro de atividades se deve à fantástica variabilidade e complexidade estrutural dos metabólitos secundários biossintetizados pelas plantas, que emergiu evolutivamente como mediadores moleculares de interações ecológicas. Uma grande parcela destes compostos adquiriu funções protetoras, como resultado de milhões de anos de co-evolução em um ambiente repleto de microrganismos

patogênicos, insetos fitófagos e outros animais herbívoros, bem como outras plantas competidoras por recursos. Desta forma, atividades biológicas são mais prováveis de serem encontradas em substâncias derivadas de produtos naturais do que em compostos randomicamente sintetizados (CRAGG; NEWMAN, 2013).

2. Objetivos

Determinar a constituição química dos óleos essenciais e dos extratos de *Lippia triplinervis*, *Baccharis platypoda*, *Myrsine squarrosa* e *Cladonia rappii* coletadas na Serra do Brigadeiro – MG e *Baccharis dracunculifolia* coletada no campus da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

Avaliar as atividades biológicas dos óleos essenciais e dos extratos, bem como das substâncias isoladas das frações biologicamente ativas. Neste contexto foram realizados os seguintes ensaios de avaliação da atividade biológica:

- Acaricida contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*;
- Formicida contra *Atta sexdens rubropilosa*;
- Fungicida (fungos patogênicos) *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Microsporum gypseum*, *Trychophyton rubrum*, *Trychophyton mentagrophytes*;
- Fungicida (fungos fitopatogênicos) *Colletotrichum acutatum* e *Botrytis cinerea*.

Avaliar a atividade antioxidante e antiproliferativa contra células tumorais, das substâncias isoladas de *Cladonia rappii*: (-)-(S)-ácido úsnico, ácido fumarprotocetrárico e ácido rappiidico.

3. Justificativa

As plantas possuem suas próprias defesas que as protegem de outras plantas, insetos fitófagos e herbívoros. As principais formas de defesa são de natureza química que envolvem, em geral, os metabólitos secundários, conhecidos também como fitotoxinas ou aleloquímicos. Este fenômeno é chamado de alelopatia (PINTO et al., 2002).

A definição mais comumente aceita para alelopatia é ampla, e pode ser descrita como

a ciência que estuda qualquer processo envolvendo, principalmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos (PINTO et al., 2002).

Em geral, as substâncias aleloquímicas obtidas dos produtos naturais apresentam baixa toxicidade ao homem e ao meio ambiente. Sendo assim, estas podem ser utilizadas diretamente como defensivos agrícolas, fármacos ou como moléculas líderes na busca por novas substâncias bioativas em processos de triagem rápida, conhecidos como *HTS – High Throughput Screening* (LINDELL et al., 2009).

A proliferação de micro-organismos e pragas resistentes aos diversos tipos de medicamentos e agroquímicos existentes no mercado, bem como o aumento de casos de câncer no mundo geram uma busca por substâncias mais ativas, de menor impacto ambiental e menos tóxicas aos seres humanos. O desenvolvimento e a busca por estas substâncias faz com que o mercado de medicamentos e agroquímicos cresça juntamente com a demanda.

A Agência de Proteção Ambiental Americana - EPA, indica que no ano de 2007 foram consumidos no mundo cerca de dois bilhões de quilos de agroquímicos e a tendência é que a produção *per capita* se mantenha estável (EPA, 2011).

Como o crescimento da população está diretamente relacionado à produção agrícola (HÜTER, 2011), fazendo uma relação entre a produção *per capita* de agroquímicos no ano de 2007 com a estimativa de crescimento da população, realizada pela Organização das Nações Unidas – ONU (UN, 2007), estima-se que no ano de 2050 serão produzidos aproximadamente seis bilhões de quilos de agroquímicos.

Isto mostra a relevância e as perspectivas do mercado de medicamentos e de agroquímicos juntamente com a possibilidade de pesquisa nestas áreas. Dessa forma, a necessidade de estudos na área de produtos naturais para a obtenção de novos compostos bioativos justifica a proposta do presente trabalho.

Além destes fatores, são escassos os estudos fitoquímicos e/ou de avaliação de atividades biológicas para as plantas *L. triplinervis*, *B. platypoda*, *M. squarrosa* e *B. dracunculifolia*, além do líquen *C. rappii*, os quais foram alvos de estudo neste trabalho.

CAPÍTULO 1. ANÁLISE
FITOQUÍMICA

1. Introdução

A caracterização de metabólitos bioativos é o ponto de partida para uma aproximação estratégica na busca de compostos com atividade biológica. Pistas da existência destas substâncias podem surgir de diversas fontes, desde o uso da medicina tradicional, que ao longo dos anos selecionou grupos de plantas que se mostraram úteis ao homem até a triagem de um largo número de organismos em busca de novas substâncias específicas ou atividades biológicas definidas (GHISALBERTI, 2008).

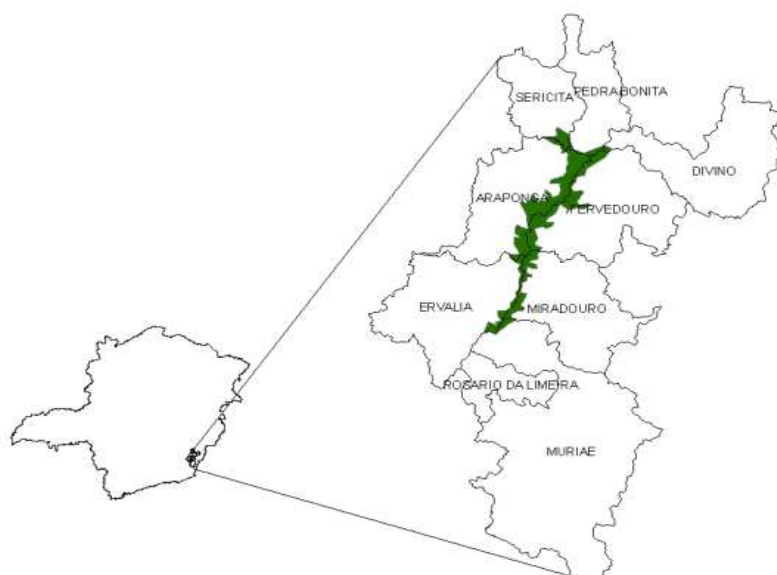
Neste contexto, realizar a prospecção a fim de encontrar plantas que possam fornecer substâncias bioativas é extremamente importante. A flora brasileira é uma fonte extremamente fecunda de substâncias com potencial atividade biológica devido à exuberância de sua biodiversidade. O Brasil está incluído entre os 17 países com maior índice de biodiversidade do planeta, denominados “Países Megadiversos afins”, que em conjunto são responsáveis por 70% da biodiversidade do mundo, conforme a “Declaração de Cancun”, de 18 de fevereiro de 2002 (PEIXOTO; MORIN, 2003). Os 8,5 milhões de km² brasileiros abrigam mais de 55 mil espécies de plantas superiores catalogadas, com uma riqueza inimaginável de substâncias praticamente desconhecidas do ponto de vista químico (GOTTLIEB, BORIN, 1997).

Dessa forma, ambientes como os campos de altitude são importantes para o desenvolvimento de estudos na área científica, principalmente na busca por moléculas biologicamente ativas. Nestes locais existe uma elevada taxa de endemismo (SAFFORD, 1999), onde as plantas desse meio único e raro podem ser responsáveis pela produção de substâncias ainda desconhecidas.

Assim, no ano de 2005, Caiafa e da Silva realizaram um levantamento florístico a 1.722 m de altitude em uma área conhecida como Totem Deitado localizado na Serra das Cabeças, no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB). Neste trabalho foram coletadas e identificadas 81 espécies, distribuídas em 60 gêneros e 31 famílias onde foram encontradas quatro novas espécies, sendo duas delas inéditas, tornando esse local uma excelente fonte de pesquisa (CAIAFA, da SILVA; 2005).

1.1. Parque Estadual da Serra do Brigadeiro – PESB

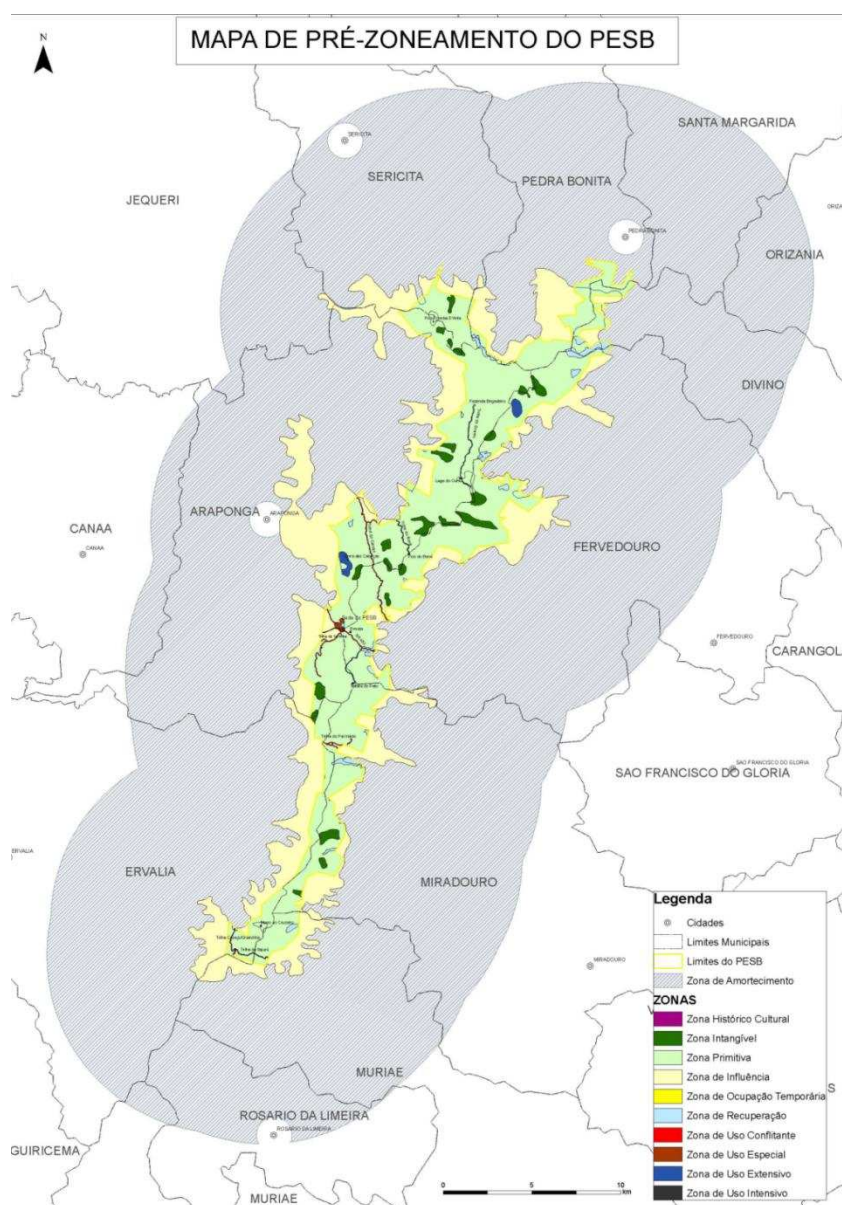
O PESB foi criado em 27 de setembro de 1996 e está sob supervisão do Instituto Estadual de Florestas (IEF), o parque encontra-se totalmente inserido na Zona da Mata de Minas Gerais, situado no Maciço da Mantiqueira entre os meridianos 42° 20' e 21° 40' S e os paralelos 20° 20' e 21° 00' W (**Figuras 1.1 e 1.2, pág. 12**) (ENGEVIX, 1995 apud CAIAFA; da SILVA, 2005, p. 165). O clima da região é do tipo mesotérmico médio (CW_b) (KÖPPEN, 1948 apud CAIAFA; SILVA, 2005, p. 165), a precipitação anual é de 1.300 mm e a temperatura média anual de 18,0 °C (ENGEVIX, 1995 apud CAIAFA; SILVA, 2005, p. 165).



Fonte: AMBIENTE BRASIL, 2006.

Figura 1.1. Localização do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro no estado de Minas Gerais.

A vegetação no PESB é constituída basicamente por fragmentos secundários de floresta estacional semidecídua, da formação altimontana com campos de altitude ocupando os platôs e as escarpas isoladas com algumas áreas acima de 1.600 m (CAIAFA; SILVA, 2005).



Fonte: Programa de Manejo Integrado do PESB – IEF/MG.

Figura 1.2. Mapa de pré-zoneamento do PESB.

1.2. Espécies investigadas neste trabalho – Revisão de Bibliografia

1.2.1. *Lippia triplinervis* Gardner

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) é importante do ponto de vista medicinal, compreendendo aproximadamente 200 espécies distribuídas entre a América Central, América do Sul e África tropical. A maior parte das plantas deste gênero é utilizada pela medicina tradicional em todo tipo de enfermidades, principalmente em problemas gastrointestinais e respiratórios; também são empregadas no tratamento de resfriados, gripes, doenças hepáticas, como estimulante do apetite e na preparação de bebidas e alimentos (PASCUAL et al., 2001).

Estudos sobre atividades biológicas de plantas do gênero *Lippia* tem-se multiplicado, principalmente entre os grupos de pesquisa brasileiros (CARVALHO et al., 2003; BOTELHO et al., 2007; CAVALCANTI et al., 2010; FARIAS et al., 2010; GUILHON et al., 2011; LEITÃO et al., 2011; FARIAS et al., 2012; FUNARI et al., 2012; GOMES et al., 2012; CARMONA et al., 2013; FERRAZ et al., 2013; GOMIDE et al., 2013; LAGE et al., 2013; LOBO et al., 2014).

De todas as espécies deste gênero já descritas, *Lippia alba* (erva-cidreira) é sem dúvida a mais estudada, do ponto de vista farmacológico, e uma das mais utilizadas pela população do sudeste do Brasil como planta medicinal. Esta planta possui diversas atividades biológicas, descritas tais como antibacteriana, antiviral, antiprotozoária, neurosedativa, analgésica, anti-inflamatória, cardiovascular, antioxidante, citotóxica (HENNEBELLE et al., 2008) e mais recentemente foi descoberto que esta planta pode combater a enxaqueca (CARMONA et al., 2013).

Além desta espécie de *Lippia* outras também já foram relatadas e diversas atividades biológicas já foram descritas, tais como antibacteriana para *Lippia sidoides* Cham (OLIVEIRA et al., 2006; LOBO et al., 2014) e para *Lippia grandis* Schauer (SARRAZIN et al., 2012), antifúngica para

Lippia scaberrima Sond (REGNIER et al., 2008) e *Lippia graveolens* Kunth (RODRIGUÉZ et al., 2011), antioxidante para *Lippia multiflora* Moldenke (ARTHUR et al., 2011) e *Lippia citriodora* (Palau) Kunth (QUIRANTES-PINÉ et al., 2013), citotóxico (FERRAZ et al., 2013), anti-inflamatório, antinociceptivo (GUILHON et al., 2011) e cicatrizante (RIELLA, 2012) para *Lippia gracilis* Schauer, e antimalarial para *Lippia javanica* Spreng (LUDERE et al., 2013). Recentemente nosso grupo de pesquisa descreveu também atividade acaricida para *Lippia triplinervis* Gardner (LAGE et al., 2013).

Em plantas deste gênero é comum encontrar uma diversidade de metabólitos secundários principalmente os derivados de ácidos caféicos, como o verbascosídeo, compostos fenólicos como o ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, flavonóides como a naringerina, iridóides como o geniposídeo, alcalóides como a amodendrina e saponinas como a lippiasaponina II (**Figura 1.3, pág. 15**) (FORESTIERI et al., 1996; PASCUAL et al., 2001; FARIAS et al., 2010; ARTHUR et al., 2011; FUNARI et al., 2012). A presença de terpenos em espécies de *Lippia* também é abundante.

Os principais terpenos presentes em *Lippia* ssp. são o β -cariofileno, cânfora, α -pineno e timol (**Figura 1.3, pág. 15**) (PASCUAL et al., 2001; GOMIDE et al., 2013; SANDASI et al., 2013). Além destes pode-se destacar a (+)-hernandulcina (**Figura 1.3, pág. 15**), um sesquiterpeno 1000 vezes mais doce do que sacarose que foi isolado de *Lippia dulcis* Trevir (COMPADRE et al., 1985).

A descoberta desta molécula é um exemplo marcante de como a etnobotânica favorece muito a pesquisa de produtos naturais. Compadre e colaboradores (1985) hipotetizaram que havia a presença de uma substância doce nesta planta ao rever a monografia descrita pelo pesquisador Francisco Hernández no século XVI, chamada de “A História Natural da Nova Espanha”, onde o povo Asteca relatava o uso recorrente de uma erva muito doce. A descrição e ilustrações precisas de Hernández permitiram aos pesquisadores encontrar a planta e atribuir a ela o nome de *L. dulcis*. O nome da substância hernandulcina foi uma homenagem a este pesquisador (COMPADRE et al., 1985).

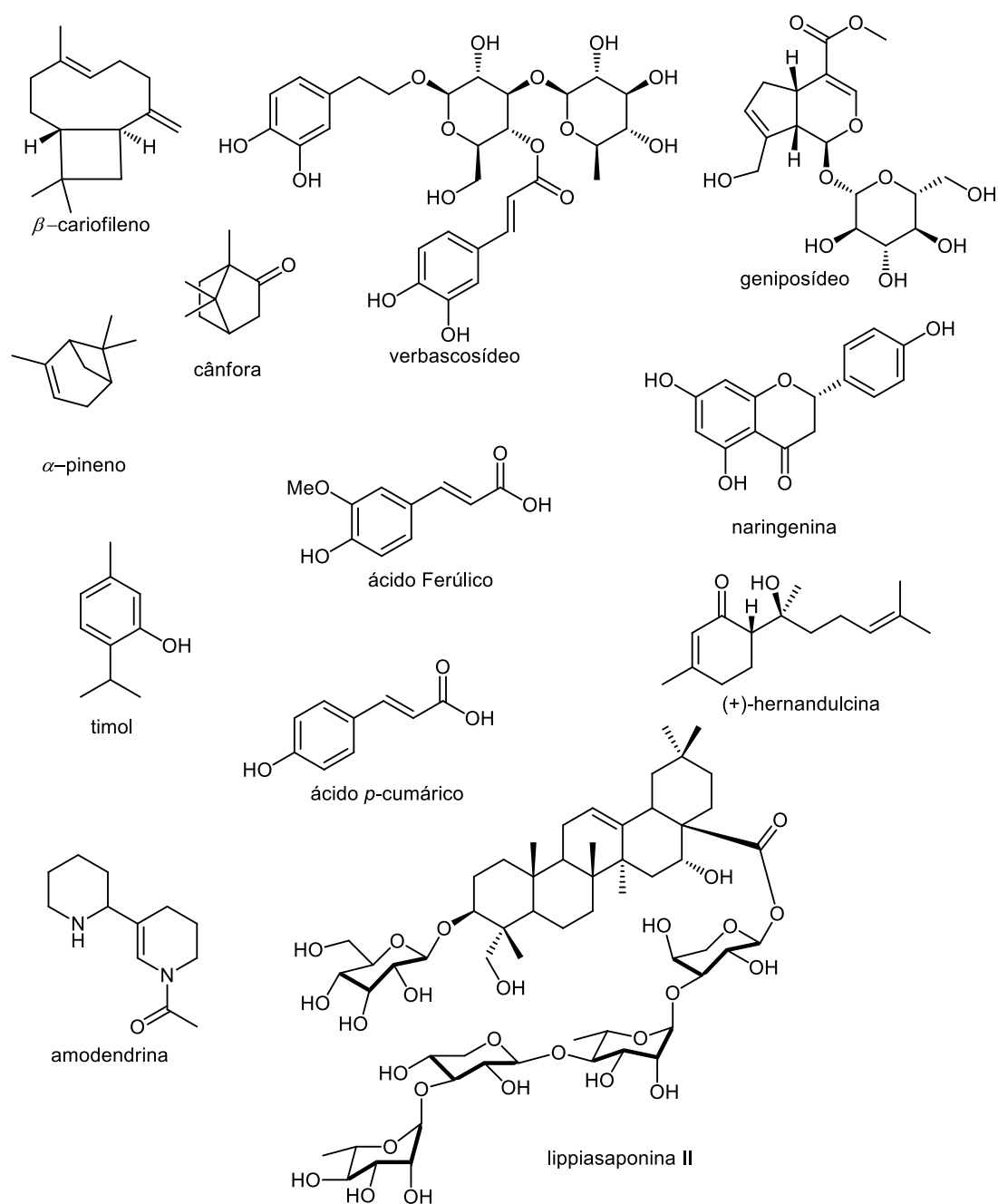


Figura 1.3. Metabólitos secundários encontrados no gênero *Lippia*.

Assim, neste trabalho foi investigada a espécie *Lippia triplinervis* Gardner (**Figura 1.4**). Esta planta é um pequeno arbusto de aproximadamente 1,5 m, de folhas coriáceas, flores aromáticas e de coloração rosa. É uma planta endêmica dos campos de altitude e presente na lista das espécies ameaçadas de extinção no estado de São Paulo (LEITÃO et al., 2011). Uma pesquisa na literatura mostrou que até o momento, para *L. triplinervis*, existem apenas dois estudos a respeito da atividade biológica do óleo essencial e nenhum sobre a parte fitoquímica dos extratos (LEITÃO et al., 2011; LAGE et al., 2013).



Foto: MONTANARI, 2011a.

Figura 1.4. *Lippia triplinervis*.

1.2.2. *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis platypoda* DC

As plantas da família Asteraceae estão entre as mais estudadas devido ao grande número de gêneros que possuem atividades biológicas importantes. Graças ao seu largo espectro de constituintes químicos, as plantas desta família têm permitido o desenvolvimento, com sucesso, de novos compostos bioativos. Aproximadamente 98% das plantas da família Asteraceae são plantas de pequeno porte, sendo encontradas principalmente em regiões montanhosas da América do Sul (VERDI et al., 2005).

Dentre esta diversidade de gêneros presentes na família Asteraceae encontra-se o gênero *Baccharis*. No gênero *Baccharis* estão incluídas mais de 500 espécies distribuídas desde os Estados Unidos até a Argentina, com predominância na América do Sul. A alta concentração de espécies no Brasil e nos Andes é uma indicação de que a origem desse gênero se encontra em uma destas áreas. No Brasil já foram descritas cerca de 120 espécies de *Baccharis*, localizadas principalmente na região sudeste, sendo esta a maior concentração de espécies existentes deste gênero. As plantas do gênero *Baccharis*, em geral, são arbustos como a carqueja (*Baccharis trimera* DC) e a vassourinha ou alecrim do campo (*B. dracunculifolia*) e tem em média 0,5 a 4,0 m de altura (BUDEL et al., 2005; VERDI et al., 2005; ABAD; BERMEJO, 2007).

Espécies de *Baccharis* são bastante empregadas na medicina popular para o controle ou para o tratamento de várias doenças. Estas plantas são consumidas principalmente na forma de chás, com indicações para o tratamento de males do fígado até para processos inflamatórios (VERDI et al., 2005). Por exemplo, *B. articulata* (Lam.) Pers. é utilizada como diurético e digestivo e também como medicação antidiabética. *Baccharis coridifolia* DC é usada externamente como anti-inflamatório, enquanto *Baccharis gaudichaudiana* (DC) Baker é utilizada para o tratamento da diabetes (ABAD; BERMEJO, 2007).

Dentre as espécies de *Baccharis* existentes, as mais estudadas são a *B. trimera* e *B. articulata*, conhecidas popularmente como carqueja. Estas plantas são utilizadas pela medicina popular devido às suas propriedades diurética e estomáquica. *B. dracunculifolia* é outra espécie também muito estudada por ser a origem botânica da própolis verde e também pelas características químicas do seu óleo essencial, muito utilizado pela indústria de perfumaria (BUDEL et al., 2005).

Embora a maioria das espécies de *Baccharis* seja utilizada na medicina popular, algumas delas podem ser tóxicas. *Baccharis halimifolia* L., *Baccharis megapotamica* Spreng e *Baccharis coridifolia* (**Figura 1.5**) são deletérias para os seres humanos e principalmente para o gado. Os sintomas relacionados à intoxicação por estas espécies são tontura, tremores, convulsão e diarreia (VERDI et al., 2005).

A ingestão de 0,25 a 0,50 g de *B. coridifolia* por quilograma do animal é suficiente para levá-lo a morte dentro de 14 a 41 horas após a ingestão (VERDI et al., 2005).



Fotos: TOP TROPICALS, 2014; SCHNEIDER, 2014; ROLIM, 2014.

Figura 1.5. Espécies tóxicas de *Baccharis*. Na sequência, *B. halimifolia*; *B. megapotamica* e *B. coridifolia*.

As substâncias responsáveis pela toxicidade destas plantas são os tricotecenos (**Figura 1.6**). Estes metabólitos secundários, até a década de 1970, eram conhecidos como sendo exclusivos de espécies fúngicas dos gêneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trochotecium* e *Trichoderma* que parasitam cereais como milho, cevada, trigo e arroz. Porém, em 1976, estas substâncias foram detectadas em plantas superiores como *B. megapotamica* e *B. coridifolia* (VERDI et al., 2005; DEWICK, 2009).

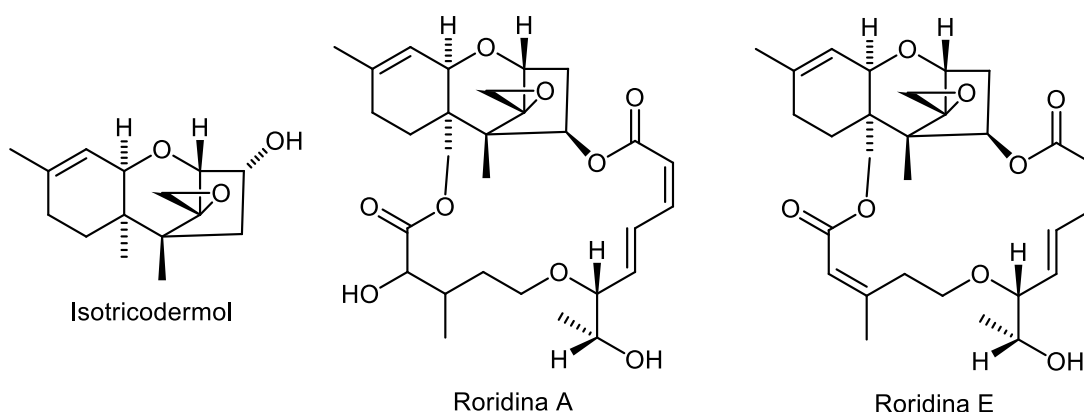


Figura 1.6. Esqueleto tricoteceno (isotricodermol) e tricotecenos (Roridinas A e E) isolados em *Baccharis coridifolia* (DEWICK, 2009; VERDI et al., 2005).

Conforme descrito anteriormente, *B. dracunculifolia*, é uma das espécies mais estudadas da família Asteraceae. É uma planta originária do Brasil, popularmente conhecida como alecrim-do-campo ou vassourinha (BARROSO, 1976) e é a origem botânica da própolis verde (PARK et al., 2004). Essa planta é utilizada pela população como antipirético, antisséptico e para tratar feridas na pele (PARREIRA et al., 2010). Além disso, possui confirmadas ações anti-inflamatória, antinociceptiva e antileishmanial (SANTOS et al., 2010; SILVA FILHO et al., 2009).

Estudos comprovam que o óleo essencial desta planta possui atividades antiulcerogênica (MASSIGNANI et al., 2009), antimicrobiana (FERRONATO et al., 2007), antiprotzoária e esquistosomicida (PARREIRA et al., 2010). No gênero *Baccharis*, já foram identificadas mais de 150 substâncias, no óleo essencial, na maioria das espécies ocorrem α e β – pinenos, limoneno, nerolidol e mirceno como produtos principais (**Figura 1.7**) (ABAD; BERMEJO, 2007).

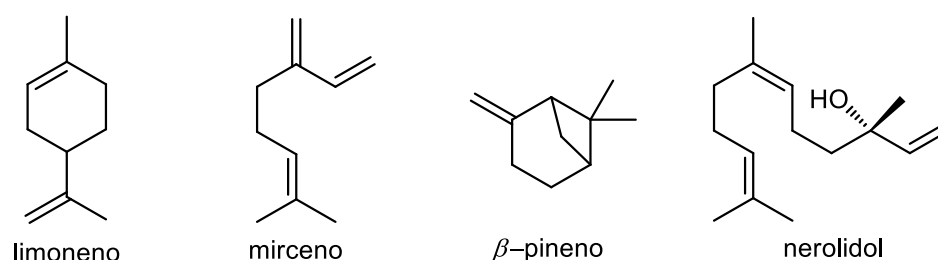


Figura 1.7. Terpenóides mais comuns presentes nos óleos essenciais do gênero de *Baccharis*.

Nos extratos, em sua maioria há o predomínio de diterpenóides clerodanos, labdanos e cauranos, flavonóides, seguidos de triterpenos, cumarinas e fenilpropanóides (ABAD; BERMEJO, 2007; VERDI et al., 2005) (**Figura 1.8, pág. 20**).

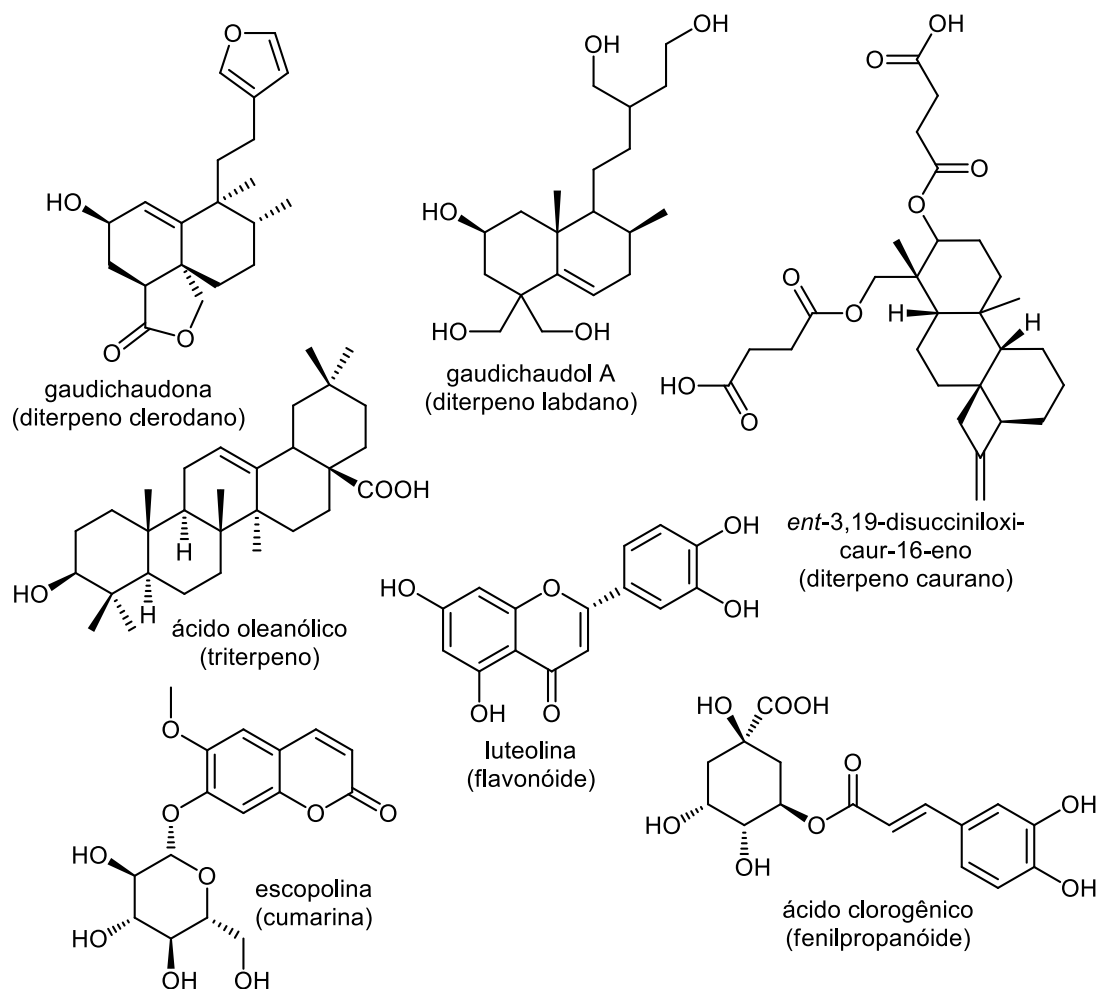


Figura 1.8. Principais classes de metabólitos secundários isolados de *Baccharis* spp. Gaudichaudona e gaudichaudol A isolados de *B. gaudichaudiana*. Ent-3,19-disucciniloxi-caur-16-eno (caurano) isolado de *Baccharis rufescens*. Luteolina (flavonóide) isolado de *Baccharis illinita*. Escopolina (cumarina glicosilada) isolada de *Baccharis tricuneata*. Ácido clorogênico (fenilpropanóide) isolado de *B. dracunculifolia*.

Neste trabalho foi utilizada a espécie de *B. dracunculifolia* (**Figura 1.9, pág. 21**). Estudos sobre a fitoquímica desta planta já foram realizados e vários metabólitos secundários foram descritos. Nestes trabalhos foram caracterizados compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico, artepilina C, ácido ferúlico e *p*-cumárico, flavonóides como a pnobanksina (PARK et al., 2004). Também são encontrados triterpenos como o ácido ursólico, lactonas diterpênicas (ácido *hautriwaic*), etc. (SILVA FILHO et al., 2009) (**Figura 1.10, pág. 21**).

Esta planta foi coletada no campus da Universidade Federal de Viçosa – UFV e apesar de ter os estudos fitoquímicos bem estabelecidos e um largo espectro de atividades biológicas, não foram encontradas na literatura descrições sobre sua atividade acaricida e dessa forma optou-se por utilizá-la.

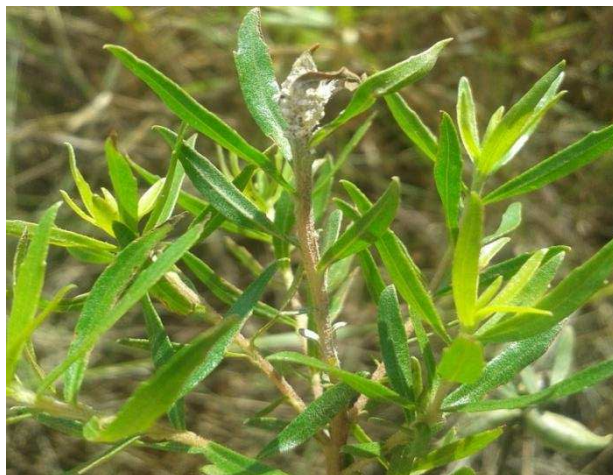


Foto: LAGE, 2014.

Figura 1.9. *Baccharis dracunculifolia*.

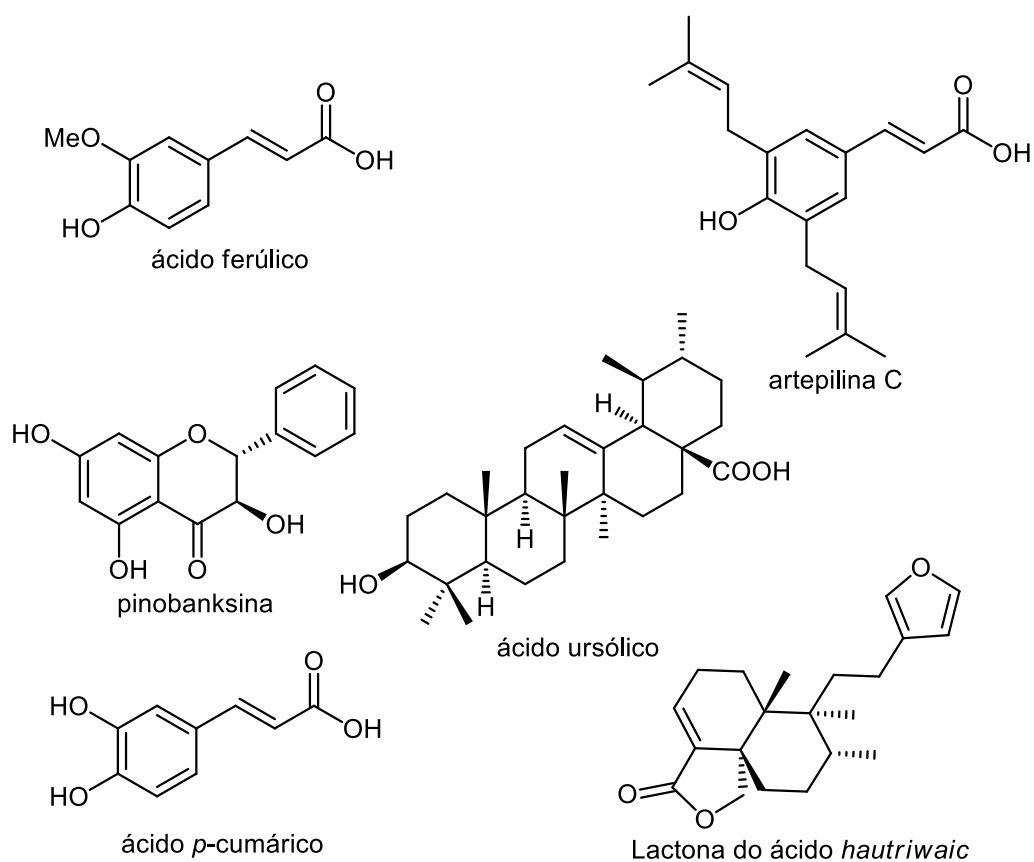


Figura 1.10. Alguns metabólitos secundários isolados de *B. dracunculifolia*.

Outra espécie de *Baccharis* utilizada neste trabalho, *Baccharis platypoda* DC (Alecrim das pedras) (**Figura 1.11**) é uma planta nativa do Brasil que se estende em uma faixa desde o estado da Bahia até o sul do Paraná, em áreas de caatinga, cerrado e mata atlântica (HEIDEN; SCHNEIDER, 2010).



Foto: FERNANDES, 2011.

Figura 1.11. *Baccharis platypoda*.

Até o presente momento apenas Brighente e colaboradores (2007) relataram dados etnofarmacológicos para esta planta. Neste trabalho os pesquisadores observaram que esta espécie, é conhecida pela população como carqueja e é utilizada para combater parasitas.

Sobre estudos fitoquímicos de *B. platypoda*, foram encontrados apenas dois trabalhos. Além de Brighente e colaboradores (2007) que descreveram a presença de compostos fenólicos, sem, no entanto isolar nenhum deles, Ferracini et al. (1995) estudaram a composição do óleo essencial desta planta, coletada no município de Santana do Riacho - MG. Neste trabalho foram descritos os monoterpenos α -terpineol e terpinoleno e também sesquiterpenos como o espatulenol e α -cadinol (**Figura 1.12, pág. 23**).

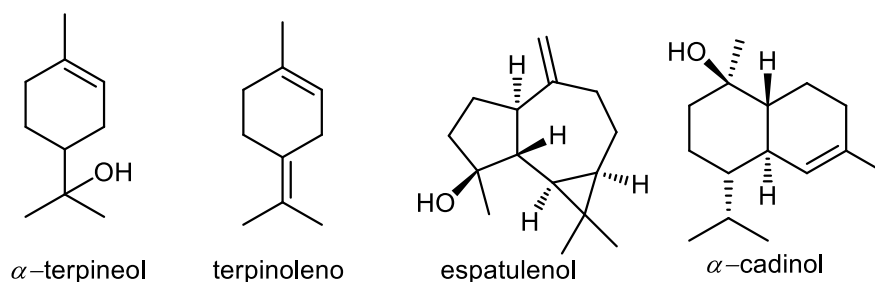


Figura 1.12. Alguns terpenos presentes no óleo essencial de *B. platypoda*.

1.2.3. *Myrsine squarrosa* (Mez) M.F. Freitas & L.S. Kinoshita

A família Myrsinaceae apresenta distribuição pantropical e cerca de 50 gêneros e 1.500 espécies. No Brasil ocorrem os gêneros *Ardisia*, *Cybianthus*, *Stylogyne* e *Myrsine*, totalizando mais de 100 espécies. Plantas do gênero *Myrsine* se destacam em processos naturais de sucessão e como importante recurso alimentar para a avifauna. Dados sobre táxons brasileiros de Myrsinaceae são escassos e insuficientes frente a grande diversidade existente (FREITAS; CARRIJO, 2008).

As plantas mais estudadas desta família são as espécies *Myrsine africana* L., que possui atividade anti-helmíntica e *Myrsine seguinii* H. Lév. com atividade anti-inflamatória (FRANÇA et al., 2011; YANG et al., 2014). Os dados sobre a fitoquímica da família Myrsinaceae estão bem estabelecidos. É possível encontrar na literatura que as principais classes de compostos presentes em plantas desta família são as saponinas (LAVAUD et al., 1994), derivados de hidroquinonas (ZHONG et al., 1999), fenilpropanóides (BURGUER et al., 2012) derivados de lignanas (ZHONG et al., 1998) benzoquinonas (MANGURO et al., 2003) e flavonóides (YANG et al., 2014) (**Figura 1.13, pág. 24**).

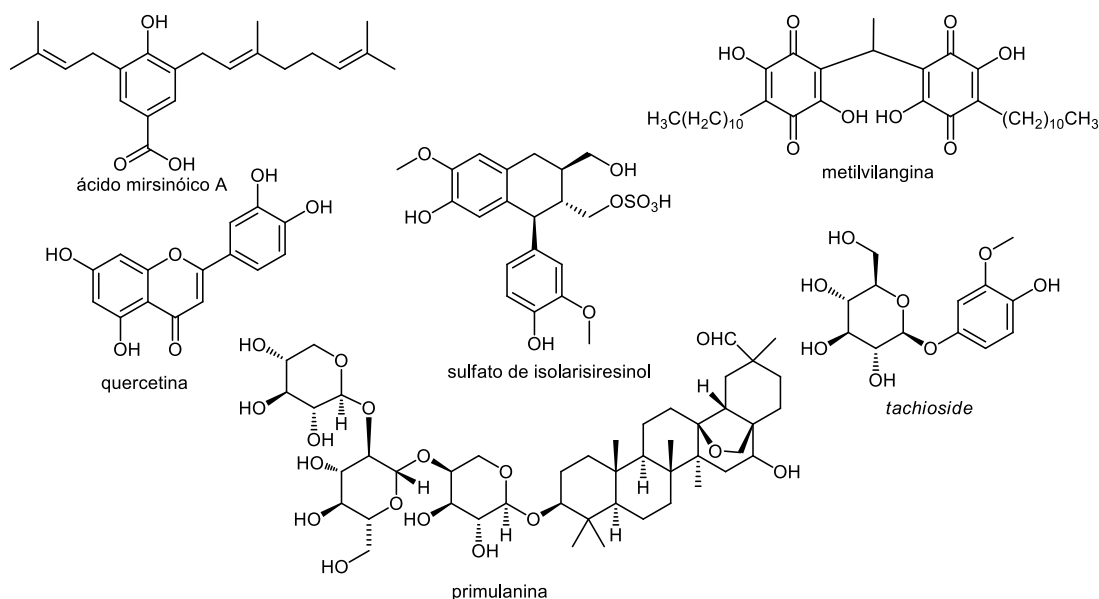


Figura 1.13. Principais metabólitos secundários encontrados em Myrsinaceae. Ácido mirsinóico A (fenilpropanóide), quercetina (flavonóide), primulanina (saponina), *tachioside* (hidroquinona glicosilada), sulfato de isolarisiresinol (derivado de lignana), metilvilangina (benzoquinona).

Para *M. squarrosa* (**Figura 1.14**) até a presente data, não foram encontrados dados descritos na literatura sobre sua fitoquímica ou propriedades farmacológicas.



Foto: MONTANARI, 2012.

Figura 1.14. *Myrsine squarrosa*.

1.2.4. *Cladonia rappii* A Evans

Por definição os líquens são organismos simbiontes, compostos por um fungo, como sendo a parte micobionte, e geralmente por uma alga verde ou cianobactéria que compreende a parte fotobionte, responsável por realizar a fotossíntese. Embora o conceito de líquen seja mais conhecido pela associação entre dois organismos, esta associação também pode ocorrer com três ou mais organismos como ocorre em *Lobaria pulmonaria* que associa um fungo, uma alga verde e uma cianobactéria, ou seja, uma combinação de três reinos (*Fungi*, *Protista* e *Monera*). A simbiose existente em um líquen envolve uma integração fisiológica muito próxima entre a parte dominante micobionte e a parte fotobionte. O fungo obtém sua nutrição através da parte fotobionte (que realiza a fotossíntese) e em contrapartida o protege contra radiação solar, secas e temperaturas extremas. Esta aliança entre esses organismos possibilita a eles sobreviverem juntos em regiões onde não seria possível sobreviverem separados (NASH III, 2008).

O gênero *Cladonia* P. Browne é o maior dentro da família Cladoniaceae, com mais de 400 espécies distribuídas por todo mundo. Este gênero foi dividido em quatro “supergrupos” (*Cladonia*, *Perviae*, *Cocciferae* e *Crustaceae*) de acordo com os dados morfológicos e químicos (GUMBOSKI; ELIASARO, 2011).

A diversidade estrutural das substâncias presentes em líquens é surpreendente. É possível encontrar ácidos alifáticos (ácido protoliqueterínico), ácidos fenilpropanóicos (ácido pulvínico), ácidos hidroxibenzóicos (metilparabeno), depsídeos (atranorina, ácido barbático), depsidonas (panarina, ácido fumarprotocetrárico), dibenzofuranos (ácido úsnico), antraquinonas (hipericina), antraquinóides (graciliformina), xantonas (ácido tiofânico) (EJIRI et al., 1975; HONDA; VILEGAS, 1998; BOUSTIE et al., 2011) (**Figura 1.15, pág. 26**).

Especificamente no gênero *Cladonia* já foram descritos alguns metabólitos secundários como a atranorina, ácido fumarprotocetrárico (KOSANIC' et al., 2014), ácido úsnico (CARVALHO et al., 2005), ácido barbático (LOFALL; TIMDAL, 2002) e graciliformina (EJIRI et al., 1975) (Figura 1.15).

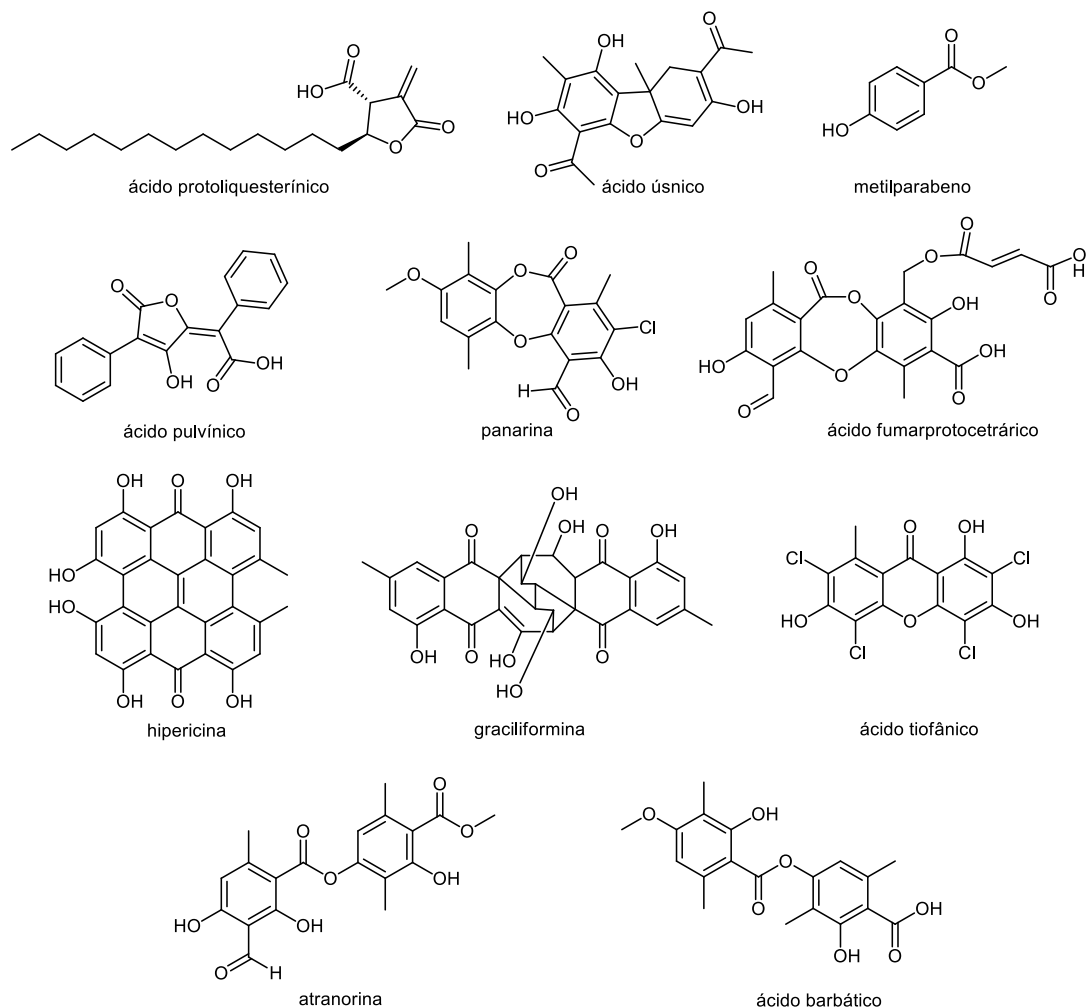


Figura 1.15. Alguns metabólitos secundários encontrados em líquens.

Para estas classes distintas de substâncias, muitos estudos têm sido conduzidos de forma a avaliar suas atividades biológicas. Já foram descritas atividades como anti-inflamatórias, antiproliferativas, antimicrobiais, anti-asmática, antipsoríase, analgésica, antipirética, anti-HIV, antitumoral, entre outras (MULLER, 2001).

O líquen *C. rappii* (**Figura 1.16**) está distribuído em toda América do Sul, principalmente em ambientes acima de 900 metros de altitude, e pertence ao grupo *Cladonia*, tem como parte fotobionte a alga *Asterochloris* sp. e cresce principalmente em musgos, em pequenas camadas de solo e sedimentos rochosos (CORDEIRO et al., 2005; CHARNEI; ELIASARO, 2013). Para esta espécie ainda não foram descritos estudos sobre a sua fitoquímica, apenas Flakus e colaboradores (2008) relataram a presença do ácido fumarprotocetrárico (**Figura 1.15, pág. 26**) que foi detectado somente por cromatografia em camada delgada, quando comparado com o Rf do padrão (FLAKUS et al., 2008).



Foto: LAGE, 2010.

Figura 1.16. *Cladonia rappii*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Parte Experimental

2.1.1. Cromatografia em camada delgada

Para realizar as análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de alumínio WHATMAN UV 254 (0,250 mm) recobertas com sílica-gel. As placas foram observadas sob lâmpada ultravioleta ($\lambda = 254$ nm) e posteriormente reveladas com uma solução de vanilina (50 mL de álcool etílico, 500 mg de vanilina e 2,0 mL de ácido sulfúrico).

2.1.2. Cromatografia preparativa em camada delgada

Em placas de vidro de 20,0 cm x 20,0 cm e 2,0 mm de espessura foi aplicada uma camada 0,25 mm de suspensão de sílica gel 60 PF₂₅₄, em água (m/v, 1:2-sílica:H₂O), com auxílio de um espalhador para cromatografia. As placas foram reservadas por trinta minutos à temperatura ambiente e posteriormente secas em estufa por doze horas a uma temperatura de 105 °C. Após esse período, foram armazenadas em dessecador até o momento de sua utilização. Após o procedimento cromatográfico, as placas foram reveladas em câmara de luz ultravioleta ($\lambda = 254$ nm).

2.1.3. Cromatografia em coluna

O isolamento e purificação das substâncias foram realizados por cromatografia líquida em coluna (CC) de sílica-gel 60 VETEC (63 – 200 μ m).

Os eluentes utilizados variaram de acordo com a característica de cada substância a ser purificada.

Em geral, foram utilizados como eluentes, em várias proporções, hexano, acetato de etila, acetona, ácido acético, ácido fórmico, dioxano, (Vetec).

2.1.4. Medidas das temperaturas de fusão

As temperaturas de fusão foram obtidas em um aparelho de ponto de fusão MICROQUÍMICA, mod.MQRPF-301 sem calibração.

2.1.5. Medidas de rotação específica

As medidas de rotação específica foram obtidas pela professora Dra. Rosemeire Brondi Alves da Universidade Federal de Minas Gerais utilizando um polarímetro Perkin Elmer 341 com lâmpada de sódio em 589 nm a 20 °C.

2.1.6. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho foram adquiridos em um espectrofotômetro Varian 660-IR gladATR calibrado para análises no infravermelho médio, operando no modo de reflectância.

2.1.7. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear unidimensionais de hidrogênio (RMN de ^1H 300 MHz) e de carbono (RMN de ^{13}C 75 MHz), Dept e mapas de contorno bidimensionais (COSY e HETCOR) foram obtidos em espectrômetro VARIAN MERCURY 300.

Foi utilizado como solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3 , ALDRICH) ou dimetilsulfóxido deuterado ($\text{C}_2\text{D}_6\text{SO}$) e o padrão de referência interna utilizado foi o sinal do solvente. As constantes de acoplamento (J) foram expressas em Hertz (Hz).

2.1.8. Cromatografia Gasosa – GC/MS – GC/FID

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foi realizada em um cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo GCMS-QP 5000A, com coluna capilar SPB-5 (5% difenil-95% dimetilsiloxano; 30,0 m x 0,25 mm x 0,25 μm) Supelco, equipado com detector seletivo de massas operando com energia de ionização de 70 eV. A cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização de chamas foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu modelo GC-17A.

A metodologia de análise dos óleos essenciais está descrita no **tópico 2.4, página 33**. Para a análise das frações de *M. squarrosa* foi utilizada a seguinte programação: Temperatura do injetor = 260 °C; fluxo = 1,0 mL/min, temperatura da coluna 80,0 °C, mantida por dez minutos, posteriormente a temperatura foi aumentando a uma taxa de 10,0 °C por minuto até atingir 300 °C e se manteve nesta temperatura por trinta minutos.

Para a análise dos extratos de *L. triplinervis* foi utilizado outro equipamento, o cromatógrafo gasoso Turbo Mass Perkin Elmer (Falcon, USA), com coluna SPB-1 (polidimetilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,1 μm) acoplado a um detector de massas operando com energia de ionização de 70 eV e modo SIM.

2.1.9. Espectrometria de massas de alta resolução

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em modo negativo em um equipamento LCMS-IT-TOF, Shimadzu, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais pelo Professor Adão Sabino.

2.2. Coleta das plantas e do líquen

L. triplinervis, *B. platypoda* (partes aéreas), foram coletadas no Pico do Mamute no dia 16/02/2011 e no Pico do Grama no dia 11/07/2012, no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, município de Araponga-MG. *Myrsine squarrosa* (folhas) e *Cladonia rappii* (talo) foram coletadas no Pico do Mamute em 05/03/2012. Para realizar a coleta foi emitida autorização pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF-MG) nº 003/12, para o acesso e remessa do patrimônio genético, foi obtida autorização junto ao CNPq e CGEN nº 010026/2014-2.

Baccharis dracunculifolia (partes aéreas) foi coletada no campus da Universidade Federal de Viçosa no dia 13/08/2011. Foram escolhidos os melhores exemplares de cada espécie coletada, de forma a produzir uma exsicata que foi incorporada ao Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa (**VIC**). Uma espécime-testemunha foi enviada para os taxonomistas para a confirmação botânica conforme apresentado abaixo:

A confirmação botânica de *Lippia triplinervis* Gardner foi realizada pela Dra. Fátima Salimena – UFJF, *Myrsine squarrosa* (Mez) M. F. Freitas & L. S. Kinoshita, pela pesquisadora Maria de Fátima Freitas do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, *Cladonia rappi* A. Evans pela Dra. Suzana M. Azevedo Martins – Museu de Ciências Naturais do Rio Grande do Sul. *Baccharis platypoda* DC e *Baccharis dracunculifolia* DC foram confirmadas pelo Dr. Eric Koiti Okiyama Hattori do *Missouri Botanical Garden* – St. Louis, EUA.

Na **Tabela 1.1, pág. 32**, estão descritas as coordenadas geográficas relativas aos locais de coleta de cada espécie, a família, código e o número de registro no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa (**VIC**).

Tabela 1.1. Espécies estudadas neste trabalho. As coordenadas superiores são referentes à coleta realizada no Pico do Mamute e os inferiores ao Pico do Grama, ambos no PESB. *Baccharis dracunculifolia* foi coletada no Campus da UFV-MG

Espécie	Cód.	Família	Local	VIC
<i>Lippia triplinervis</i> Gardner	LT	Verbenaceae	20°41'26.85''S, 42°28'20.41''W, 1644m 20°43'36.41''S, 42°28'46.98''W, 1497m	34.228
<i>Baccharis platypoda</i> DC	BP	Asteraceae	20°41'13.54''S, 42°28'38.81''W, 1845m 20°43'36.41''S, 42°28'46.98''W, 1497m	34.440
<i>Myrsine squarrosa</i> (MEZ) M. F. Freitas & L. S. Kinoshita	MS	Myrsinaceae	20°41'13.54''S, 42°28'38.81''W, 1845m	34.438
<i>Cladonia rappi</i> A. Evans.	CR	Cladoniaceae	20°41'26.85''S, 42°28'20.41''W, 1644m	35.603
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC	BD	Asteraceae	20°46'05.46''S, 42°51'40.28''W, 695m	35.604

2.3. Determinação da massa seca das espécies analisadas

Para determinar a porcentagem de massa seca, foi medido 1,0 g do material a ser analisado (em triplicata) e levado à estufa a uma temperatura de $105 \pm 2,0$ °C. A cada 24 horas, as amostras foram retiradas e armazenadas em um dessecador até atingirem a temperatura ambiente. Em seguida, as massas foram medidas em uma balança analítica, com precisão de cinco casas, e assim obtidas as médias das triplicatas. Este procedimento foi realizado a cada 24 horas até que as massas dos materiais permanecessem constantes.

2.4. Extração e análise do óleo essencial

Foram extraídos e analisados os óleos essenciais das partes aéreas frescas de:

- *L. triplinervis* (**LTPM** = Pico do Mamute e **LTPG** = Pico do Grama);
- *B. platypoda* (**BPPM** = Pico do Mamute e **BPPG** = Pico do Grama);
- *B. dracunculifolia* (**BD**).

Foram dados os mesmos códigos às plantas e aos seus respectivos óleos essenciais.

Para *M. squarrosa* (**MS**) e *C. rappii* (**CR**) foram realizadas tentativas de extração do óleo essencial e constatou-se que não havia a presença de constituintes voláteis em quantidade mensurável.

Para a extração dos óleos essenciais, as partes aéreas frescas (folhas e talos) foram trituradas e 100 g submetidos ao processo de hidrodestilação por cinco horas com o auxílio de um aparato tipo Clevenger, em triplicata. O óleo essencial foi retirado juntamente com a fase aquosa (hidrolato) do Clevenger e posteriormente levado para separação em um funil de separação. O restante do material retido nas paredes do equipamento foi lavado com pentano (3 x 5 mL) e as frações foram reunidas com a mistura contendo o óleo essencial e o hidrolato no funil de separação.

Após a separação das fases foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) à fase orgânica para a remoção da água residual. Posteriormente a fase orgânica foi filtrada em funil sinterizado.

O filtrado foi transferido para um frasco âmbar (com massa conhecida) e o pentano evaporado com auxílio de fluxo de N_2 . Após esse procedimento o frasco teve sua massa novamente medida e assim obteve-se a massa de óleo extraída. O frasco foi mantido em refrigeração (-10°C) até o momento da análise. O rendimento de óleo essencial foi calculado em função da massa seca.

A análise dos óleos essenciais foi realizada em cromatógrafo gasoso (Shimadzu, GCMS-QP 5000A) equipado com detector seletivo de massas. O gás de arraste utilizado foi o Hélio, com fluxo de 1,8 mL/min. A temperatura do injetor foi programada para permanecer em 230 °C.

O programa de temperatura do forno contou com um início em 40 °C, mantido por dois minutos. Em seguida, a temperatura foi aumentando a uma taxa de 3,0 °C por minuto até atingir 240 °C. Esta temperatura foi mantida por vinte minutos.

A quantificação foi realizada em um cromatógrafo gasoso equipado com detector de ionização de chamadas (Shimadzu GC-17A). Foi utilizado o mesmo método e a mesma coluna em ambos os equipamentos. Os constituintes foram identificados calculando-se o índice de retenção de Kovats e o índice de retenção Aritmético, relativos à série de alcanos (C₉-C₂₇), e comparando os espectros de massas das substâncias com aqueles presentes na biblioteca do equipamento e com os descritos na literatura (ADAMS, 2007). Os padrões de terpenos timol, carvacrol, nerolidol e limoneno foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

2.5. Obtenção dos extratos brutos

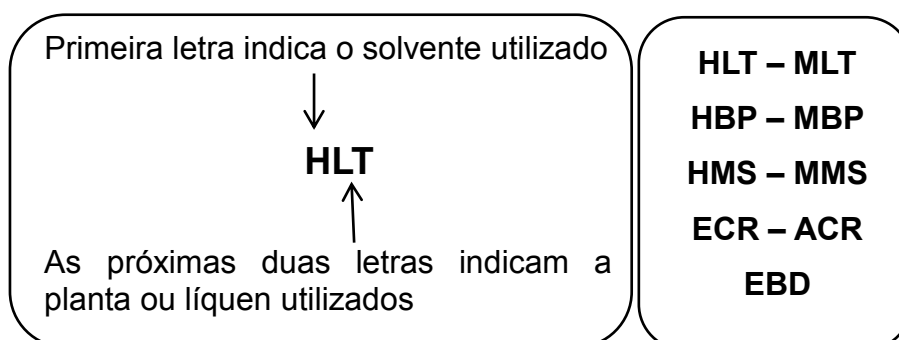
As espécies coletadas foram limpas e as partes aéreas separadas (talo e folhas). Em seguida o material foi acondicionado em sacos de papel e levado para secagem em estufa de circulação de ar do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa a uma temperatura de 40 °C por 96 horas. Após este período o material foi retirado da estufa, triturado em um liquidificador Phillips-Walita com 650 W de potência, no laboratório de Química Supramolecular e Biomimética da mesma instituição. O material obtido teve sua massa medida e então foi transferido para um erlenmeyer de quatro litros.

Para a obtenção dos extratos brutos (maceração a frio), ao material triturado foram adicionados três vezes o volume do solvente extrator (m/v), sendo agitados periodicamente por sete dias.

Após este período, os extratos foram filtrados e lavados em um funil sinterizado. O filtrado teve, então, seu volume reduzido em evaporador rotatório e posteriormente foi transferido para um frasco de vidro e sua massa determinada. Finalizado todo este processo, o extrato bruto foi armazenado em freezer (-10 °C) até o momento da análise.

Os extratos brutos foram obtidos apenas para as plantas coletadas no Pico do Mamute. Para *Lippia triplinervis* (**LT**), *Baccharis platypoda* (**BP**) e *Myrsine squarrosa* (**MS**) foi primeiramente realizada a extração com hexano e posteriormente, ao mesmo material já extraído, foi adicionado metanol por mais sete dias e todo o procedimento repetido.

Para *Baccharis dracunculifolia* (**BD**) e *Cladonia rappii* (**CR**) o procedimento adotado foi o mesmo descrito anteriormente, sendo utilizado apenas etanol como solvente extrator. Posteriormente para outra amostra de **CR** foi utilizado acetona como solvente extrator. Para cada extrato bruto foi criado um código:



2.5.1. Fracionamento dos extratos por cromatografia líquida a vácuo

Os extratos foram fracionados através da técnica de cromatografia líquida a vácuo (CLV) (**Figura 1.17, pág. 36**) (COLL; BOWDEN, 1986). Cada extrato (aproximadamente 20,0 g) foi solubilizado em diclorometano e incorporado em sílica-gel, com o auxílio de um almofariz, produzindo-se assim uma pastilha do extrato.

Em seguida o material foi transferido para um funil sinterizado de dois litros, contendo uma coluna de sílica-gel de 3,0 x 13,5 cm (h x Φ) previamente preparada. Depois de ser uniformemente disperso pela superfície da coluna, o material foi coberto com algodão e a ele adicionada a fase móvel de interesse.

Foram utilizados, em média, três litros de cada fase móvel, em ordem de polaridade crescente, hexano (**H**), diclorometano (**D**), acetato de etila (**Ae**) e metanol (**M**). O filtrado teve seu volume reduzido em evaporador rotatório e o concentrado foi transferido para um frasco e armazenado a -10,0 °C em um freezer.

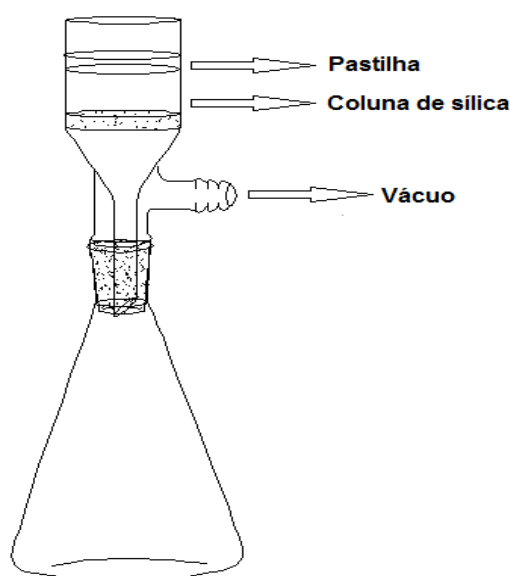
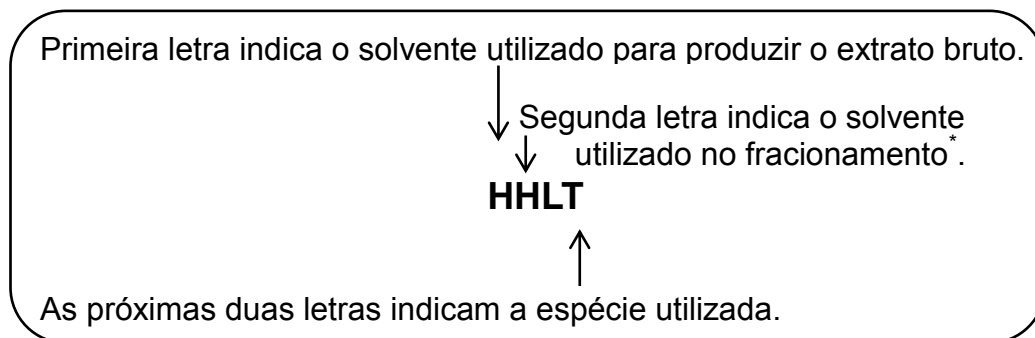


Figura 1.17. Esquema da cromatografia líquida a vácuo.

Assim, foram criados os códigos para as frações da mesma maneira como foram criados os códigos para os extratos brutos:



* Para acetato de etila foi utilizado o código Ae, com duas letras.

2.6. Fluxogramas para os processos de obtenção dos extratos, frações e substâncias isoladas das espécies utilizadas neste trabalho

2.6.1. *Lippia triplinervis*

Para *L. triplinervis*, 1.200 g das partes aéreas secas e trituradas foram utilizadas para o procedimento de extração por maceração a frio. Nesta metodologia foi utilizado hexano como solvente extrator por sete dias, sendo obtidos 31,5 g de extrato bruto (**HLT**) e posteriormente metanol por mais sete dias, sendo obtidos 25,0 g de extrato bruto (**MLT**).

Em seguida, foi retirada uma fração de cada extrato bruto e realizou-se a purificação por cromatografia líquida a vácuo (CLV) (**Materiais e Métodos, tópico 2.5.1, página 35**). De **HLT** foi obtida a fração em hexano **HHLT** (2,2 g), em diclorometano **HDLT** (9,7 g), em acetato de etila **HAeLT** (2,8 g) e em metanol **HMLT** (0,2 g).

Do extrato bruto em metanol **MLT**, foram obtidas as frações em diclorometano **MDLT** (1,4 g), em acetato de etila **MAeLT** (2,0 g) e em metanol **MMLT** (13,2 g). A purificação deste extrato bruto utilizando hexano não forneceu material.

Todo o procedimento pode ser visualizado no fluxograma que se encontra na **Figura 1.18, página 38**.

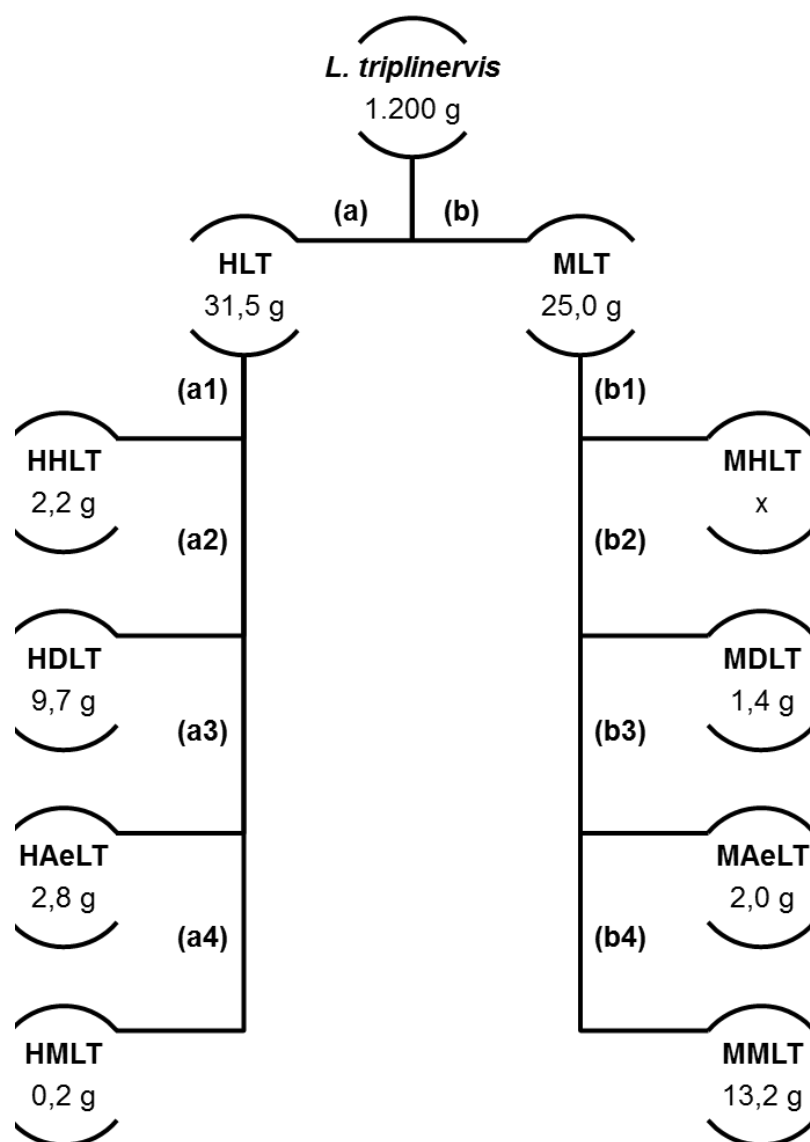


Figura 1.18. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos e frações de *L. triplinervis* (LT). O “x” indica que o processo não gerou material. (a) = hexano, três litros, sete dias. (b) = metanol, três litros, sete dias. (a1) = CLV, 16,1 g, hexano, dois litros. (a2) = CLV, diclorometano, dois litros. (a3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (a4) = CLV, metanol, dois litros. (b1) = 20,0 g, CLV, hexano, dois litros. (b2) = diclorometano, dois litros. (b3) = acetato de etila, dois litros. (b4) = metanol, dois litros.

2.6.2. *Baccharis platypoda*

As partes aéreas de *B. platypoda* (1.200 g) secas e trituradas, foram extraídas pelo processo de maceração a frio, primeiramente com hexano por sete dias, gerando 77,0 g do extrato bruto **HBP** e posteriormente com metanol por mais sete dias, gerando 11,7 g do extrato bruto **MBP**.

Após esta etapa, foi retirada uma fração destes extratos e procedeu-se a purificação por cromatografia líquida a vácuo (CLV). Neste processo, para **HBP** (20,0 g) foram obtidas as frações em hexano **HHBP** (2,1 g), em diclorometano **HDBP** (13,4 g), em acetato de etila **HAeBP** (3,0 g). A purificação com metanol não gerou material.

Para o extrato bruto em metanol **MBP** (11,7 g), foram obtidas as frações em diclorometano **MDBP** (1,3 g), em acetato de etila **MAeBP** (9,5 g). A purificação utilizando os solventes hexano e metanol não produziu material.

Todo o processo de extração e também de purificação pode ser visualizado no fluxograma que se encontra na **Figura 1.19, página 40**.

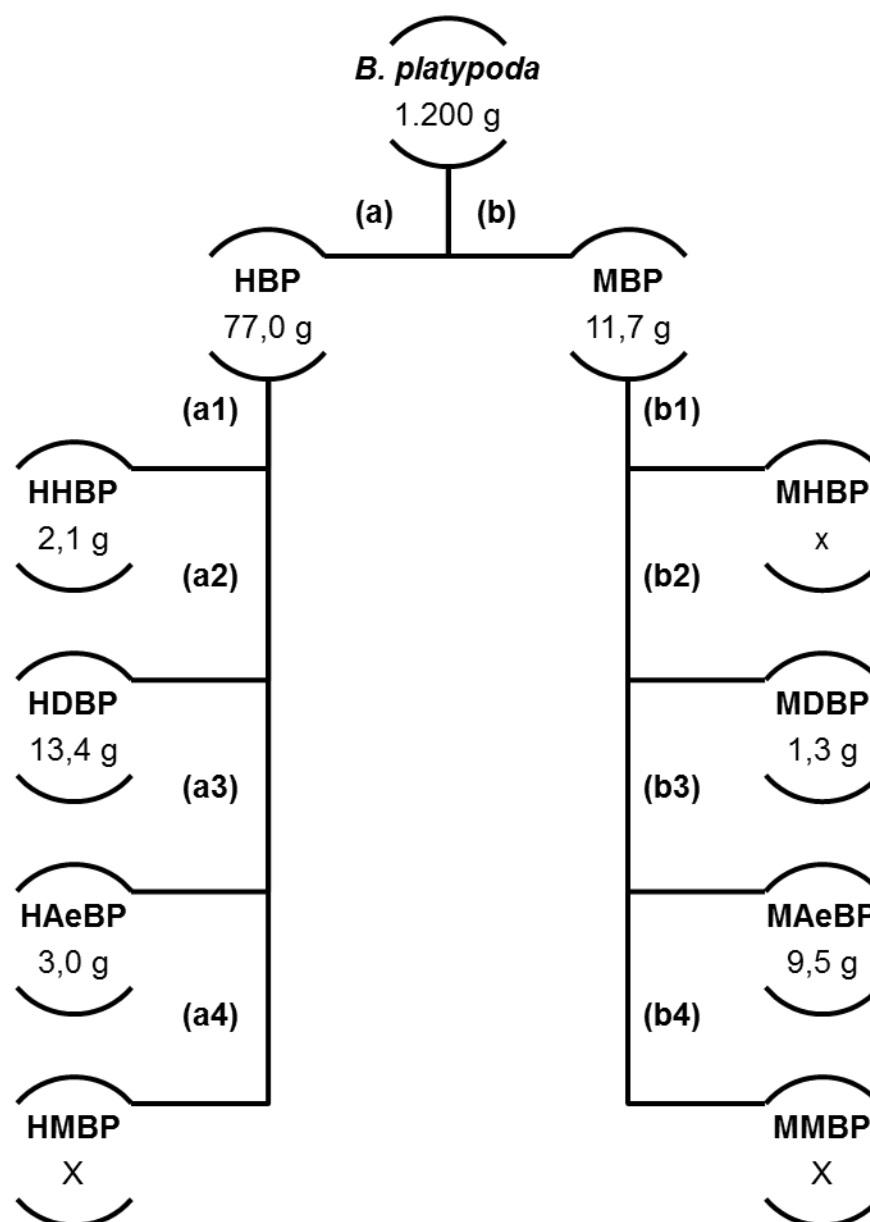


Figura 1.19. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos e frações de *B. platypoda* (BP). O “x” indica que o processo não gerou material. (a) = hexano, três litros, sete dias. (b) = metanol, três litros, sete dias. (a1) = CLV, 20,0 g, hexano, dois litros. (a2) = CLV, diclorometano, dois litros. (a3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (a4) = CLV, metanol, dois litros. (b1) = CLV, 11,7 g, hexano, dois litros. (b2) = CLV, diclorometano, dois litros. (b3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (b4) = CLV, metanol, dois litros.

2.6.3. *Baccharis dracunculifolia*

As partes aéreas (1.500 g) de *B. dracunculifolia* secas e trituradas foram extraídas com etanol 96 °GL, por um período de sete dias, pelo processo de maceração a frio. Ao final foram obtidos 419,0 g do extrato bruto em etanol **EBD**. Deste extrato foram retirados 15,0 g que foram submetidos ao processo de purificação por cromatografia líquida a vácuo.

Por este processo, foram obtidas as frações em hexano **EHBD** (0,3 g), em diclorometano **EDBD** (0,8 g), em acetato de etila **EAeBD** (6,5 g) e em metanol **EMBD** (6,3 g). Na **Figura 1.20** é possível visualizar todo o processo de extração e purificação.

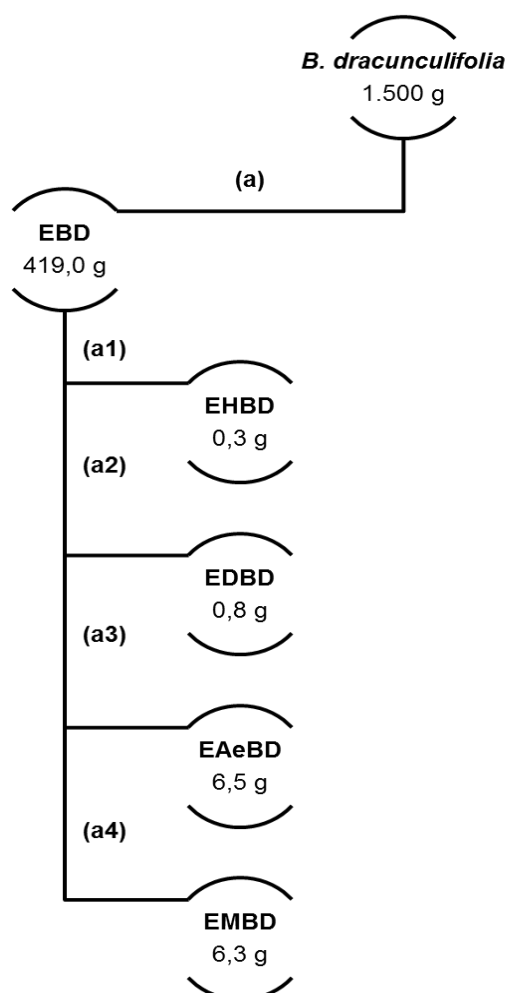


Figura 1.20. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos e frações de *B. dracunculifolia* (**BD**). (a) = etanol, quatro litros, sete dias. (a1) = CLV, 15,0 g, hexano, dois litros. (a2) = CLV, diclorometano, dois litros. (a3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (a4) = CLV, metanol, dois litros.

2.6.4. *Myrsine squarrosa*

Para *M. squarrosa*, o processo de extração por maceração a frio foi realizado utilizando as partes aéreas secas e trituradas (600 g). Foi utilizado primeiramente hexano como solvente extrator durante sete dias, sendo obtidos 33,2 g do extrato bruto em hexano (**HMS**) e em seguida procedeu-se a extração com metanol por mais sete dias sendo obtidos 114,8 g do extrato bruto em metanol (**MMS**).

Posteriormente, uma parte dos extratos brutos foi submetida ao processo de purificação por cromatografia líquida a vácuo. Neste processo, do extrato bruto em hexano **HMS** (20,0 g) foram obtidas as frações em hexano **HHMS** (2,1 g), em diclorometano **HDMS** (5,4 g), em acetato de etila **HAeMS** (9,9 g) e em metanol **HMMS** (0,7 g).

O mesmo foi feito para o extrato bruto em metanol **MMS** (15,0 g) e foram obtidas as frações em hexano **MHMS** (0,2 g), em diclorometano **MDMS** (0,6 g), em acetato de etila **MAeMS** (5,4 g) e metanol **MMMS** (6,3 g).

Todo o procedimento de extração e purificação pode ser visualizado no fluxograma que se encontra na **Figura 1.21, página 43**.

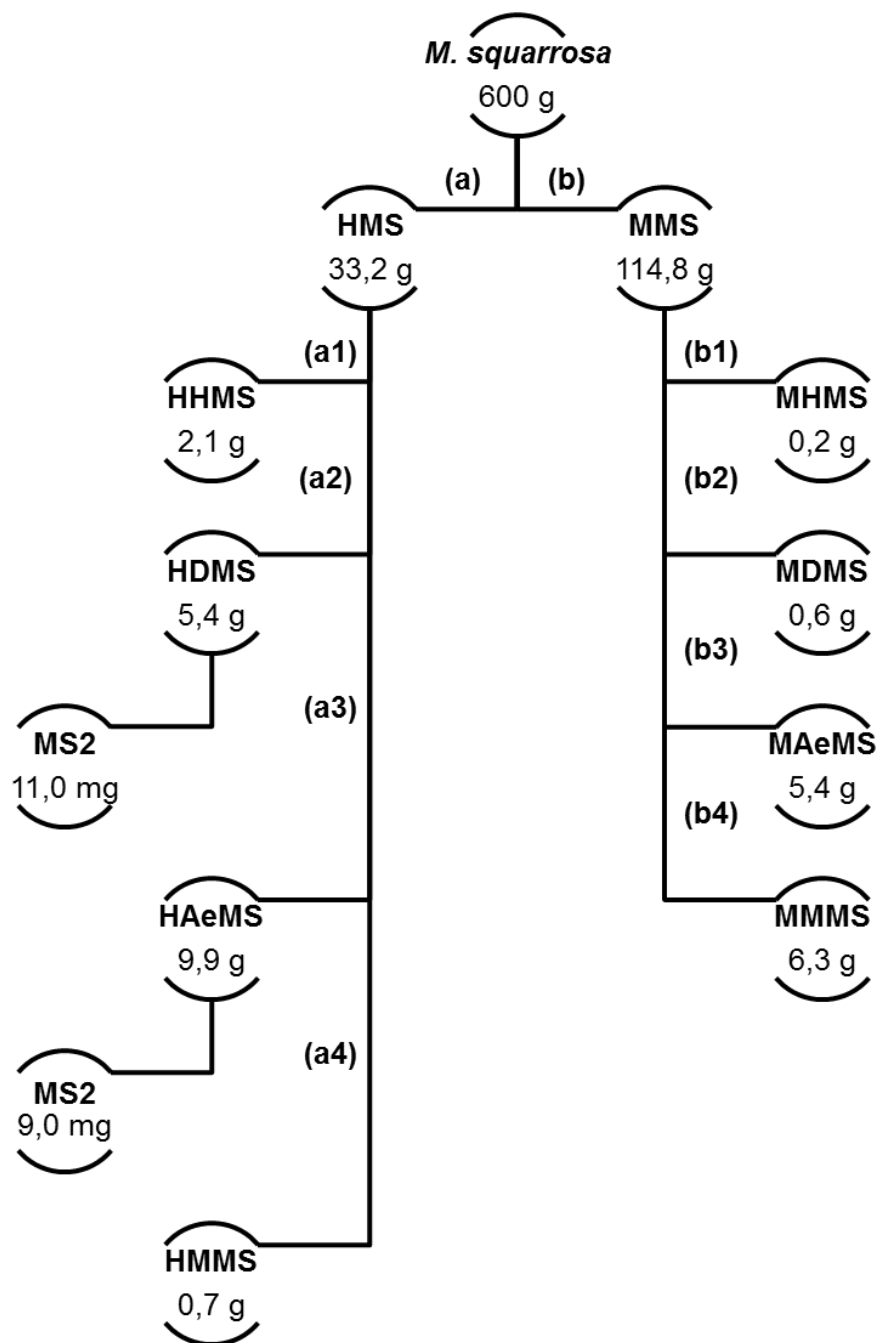


Figura 1.21. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos e frações de *M. squarrosa* (**MS**). (a) = hexano, três litros, sete dias. (b) = metanol, três litros, sete dias. (a1) = CLV, 20,0 g, hexano, dois litros. (a2) = CLV, diclorometano, dois litros. (a3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (a4) = CLV, metanol, dois litros. (b1) = CLV, 15,0 g, hexano, dois litros. (b2) = CLV, diclorometano, dois litros. (b3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (b4) = CLV, metanol, dois litros.

2.6.5. *Cladonia rappii*

2.6.5.1. Extração utilizando etanol (Metodologia A)

Pela metodologia A (**Figura 1.22, pág. 45**), 419,0 g do líquen seco e triturado foram extraídos com etanol 96 °GL, durante sete dias, utilizando a metodologia de maceração a frio. Por esta metodologia foram produzidos 19,7 g do extrato bruto em etanol **ECR**.

Após esta etapa, **ECR** foi submetido a um processo de fracionamento utilizando a metodologia de cromatografia líquida a vácuo (CLV). Neste processo foram obtidas as frações em hexano **EHCR** (0,04 g), em diclorometano **EDCR** (2,99 g), em acetato de etila **EAeCR** (3,48 g) e em metanol **EMCR** (3,13 g).

A fração em acetato de etila **EAeCR** foi submetida a um processo de purificação por cromatografia em coluna e dela foi isolado o ácido úsnico (**3**), 38,4 mg. No fluxograma da **Figura 1.22 (pág. 45)** é possível visualizar todo o procedimento.

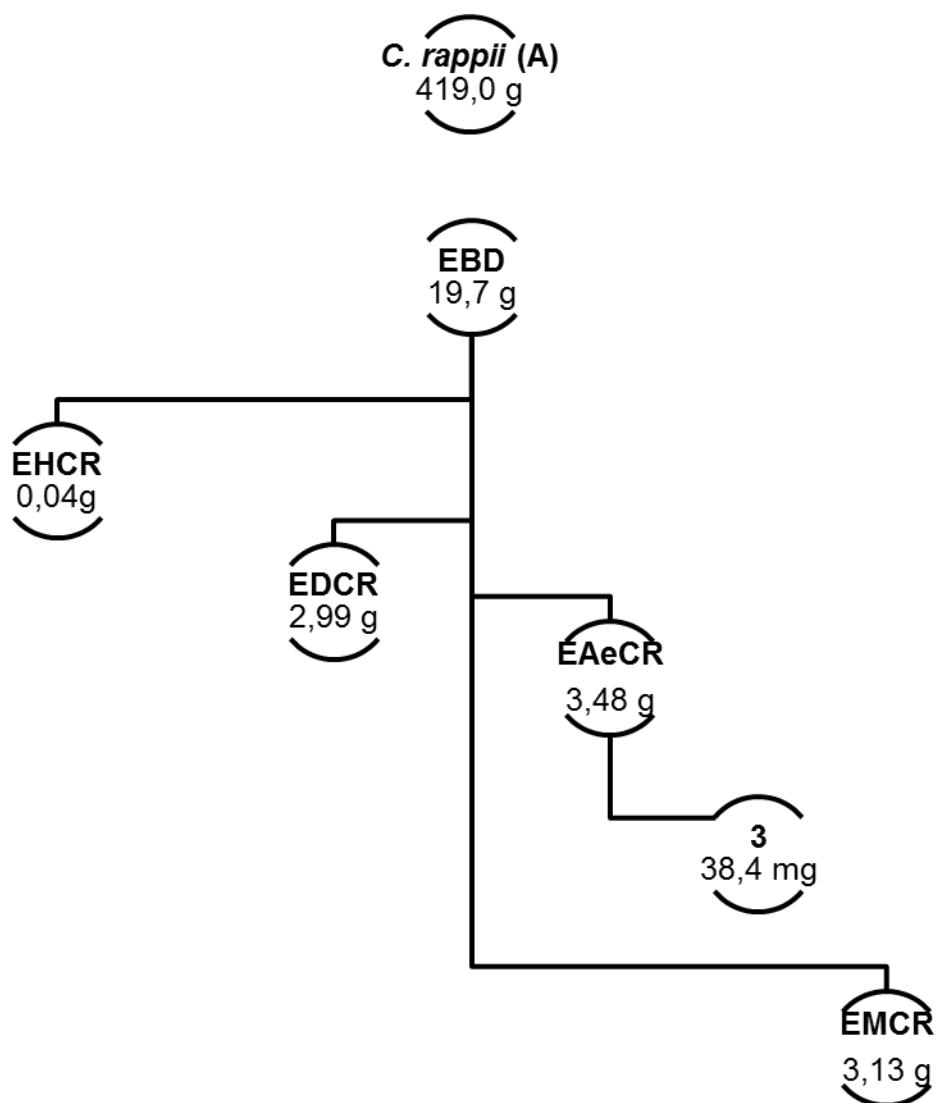


Figura 1.22. Fluxograma do processo de obtenção dos extratos, frações e do ácido úsnico isolado de *C. rappii* (**CR**). (a) = etanol 96 °GL, três litros, sete dias. (a1) = CLV, 19,7 g, hexano, dois litros. (a2) = CLV, diclorometano, dois litros. (a3) = CLV, acetato de etila, dois litros. (a4) = CLV, metanol, dois litros. (a3.1) = CC, 1,0 g, hexano:AcOEt:acetona:ácido acético – 70:35:10:10.

2.6.5.2. Extração utilizando acetona (Metodologia B)

Pela metodologia B (**Figura 1.23, página 47**), o líquen seco e triturado (84,7 g) foi submetido a um processo de extração por maceração a frio, utilizando acetona, durante sete dias. Por esta metodologia foram obtidos 21,4 g de **ACR**. Do extrato bruto em acetona (**ACR**) foi precipitado primeiramente o ácido úsnico (**3**) (3,6 g) e posteriormente o ácido fumarprotocetrárico (**4**).

Após a precipitação de **3** e **4** o extrato foi submetido a um processo de fracionamento por cromatografia líquida a vácuo. Neste processo foram obtidas as frações em hexano **AHCR** (0,03 g), em diclorometano **ADCR** (309,0 mg), em acetato de etila **AEaCR** (870 mg) e em metanol **AMCR** (3,40 g).

A fração em diclorometano **ADCR** (309,0 g) foi purificada por cromatografia em coluna e dela foi possível isolar o ácido rappiídico (**5**) (8,0 mg). Todo o procedimento para a obtenção dos extratos, frações e das substâncias pode ser visualizado no fluxograma da **Figura 1.23**.

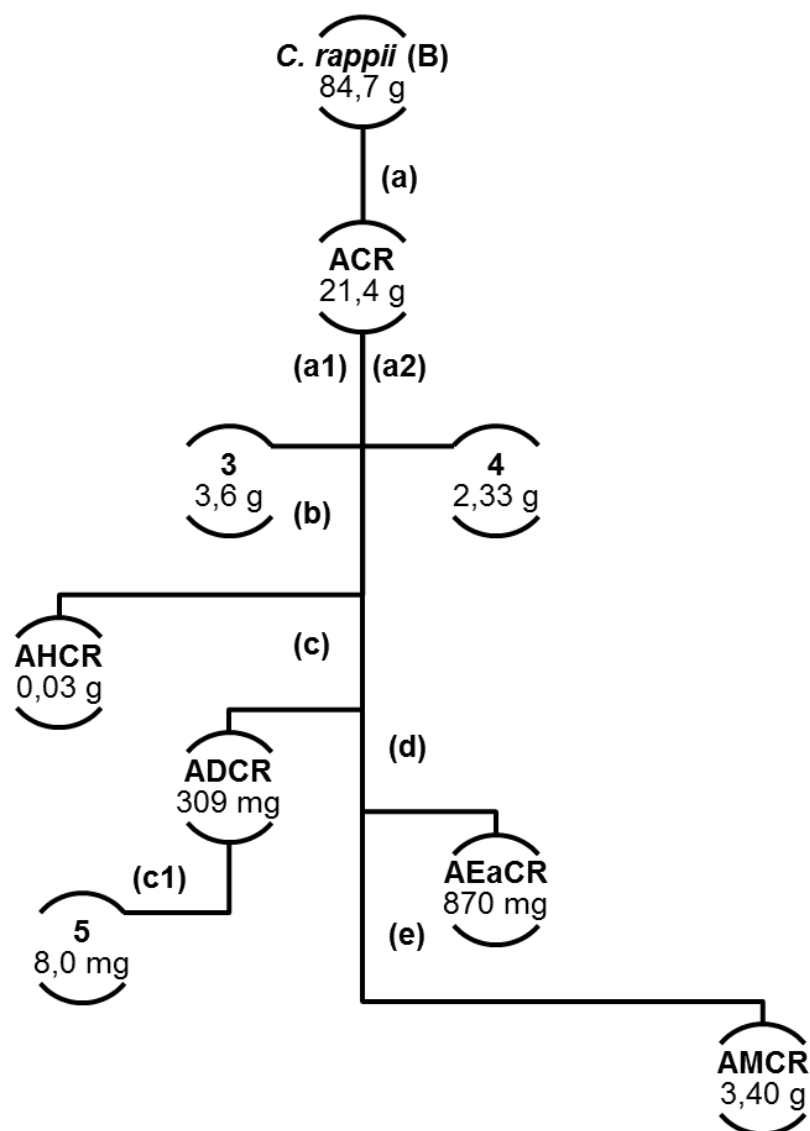


Figura 1.23. Fluxograma para a obtenção do extrato, frações e substâncias isoladas de *C. rappii*. (a) = acetona, 600 mL, sete dias, agitador orbital. (a1) = Freezer, - 10 °C, 12 horas. (a2) = Freezer, -10 °C, 12 horas. (b) = CLV, hexano, dois litros. (c) = CLV, diclorometano, dois litros. (d) = CLV, acetato de etila, dois litros. (e) = CLV, metanol, dois litros.

Na **Tabela 1.2** estão descritos todos os códigos utilizados para as plantas, óleos essenciais, extratos, frações e substâncias isoladas neste trabalho.

Tabela 1.2. Resumo dos códigos utilizados para as plantas, óleos essenciais, extratos, frações e substâncias isoladas

Planta	LT*	BP*	MS*	BD*	CR*
Óleo essencial	LT	BP	MS	BD	CR
Extrato bruto	HLT	HBP	HMS	EBD	ECR
	MLT	MBP	MMS	-	ACR
Frações	HHLT	HHBP	HHMS	EHBD	EHCR
	HDLT	HDBP	HDMS	EDBD	EDCR
	HAeLT	HAeBP	HAeMS	EAeBD	EAeCR
	HMLT	HMBP	HMMS	EMBD	EMCR
	MHLT	MHBP	MHMS		AHCR
	MDLT	MDBP	MDMS		ADCR
	MALT	MABP	MAMS		AAeCR
	MMLT	MMBP	MMMS		AMCR
Substâncias Identificas/isoladas	1 e 2			-	3, 4 e 5

* LT = *Lippia triplinervis*, BP = *Baccharis platypoda*, MS = *Myrsine squarrosa*, BD = *Baccharis dracunculifolia*, CR = *Cladonia rappii*.

2.7. Substâncias identificadas/isoladas

2.7.1. Timol (1)

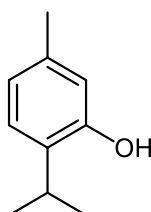
Inicialmente a presença de **1** em *Lippia triplinervis* foi detectada por cromatografia em camada delgada, por comparação do R_f do padrão de timol (0,086) e do R_f da substância (0,086) presente no extrato bruto em hexano de *L. triplinervis* utilizando o sistema hexano:acetato de etila - 9,8:0,2.

A confirmação da presença de timol (**1**) nos extratos e frações de **LT** foi realizada em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, utilizando a coluna SPB-1 (polidimetilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm). O padrão de timol, os extratos e as frações de **LT** foram injetados no equipamento utilizando a seguinte programação: Fluxo do gás de arraste (He) de 1,0 mL/min. Temperatura do injetor de 250 °C. Escala de temperatura da coluna – início em 60 °C, fim em 160 °C, sendo esta temperatura final mantida por dez minutos. O detector de massas operou no modo SIM (Monitoramento de Íon Seleccionado).

Pela comparação dos dados do espectro de massas da biblioteca do equipamento com os dados obtidos pela análise do padrão, e pela comparação do tempo de retenção do padrão e da substância nos extratos e frações foi possível confirmar a presença do timol (**1**).

Para a quantificação foram preparadas soluções padrão do timol em diclorometano nas concentrações de 1,0; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 mg/mL. Em seguida foram preparadas as soluções de **HLT**, **HHLT**, **HDLT**, **HALT**, **MLT**, **MDLT**, **MALT**, **MMLT** na concentração de 1,0 mg/mL em diclorometano e posteriormente levadas para análise em um cromatógrafo a gás com detector de massas conforme a programação descrita acima.

2.7.1.1. Dados obtidos para o timol (**1**)



timol (**1**)

FM: C₁₀H₁₄O

M: 150, 22 g.mol⁻¹

CCD: 0,086 (hexano:AcOEt 9,8:0,2 – v/v)

GC-MS (EI)-(SIM): t_R (min) = 7,82; m/z (abundância em %): 150,1 (33,8; M⁺); 135,1 (100); 91,1 (27,4).

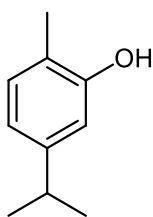
2.7.2. Carvacrol (2)

A presença de **2** em *Lippia triplinervis* inicialmente foi detectada por cromatografia em camada delgada, por comparação do R_f do padrão de carvacrol (0,077) e do R_f da substância (0,077) presente no extrato bruto em hexano de *L. triplinervis* utilizando o sistema hexano:acetato de etila - 9,8:0,2.

A presença de carvacrol (**2**) nos extratos e frações de **LT** foi confirmada através da análise em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um espectrômetro de massas utilizando a coluna SPB-1 (polidimetilsiloxano; 30 m x 0,25 mm x 0,1 µm). O padrão de carvacrol, extratos e frações de **LT** foram injetados no equipamento utilizando a seguinte programação: Fluxo do gás de arraste (He) de 1,0 mL/min. Temperatura do injetor de 250 °C. Escala de temperatura da coluna – início em 60 °C, fim em 160 °C, sendo esta temperatura final mantida por dez minutos. O detector de massas operou no modo SIM (Monitoramento de Íon Selecionado).

Pela comparação dos dados do espectro de massas da biblioteca do equipamento com o obtido na análise e pela comparação do tempo de retenção do padrão e da substância nos extratos e frações confirmou-se a presença de carvacrol (**2**). Posteriormente foram preparadas soluções padrão de carvacrol em diclorometano nas concentrações de 0,25; 0,125; 0,0625; 0,003125; 0,0015625 mg/mL. Em seguida foram preparadas as soluções de **HLT**, **HHLT**, **HDLT**, **HALT**, **MLT**, **MDLT**, **MALT**, **MMLT** na concentração de 1,0 mg/mL em diclorometano e levadas para análise em um cromatógrafo a gás com detector de massas conforme descrito em **2.7.1**.

2.7.2.1. Dados obtidos para o carvacrol (2)



carvacrol (**2**)

FM: C₁₀H₁₄O

M: 150, 22 g.mol⁻¹

CCD: 0,077 (hexano:AcOEt 9,8:0,2 – v/v)

GC-MS (EI)-(SIM): t_R (min) = 7,94; m/z (abundância em %): 150,1 (37,7; M⁺); 135,1 (100); 91,1 (27,8).

2.7.3. (-)-(S)-Ácido úsnico (3)

Metodologia A:

O líquen *Cladonia rappii*, previamente seco e triturado (101,4 g), foi transferido para um erlenmeyer de dois litros e a ele foram adicionados 305 mL de etanol absoluto. O sistema foi mantido em temperatura ambiente por sete dias, sendo agitado uma vez por dia.

Após este período, o material foi filtrado em funil sinterizado de dois litros e o filtrado teve seu volume reduzido em evaporador rotatório sendo obtido ao final deste processo 19,7 g de extrato bruto (**ECR**).

Após a extração descrita acima, 15,0 g do extrato bruto foram submetidos ao processo de cromatografia líquida a vácuo utilizando-se dois litros de cada solvente em polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol), sendo obtidas suas respectivas frações.

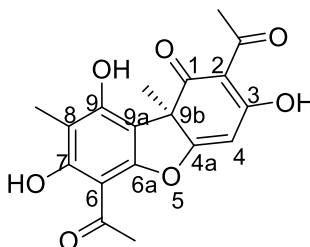
Da fração de acetato de etila (**EACR**, 3,48 g) retirou-se 1,0 g para ser purificado por cromatografia em coluna, utilizando sílica-gel como fase estacionária e o sistema de eluente hexano:AcOEt:acetona:ácido acético - 140:70:20:20. Foram coletadas 36 alíquotas, sendo o ácido úsnico (**3**) (38,4 mg) obtido das frações 28-36 na forma de um pó amarelo.

Metodologia B:

O líquen (*C. rappii*) seco e triturado (84,7 g) foi extraído com acetona (600 mL) por sete dias sob agitação constante em agitador orbital. Filtrou-se o extrato em funil sinterizado e o seu volume foi reduzido em evaporador rotatório, sendo obtido um óleo amarelo escuro **ACR** (21,5 g). O material foi solubilizado em uma solução de acetona e etanol a quente (20:1) (50,0 mL) e posteriormente foi deixado sob refrigeração por doze horas em um freezer a uma temperatura de -10,0 °C.

Após este período observou-se a formação de um precipitado amarelo que foi filtrado em funil sinterizado e lavado com etanol (3 x 15 mL). Reservou-se o filtrado para a posterior extração de **4** e o precipitado cristalizado em uma mistura de acetona e etanol (10:1), formando cristais (agulhas amarelas) do ácido úsnico (**3**) (3,6 g) (MAYO et al., 2011).

2.7.3.1. Dados obtidos para o ácido úsnico (3)



(-)-(S)-ácido úsnico (**3**)

FM: C₁₈H₁₆O₇

M: 344,32 g.mol⁻¹

Aspecto: Cristais amarelos.

CCD: 0,52 (Hex:AcOEt:Acetona:HAc – 200:50:20:20-v/v)

$[\alpha]_D^{20} = -391,0$ (c 0,7, CHCl₃) Lit. $[\alpha]_D^{20} = -486,0$ (c 0,4, CHCl₃)

T_f: 193,7-194,3 °C

Lit. **T_f:** 193,0 °C.

Infravermelho (reflectância, cm^{-1} , λ_{max}): 1688, 1627, 1605, 1283, 1067.

RMN de ^1H (300 MHz; CDCl_3 ; $\delta_{\text{CDCl}_3} = 7,26$): δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição) 1,75 (1H, s, 9b- CH_3); 2,08 (1H, s, 8- CH_3); 2,65 (3H, s, 2- OCCH_3); 2,66 (3H, s, 6- OCCH_3); 5,97 (1H, s, H-4); 11,02 (1H, s, 9-OH); 13,30 (1H, s, 7-OH); 18,84 (1H, s, 3-OH).

RMN de ^{13}C (75 MHz; CDCl_3 ; $\delta_{\text{CDCl}_3} = 77,00$): δ (atribuição) 7,5 (CH_3 , 8- CH_3); 27,9 (CH_3 , 2- OCCH_3); 31,3 (CH_3 , 6- OCCH_3); 32,1 (CH_3 , 9b- CH_3); 59,0 (C, C-9b); 98, (CH, C4); 101,4 (C, C6); 155,1 (C, C-6a); 103,9 (C, C-9a); 105,2 (C, C-2); 109,2 (C, C-8); 157,4 (C, C-9); 163,8 (C, C-7); 179,3 (C, C-4a); 191,6 (C, C-3); 198,0 (C=O, C-1); 200,3 (C=O, 6- OCCH_3); 201,7 (C=O, 2- OCCH_3).

HRMS [ESI (-), IT-TOF]: Calculado para $\text{M-H} = \text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_7$ 343,0823; encontrado 343,0792.

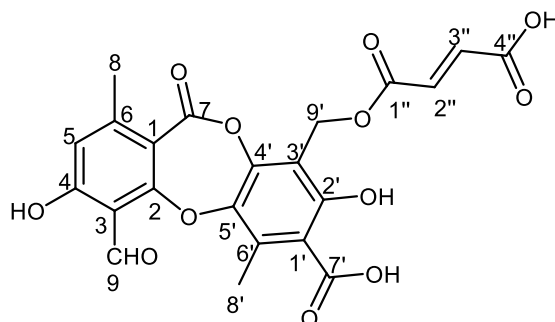
2.7.4. Ácido fumarprotocetrárico (4)

Após a extração do ácido úsnico (3) pela metodologia B, o filtrado que havia sido reservado teve seu volume reduzido em evaporador rotatório e o material foi solubilizado com uma mistura de acetona:clorofórmio (20:1) a quente. Após o resfriamento da solução esta foi levada ao freezer por um período de 24 horas a uma temperatura de $-10,0\text{ }^\circ\text{C}$.

Após este tempo observou-se a formação de um precipitado cinza que foi filtrado em funil sinterizado e lavado com clorofórmio (3 x 10 mL) e acetona (3 x 20 mL).

O precipitado foi secado em dessecador e o filtrado reservado para o isolamento do ácido rapiidico (5). Ao final foram obtidos 2,33 g de um pó cinza claro posteriormente caracterizado como sendo o ácido fumarprotocetrárico (4).

2.7.4.1. Dados obtidos para o ácido fumarprotocetrário (4)



ácido fumarprotocetrário (4)

FM: C₂₂H₁₆O₁₂

M: 472,36 g.mol⁻¹

Aspecto: Pó cinza claro

CCD: 0,56 (MeOH:AcOEt – 1:1-v/v)

T_f: decompôs acima de 250 °C. **T_f: Lit.** 252,2-262,0 °C.

Infravermelho (reflectância, cm⁻¹, λ_{max}): 3094, 1745, 1699, 1655, 1615, 1575, 1155.

RMN de ¹H (300 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{(CD₃)₂SO} = 2,49): δ (integração, multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição) δ 2,41 (3H, s, H-8'); 2,44 (3H, s, H-8); 5,29 (2H, s, H-9'); 6,63 (2H, s, H-2'', H-3''); 6,83 (1H, s, H-5); 10,56 (1H, s, H-9); 11,96 (1H, s, 4-OH).

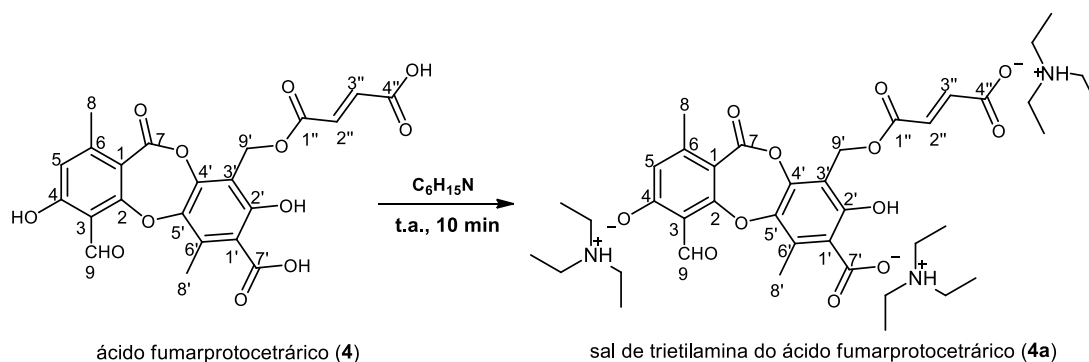
RMN de ¹³C (75 MHz; DMSO-*d*₆; δ_{(CD₃)₂SO} = 49,5): δ (atribuição) δ 14,6 (CH₃, C-8'); 21,3 (CH₃, C-8); 56,8 (CH₂, C-9'); 112,0 (C, C-1); 112,1 (C, C-3); 113,2 (C, C-3'); 116,8 (CH, C-5); 117,2 (C, C-1'); 131,9 (C, C-6'); 132,1 (CH, C-2''); 135,0 (CH, C-3''); 142,1 (C-O, C-5'); 145,5 (C, C-4'); 152,0 (C, C-6); 155,3 (C-OH, C-2'); 160,9 (COOH, C-7); 163,9 (C-O, C-2); 163,9 (C-OH, C-4); 164,6 (COOR, C-1''); 165,6 (COOH, C-4''); 170,1 (COOH, C-7'); 191,6 (CHO, C-9).

HRMS [ESI (-), IT-TOF]: Calculado para M-H = C₂₂H₁₅O₁₂ 471,0569; encontrado 471,0603.

2.7.5. Sal de trietilamina do ácido fumarprotocetrário (4a)

Ao tubo de RMN contendo 600 µL de uma mistura de CDCl₃ e (CD₃)₂SO – 1:1 e 6,0 mg do ácido fumarprotocetrário foram adicionadas duas gotas de trietilamina. Posteriormente o tubo foi agitado e mantido em temperatura ambiente por dez minutos. Após este período o material foi levado para análise por RMN de ¹H.

2.7.5.1. Dados espectroscópicos obtidos para o sal de trietilamina do ácido fumarprotocetrário (4a)



RMN de ¹H (300 MHz; DMSO-d₆:CDCl₃/3:1; δ (CD₃)₂SO = 2,49): δ (multiplicidade, constante de acoplamento, atribuição) 2,16 (s, H-8); 2,57 (s, H-8'); 5,13 (s, H-9'); 6,07 (s, H-5); 6,23 (d, 15,6 Hz, H-2''); 6,62 (d, 15,6 Hz, H-3''); 10,38 (s, H-9).

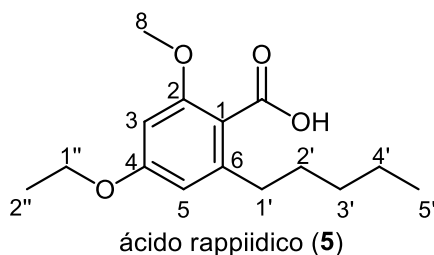
2.7.6. Ácido rappedico (5)

Após a extração de **3** e **4**, o filtrado que havia sido reservado teve seu volume reduzido em evaporador rotatório e 10,0 g do extrato obtido foram submetidos a um processo de separação por cromatografia líquida a vácuo. Para tanto, foram utilizados dois litros de cada um dos seguintes solventes, em polaridade crescente: Hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. De cada extração com os solventes foram obtidas as suas respectivas frações **AHCR**, **ADCR**, **AAeCR** e **AMCR**. A fração de diclorometano (**EDCR**, 0,309 g) foi submetida a um processo de separação por cromatografia em coluna.

O processo de purificação por cromatografia em coluna ocorreu utilizando como eluente o sistema hexano:diclorometano (2:1, 1:1, 1:2, 1:3 e diclorometano puro) e como fase estacionária sílica-gel.

Por este procedimento foram obtidas as frações I, II, III, IV, V, VI, VII e VIII. A fração IV (47,0 mg) foi submetida a outro processo de separação por cromatografia em coluna utilizando o sistema hexano:diclorometano:acetona (10:1:0,5) e assim obteve-se a fração IV-A (39,0 mg). A fração IV-A foi submetida novamente ao processo de separação, desta vez utilizando CCD preparativa (Hex:CH₃Cl:acetona – 15:1:0,5), onde obtiveram-se 13,7 mg de uma nova fração, identificada como IV-A-2. Esta fração foi submetida a outro processo de purificação por CCD preparativa, porém utilizando o eluente tolueno:ácido acético – 200:30, e assim obteve-se a fração IV-A-2-1, que posteriormente identificou-se como a substância inédita ácido rappedico (**5**) (8,0 mg).

2.7.6.1. Dados obtidos para o ácido rapiidico (5)



FM: C₁₅H₂₂O₄ **M:** 266,33 g.mol⁻¹

CCD: 0,43 (Hexano:CHCl₃ – 1:1-v/v)

Aspecto: Óleo vermelho claro.

Infravermelho (reflectância, λ_{max}): λ_{max} 2958, 2932, 2856, 1726, 1650, 1254, 1048 cm⁻¹.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 0,90 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, H-5'); 1,33-1,36 (4H, m, H3' e H4'); 1,41 (3H, t, *J* = 7,2 Hz, H2''); 1,57 (2H, sl, H2'); 2,58-2,83 (2H, m, H1'); 3,8 (3H, s, CH₃O); 4,4 (2H, q, *J* = 7,2Hz, H1''); 6,28 (1H, d, *J* = 7,2Hz, H3); 6,33 (1H, d, *J* = 7,2Hz, H5); 11,84 (1H, s, COOH).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 14,09 (CH₃, C-2''); 14,13 (CH₃, C-5'); 22,6 (CH₂, C-4'); 31,7 (CH₂, C-2'); 32,1 (CH₂, C-3'); 37,0 (CH₂, C-1'); 55,3 (CH₃, OCH₃); 61,2 (CH₃, C-1''); 98,8 (CH, C-3); 104,8 (CH, C-5); 110,6 (C, C-1); 148,0 (C, C6); 163,8 (C, C-2); 165,6 (C, C-4); 171,6 (COOH).

EM, m/z (%): 266 (16,41); 220 (27,56); 210 (36,11); 192 (20,58); 191 (11,19); 178 (8,3); 177 (16,2); 165 (12,11); 164 (100,0); 138 (10,98); 137 (16,97); 135 (29,94); 108 (8,40); 92 (10,05); 91 (14,08); 79 (16,31); 78 (17,10); 77 (25,59); 69 (18,49); 65 (16,34); 55 (13,81); 51(8,92).

3. Resultados e Discussões

3.1. Óleos essenciais

3.1.1. *Lippia triplinervis* – LT

O rendimento do óleo essencial (m/m) extraído das partes aéreas de *L. triplinervis* coletado no Pico do Mamute (**LTPM**) foi de 2,21% (**Tabela 1.3, pág. 59**). Para o material coletado no Pico do Grama (**LTPG**) foi de 2,91% em relação à massa seca da planta, valor superior aos 1,1% observado por Leitão e colaboradores (2011).

O óleo essencial de *L. triplinervis* foi caracterizado pela primeira vez em plantas coletadas na cidade de Aiuruoca - Minas Gerais, em um local conhecido como “Campo dos Poejos”, em altitudes acima de 1800 m (LEITÃO et al., 2011). Estes autores descreveram como componentes majoritários ipsenona (11,4%) e mircenona (57,7%) para as plantas coletadas no mês de abril. Para as plantas coletadas em setembro, os autores observaram uma queda drástica na quantidade de mircenona (13,5%) e um aumento na quantidade de ipsenona (17,4%), e de (Z)-tagetona de 0,1% para 19,4%. No entanto, nenhum destes constituintes foram detectados nas amostras coletadas no PESB.

Em geral, os componentes mais frequentemente encontrados no óleo essencial de plantas do gênero *Lippia* são o limoneno, β -cariofileno, *p*-cimeno, cânfora, linalool, α -pineno e timol (PASCUAL et al., 2001). Assim, para *L. triplinervis*, coletada no Pico do Mamute (**LTPM**), foram detectados por GC-MS, como constituintes majoritários, o carvacrol (31,9%), timol (30,6%), e *p*-cimeno (12,3%), já para a mesma espécie, porém coletada no Pico do Grama (**LTPG**) foram detectados como constituintes majoritários carvacrol (46,4%), *p*-cimeno (15,9%) e γ -terpineno (12,9%) (**Tabela 1.3, pág. 59**).

Tabela 1.3. Constituintes presentes (%) nos óleos essenciais de *L. triplinervis* (LTPM e LTPG)

Nº	COMPOSTOS	IR ^{Al}	IR ^A	LTPM (%)	LTPG (%)
Hidrocarbonetos Monoterpênicos				26,4	34,0
1.	α -Tujeno	924	924	0,7	0,3
2.	α -Pineno	932	929	0,5	0,7
3.	Canfeno	946	943	0,4	0,2
4.	β -Pineno	974	971	0,1	-
5.	Mirceno	988	990	2,0	2,0
6.	α -Felandreno	1002	1001	0,1	0,1
7.	δ -3-Careno	1008	1007	0,1	0,1
8.	α -Terpineno	1014	1013	1,1	1,4
9.	<i>p</i> -Cimeno	1020	1022	12,3	15,9
10.	Limoneno	1024	1025	0,3	0,3
11.	β - <i>E</i> -Ocimeno	1044	1047	0,1	-
12.	γ -Terpineno	1054	1056	8,6	12,9
13.	Terpinoleno	1086	1085	0,1	0,1
Monoterpenos Oxigenados				62,9	55,0
14.	1,8-Cineol	1026	1028	0,1	-
15.	Timol metileter	1232	1232	-	4,4
16.	Carvacrol metileter	1241	1242	-	0,3
17.	Timol	1289	1295	30,6	3,2
18.	Carvacrol	1298	1304	31,9	46,4
19.	Acetato de carvacrol	1370	1371	0,3	0,7
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos				6,8	6,9
20.	α -Copaeno	1374	1374	0,3	0,2
21.	<i>Trans</i> -Cariofileno	1417	1417	1,3	4,2
22.	<i>Trans</i> - α -Bergamoteno	1432	1434	0,1	-
23.	α -Humuleno	1452	1451	0,1	0,2
24.	Germacreno-D	1484	1478	0,7	0,6
25.	α -Muuroleno	1500	1497	0,1	-
26.	β -Bisaboleno	1505	1507	3,6	1,2
27.	γ -Cadineno	1513	1511	0,2	0,1
28.	δ -Cadineno	1522	1521	0,4	0,3
29.	Germacreno-B	1559	1555	-	0,1
Não identificados				2,9	3,0
Total				99,0	98,9
Rendimento %				2,21	2,92

IR^{Al} = Índice de retenção aritmético da literatura (ADAMS, 2007). IR^A = Índice de retenção aritmético encontrado.

O timol presente em maior concentração em **LTPM** (30,6%) apareceu em baixa concentração em **LTPG** (3,2%) enquanto o carvacrol ocorreu em maior concentração em **LTPG** (46,4%) do que em **LTPM** (31,9%). O predomínio de timol e/ou carvacrol entre os constituintes do óleo essencial de plantas do gênero *Lippia* também já foi observado por diferentes autores como em *L. sidoides* (VERAS et al., 2012) e *L. grandis* (SARRAZIN et al., 2012).

Os terpenos, também conhecidos como terpenóides ou isoprenóides, são o maior grupo de produtos naturais, compreendendo mais de 35.000 substâncias, sendo constituídos por unidades isoprênicas de cinco átomos de carbono. A condensação entre as unidades isoprênicas é responsável pela formação de diferentes classes de terpenos, conhecidas como monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40).

A biossíntese dos terpenos (**Figura 1.24, pág. 61**) e consequentemente dos monoterpenos ocorre por duas vias metabólicas nas células das plantas, uma delas através da via do mevalonato, no citosol, e a outra pelo metileriltritol-4P plastidial. Ambos levam à construção das unidades formadoras de terpenos e terpenóides isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMPP). Uma série de condensações entre estas unidades isoprênicas leva à formação de geranil difosfato (GPP), pela via plastidial do metileriltritol-4P, precursor dos monoterpenos, diterpenos e carotenóides, enquanto pela via do ácido mevalônico, no Citosol, são produzidos os demais terpenos (AHARONI et al., 2005; LOBO, LOURENÇO, 2007; DEWICK, 2009).

As proposições foram confirmadas através do estudo das reações de formação de timol e carvacrol utilizando enzimas do citocromo P450, que levaram à formação destes monoterpênóides. Na **Figura 1.25** é possível observar a proposta para a biossíntese de timol e carvacrol (CROCOLL, 2011).

Por esta proposta, o processo se inicia com a formação do precursor geranil difosfato pela condensação de IPP e DMAPP pela enzima geranil difosfato sintase (GDS). Devido à estereoquímica *E* impeditiva do geranil difosfato, ocorre uma isomerização em linalil difosfato que através de um processo de ciclização forma o cátion metil- α -terpinil. Um rearranjo 1,2 de Wagner-Meerwein e posteriormente a ação da enzima gama terpineno sintase (GTS) formam o intermediário γ -terpineno (DEWICK, 2009), que por sua vez passa por um processo de oxidação catalisado pelas enzimas do citocromo P450, CYP71D178 para formar o timol e CYP71D182 para formar o carvacrol. O *p*-cimeno também é formado pela ação destas enzimas (CROCOLL, 2011) (**Figura 1.25**).

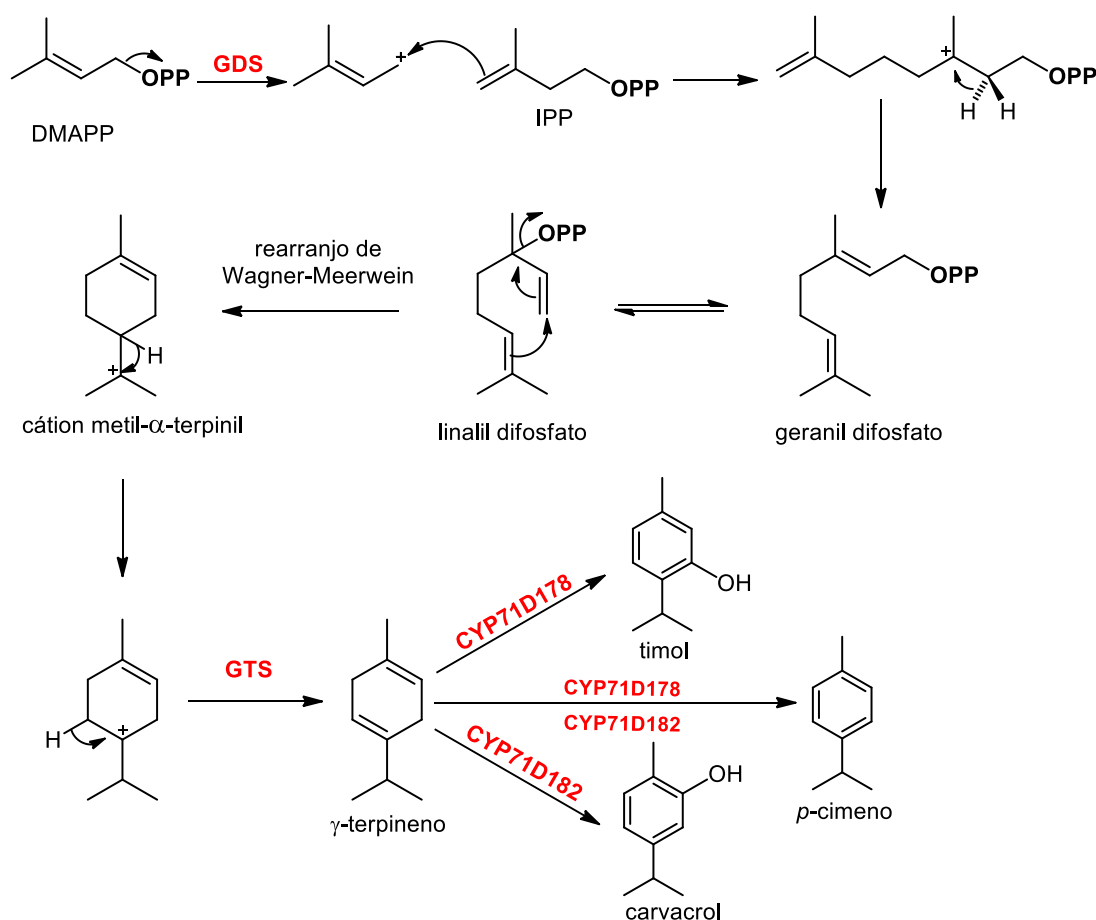


Figura 1.25. Proposta de biossíntese para o timol (1) e carvacrol (2).

3.1.2. *Baccharis platypoda* - BP

Em *B. platypoda* observou-se que o rendimento do óleo essencial foi de 0,8% para **BPPM** e 0,92% para **BPPG**. Os constituintes majoritários detectados por GC-MS foram os monoterpenos β -felandreno (27,6%), sabineno (17,6%) e α -pineno (8,6%) para **BPPM** e sabineno (26,3%), α -pineno (12,1%) e α -amorfano (10,3%) para **BPPG** (Tabela 1.4).

Tabela 1.4. Constituintes presentes (%) nos óleos essenciais de *B. platypoda* (**BPPM** e **BPPG**)

Nº	COMPOSTOS	IR ^{Al}	IR ^A	BPPM (%)	BPPG (%)
Hidrocarbonetos Monoterpênicos				69,8	60,3
1.	α -Tujeno	924	924	3,2	5,4
2.	α -Pineno	932	929	8,7	12,1
3.	Sabineno	969	969	17,6	26,3
4.	Mirceno	988	990	3,3	5,3
5.	α -Felandreno	1002	1001	0,3	0,2
6.	α -Terpineno	1014	1013	2,5	2,3
7.	<i>p</i> -Cimeno	1020	1022	0,3	0,3
8.	Limoneno	1024	1025	-	3,2
9.	β -Felandreno	1025	1027	27,6	-
10.	β - <i>E</i> -Ocimeno	1044	1047	0,9	1,2
11.	γ -Terpineno	1054	1056	4,4	4,0
12.	Terpinoleno	1086	1085	1,0	ND
Monoterpenos Oxigenados				0,8	6,2
13.	Hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1065	1064	-	0,3
14.	Linalool	1095	1098	0,7	0,4
15.	Hidrato de <i>trans</i> -sabineno	1137	1138	-	5,5
16.	α -Terpineol	1186	1188	0,1	-
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos				4,0	16,4
17.	α -Copaeno	1374	1374	0,1	0,3
18.	β -Elemeno	1389	1390	0,2	0,4
19.	<i>Trans</i> -Cariofileno	1417	1417	0,4	0,6
20.	α -Humuleno	1452	1451	0,1	0,5
21.	Alloaromadendreno	1458	1458	-	0,3
22.	γ -Muuroleno	1478	1475	-	0,7
23.	α -Amorfano	1483	1480	-	10,3
24.	α -Muuroleno	1500	1497	0,5	0,4
25.	γ -Cadineno	1513	1511	0,5	0,8
26.	δ -Cadineno	1522	1521	2,0	2,1
27.	Cadina-1,4-dieno	1533	1530	0,1	-
28.	α -Cadineno	1537	1535	0,1	-
Não identificados				21,5	14,6
Total				96,3	97,5
Rendimento %				0,80	0,92

IR^{Al} = Índice de retenção aritmético da literatura (ADAMS, 2007). IR^A = Índice de retenção aritmético encontrado.

O óleo essencial de *B. platypoda* foi anteriormente caracterizado apenas por Ferracini e colaboradores (1995) tendo sido coletada no município de Santana do Riacho - MG. Os autores relataram rendimento de 0,49% e como componentes majoritários o monoterpeno α -terpineol (4,11%) e os sesquiterpenos α -cadinol (5,09%) e espatulenol (8,76%). A diferença na constituição química destas duas amostras pode indicar a existência de dois quimiotipos distintos para *B. platypoda*, um deles sendo produtor de β -felandreno (**BPPM** – 27,6%) e o outro de sabineno (**BPPG** – 26,3%).

Sabineno e β -felandreno (**Figuras 1.26 e 1.27, pág. 65**) possuem atividades bem distintas já reportadas na literatura. O sabineno, por exemplo, é ativo contra os fungos *Alternaria* sp. (KOHZAKI et al., 2009), *B. cinerea*, *C. abietina*, *P. funerea*, *P. oculata* e *S. juniperi* (ESPINOSA-GARCIA; LANGENHEIM, 1991). Já β -felandreno, por outro lado, possui propriedades bem interessantes, agindo como inseticida, combatendo cupins (SEO et al., 2014) e também utilizado como extrator de cobre desde o início do século passado (PHELLANDRENE..., 1911).

A biossíntese do sabineno ocorre pela via plastidial do metileritritol-4P. Inicia-se com a condensação entre DMAP e IPP, catalisada pela enzima geranyl difosfato sintase (GDS) para formar geranyl difosfato que é isomerizado em linalil difosfato. Posteriormente, ocorre a ciclização do linalil difosfato formando o intermediário chave o cátion metil α -terpinil (DEWICK, 2009).

Através de uma sucessão de reações este intermediário pode dar origem a diferentes tipos de monoterpenos, e por um rearranjo de Wagner-Meerwein do tipo 1,2 promove a formação do cátion tujil, que por uma redução catalisada pela enzima sabineno sintase (SS) forma o monoterpeno sabineno (**Figura 1.26, pág. 65**) (DEWICK, 2009).

A biossíntese para o β -felandreno ocorre de maneira análoga à do sabineno. A diferença se dá por um rearranjo de Wagner-Meerwein do tipo 1,3, que gera o cátion β -felandril, que por uma redução catalisada pela enzima beta felandril sintase (BFS) forma o monoterpeno β -felandreno (**Figura 1.27, pág. 65**) (DEWICK, 2009).

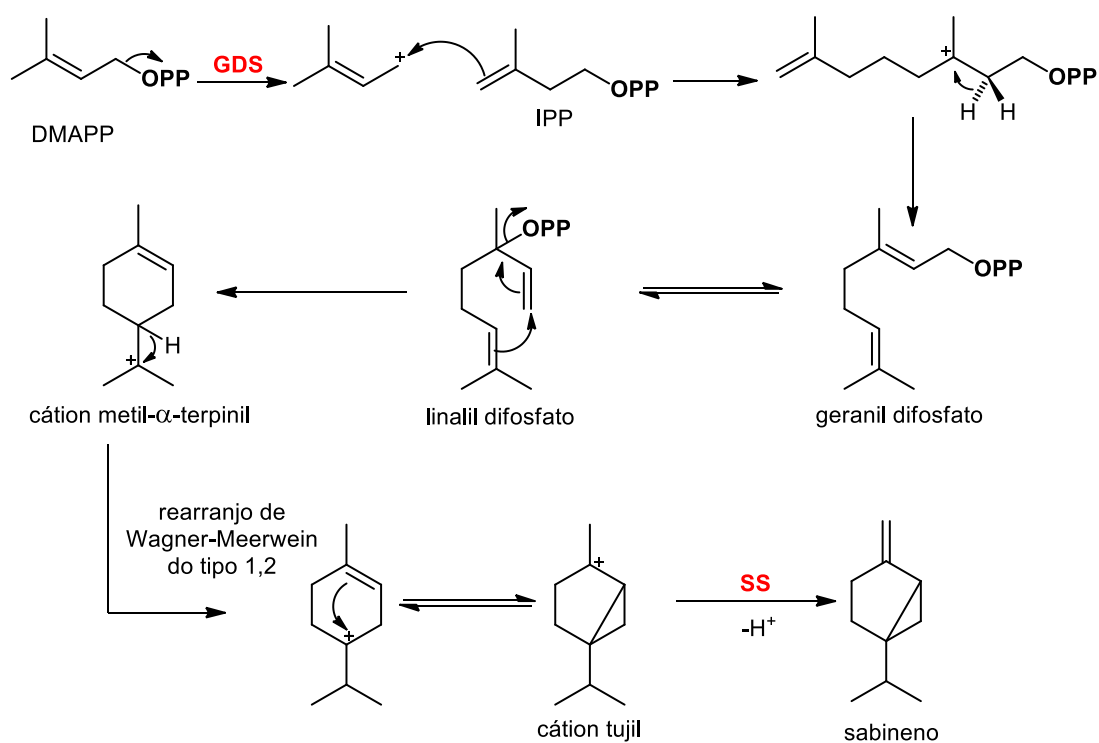


Figura 1.26. Rota de biossíntese para o sabineno.

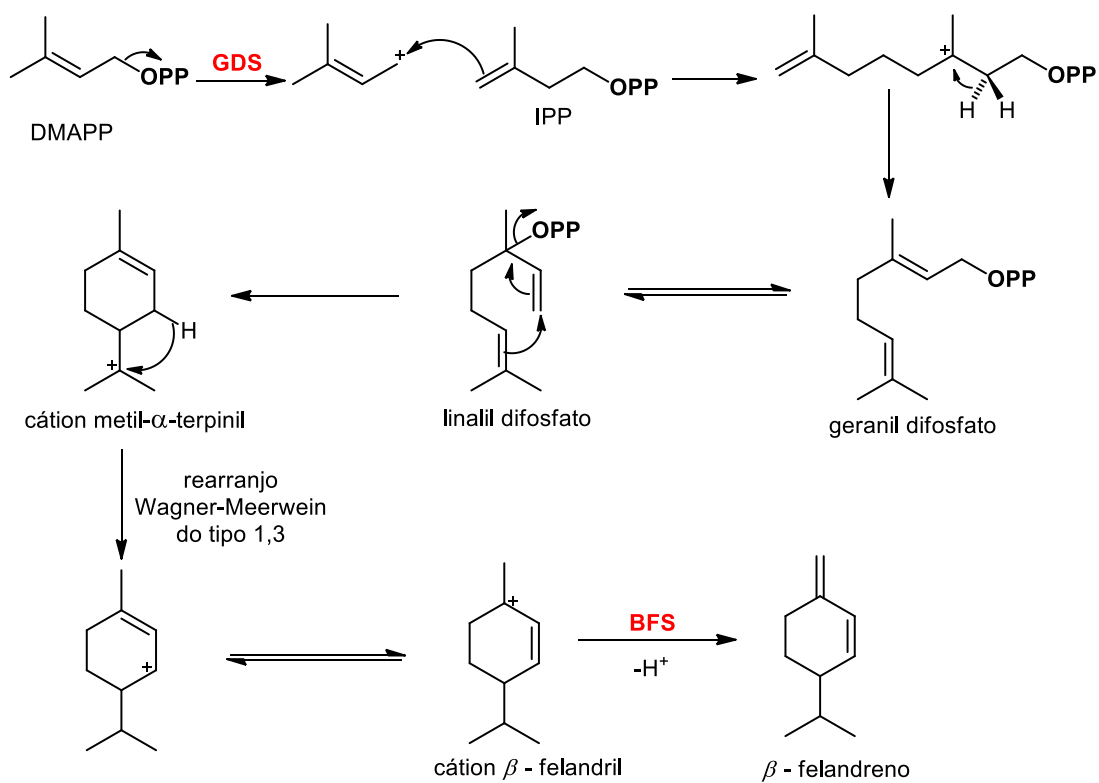


Figura 1.27. Rota de biossíntese para o β -felandreno.

3.1.3. *Baccharis dracunculifolia* – BD

Em **BD**, coletada no Campus da UFV, o rendimento do óleo essencial foi de 0,8%. Os constituintes majoritários detectados por GC-MS foram os monoterpenos β -pineno (6,7%) e limoneno (6,9%) e os sesquiterpenos biciclogermacreno (6,5%), germacreno D (7,2%), e nerolidol (22,3%) (**Tabela 1.5**). O perfil químico do óleo essencial de **BD** é semelhante aos reportados por Loayza et al. (1995), Ferracini et al. (1995), Fabiane et al. (2008) e Martinez-Correa et al. (2012). Nestes trabalhos pôde-se observar que os componentes majoritários mais comuns entre eles foram os monoterpenos β -pineno e limoneno e também os sesquiterpenos nerolidol e espatulenol, o que corrobora com a análise realizada em **BD** apresentada neste trabalho.

Tabela 1.5. Constituintes presentes (%) no óleo essencial de *B. dracunculifolia* (**BD**)

Nº	COMPOSTOS	IR ^{Al}	IR ^A	BD (%)
Hidrocarbonetos Monoterpênicos				18,7
1.	α -Tujeno	924	924	0,2
2.	α -Pineno	932	929	2,6
3.	β -Pineno	974	971	6,7
4.	Mirceno	988	990	1,3
5.	α -Terpineno	1014	1013	0,1
6.	<i>p</i> -Cimeno	1020	1022	0,1
7.	Limoneno	1024	1025	6,9
8.	β - <i>E</i> -Ocimeno	1044	1047	0,5
9.	γ -Terpineno	1054	1056	0,1
10.	Terpinoleno	1086	1085	0,2
Monoterpenos Oxigenados				1,4
11.	Acetofenona	1059	1062	0,1
12.	Linalool	1095	1098	0,7
13.	Terpinen-4-ol	1174	1175	0,2
14.	α -Terpineol	1186	1188	0,4
Hidrocarbonetos Sesquiterpênicos				52,0
15.	α -Cubebeno	1345	1348	0,1
16.	Ylangeno	1373	1369	0,2
17.	α -Copaeno	1374	1374	0,3
18.	β -Elemeno	1389	1390	0,5
19.	α -Gurjuneno	1409	1408	0,3
20.	<i>Trans</i> -Cariofileno	1417	1417	2,4
21.	Aromadendreno	1439	1438	1,1
22.	α -Humuleno	1452	1451	1,3
23.	Germacreno-D	1484	1478	7,2
24.	α -Muuroleno	1500	1497	0,7
25.	Biciclogermacreno	1500	1497	6,5

Continuação da Tabela 1.5.				
26.	δ-Cadineno	1522	1521	3,8
27.	Nerolidol	1561	1570	22,3
28.	Espatuleno	1577	1575	5,3
Fenilpropanóide				0,10
29.	Metileugenol	1403	1403	0,1
Não identificados				26,7
Total				98,9
Rendimento %				0,80

IR^{AI} = Índice de retenção aritmético da literatura (ADAMS, 2007). IR^A = Índice de retenção aritmético encontrado.

O nerolidol (**Figura 1.28, pág. 68**) foi detectado em óleos essenciais de *B. dracunculifolia* coletadas em diferentes locais. Na província de Cochabamba, Bolívia, foi encontrado na concentração de 2,11% (LOAYZA et al., 1995). Em plantas coletadas no Brasil, Ferracini e colaboradores (1995) encontraram 20,8%, no Paraná, Fabiane et al. (2008) descreveram 4,02% e em Campinas foi encontrado 5,73% por Martinez-Correa et al. (2012). É uma substância de grande interesse para a indústria de perfumaria, devido a sua capacidade fixadora, fundamental para composição de perfumes (FABIANE et al., 2008). Seu uso como agente flavorizante de alimentos é aprovado pela U.S. Food and Drug Administration, e também já foi testado como potencializador de penetração na pele para liberação de drogas terapêuticas (CORNWELL et al., 1994).

O Nerolidol possui atividades antineoplásica (WATTENBERG et al., 1991) antimalárica (LOPES et al., 1999), antibacteriana (BREHM-STECHER; JOHNSON, 2003), anti-úlceras (KOPLELL et al., 2007), antifúngica (PARK et al., 2009), inseticida (di CAMPLI et al., 2012) e anti-leishmaniose (ARRUDA et al., 2005).

O nerolidol é um sesquiterpeno* e é formado por três unidades isoprênicas C₅. A biossíntese é semelhante a dos monoterpenos, no entanto, a via pela qual ocorre é a do mevalonato, no citosol (AHARONI et al., 2005; DEWICK, 2009). Após a formação de geranyl PP, pelo mesmo processo da biossíntese dos monoterpenos, ocorre a liberação de uma unidade –OPP catalisada pela enzima farnesil difosfato sintase (FDS), formando o cátion alílico geranyl (**Figura 1.28, pág. 68**).

* O prefixo “Sesqui” vem do latim e quer dizer “uma vez e meia”.

A adição de uma unidade de IPP ao cátion alílico, catalisada por FDS gera farnesil PP. Outra unidade –OPP é liberada e gera o cátion alílico farnesil, que se converte ao cátion nerolidil, mais estável. A adição de uma unidade de –OPP ao cátion, seguida de uma hidroxilação catalisada por FDS forma o sesquiterpeno nerolidol (AHARONI et al., 2004; DEWICK, 2009).

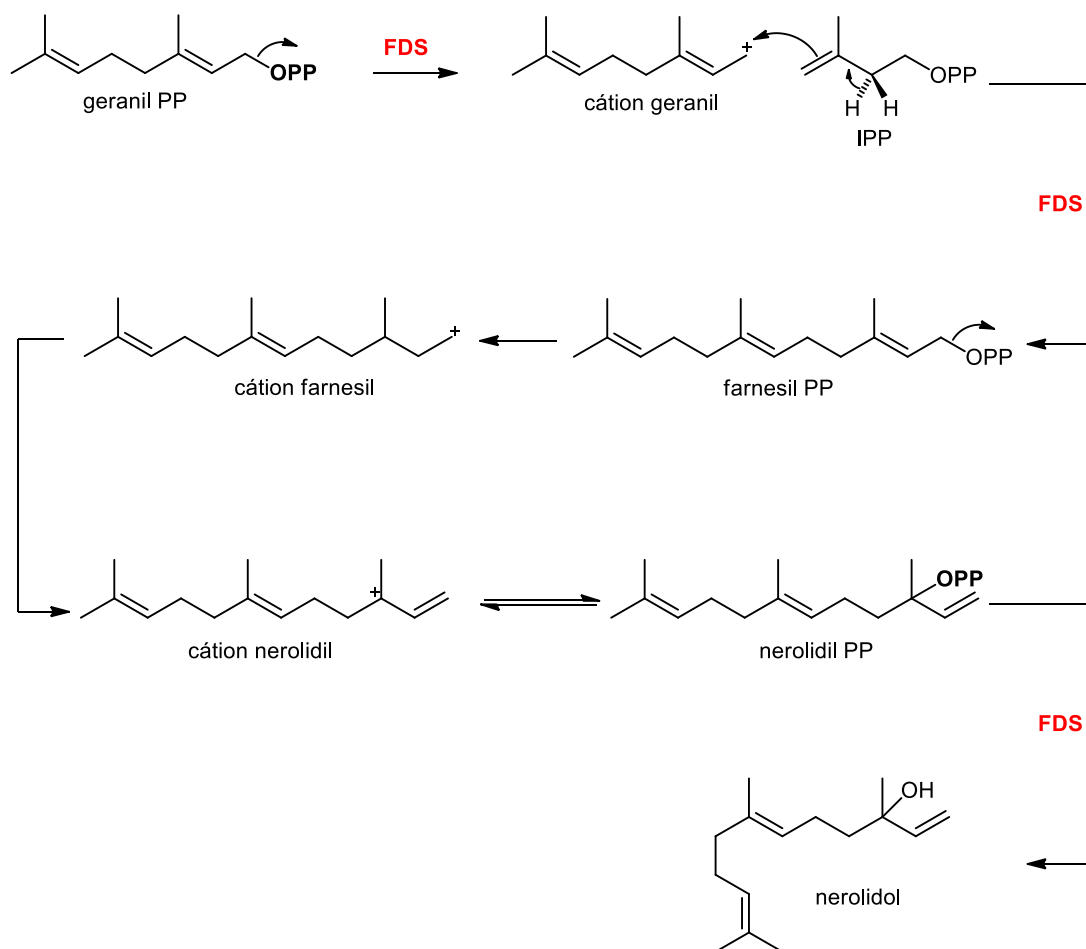


Figura 1.28. Biossíntese do nerolidol.

Para fins de comparação, todos os terpenos e terpenóides identificados neste trabalho tiveram suas estruturas desenhadas nas **Figuras 1.29, pág. 69 e 1.30, pág. 70**, juntamente com os índices aritméticos correspondentes encontrados na literatura (ADAMS, 2007).

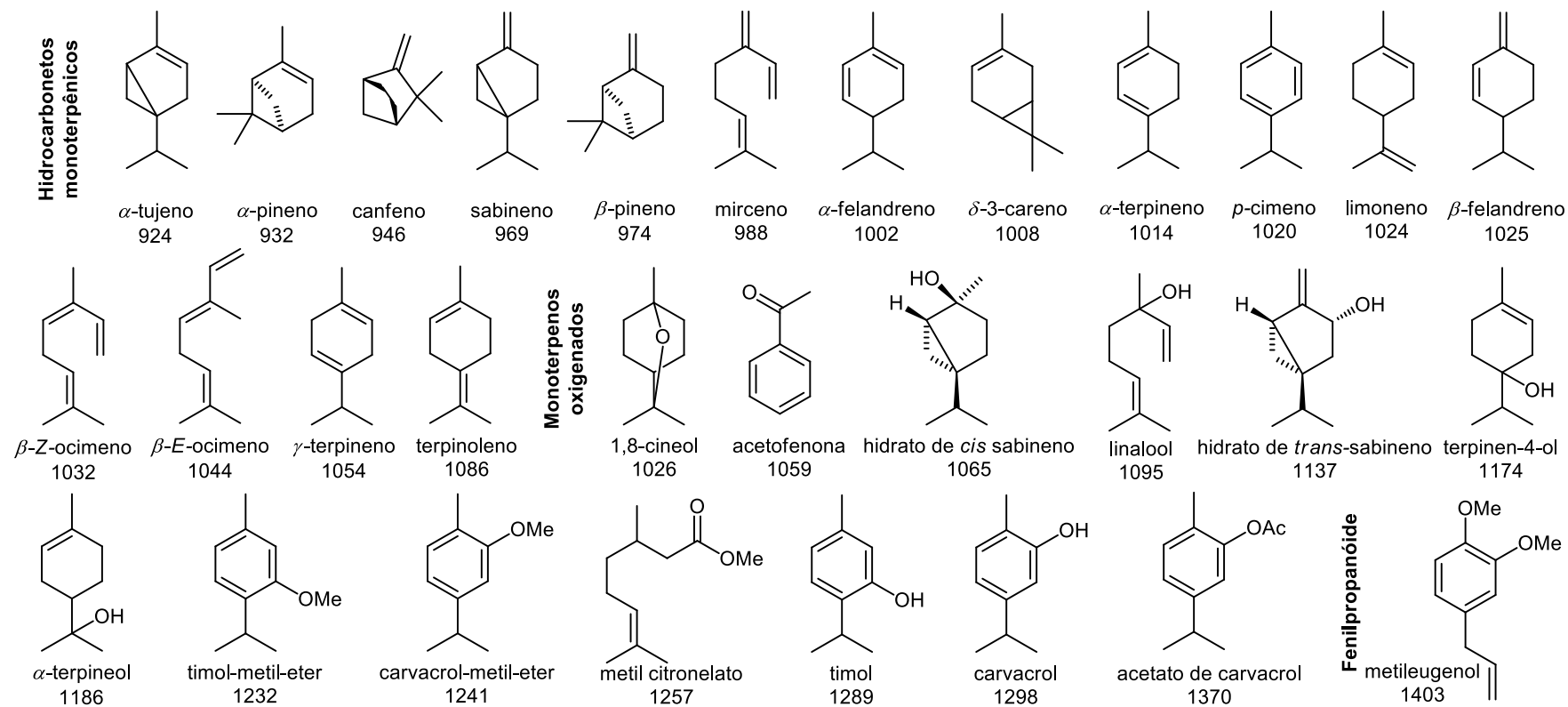


Figura 1.29. Monoterpenos e fenilpropanóide identificados neste trabalho com seus respectivos índices aritméticos descritos por Adams (2007).

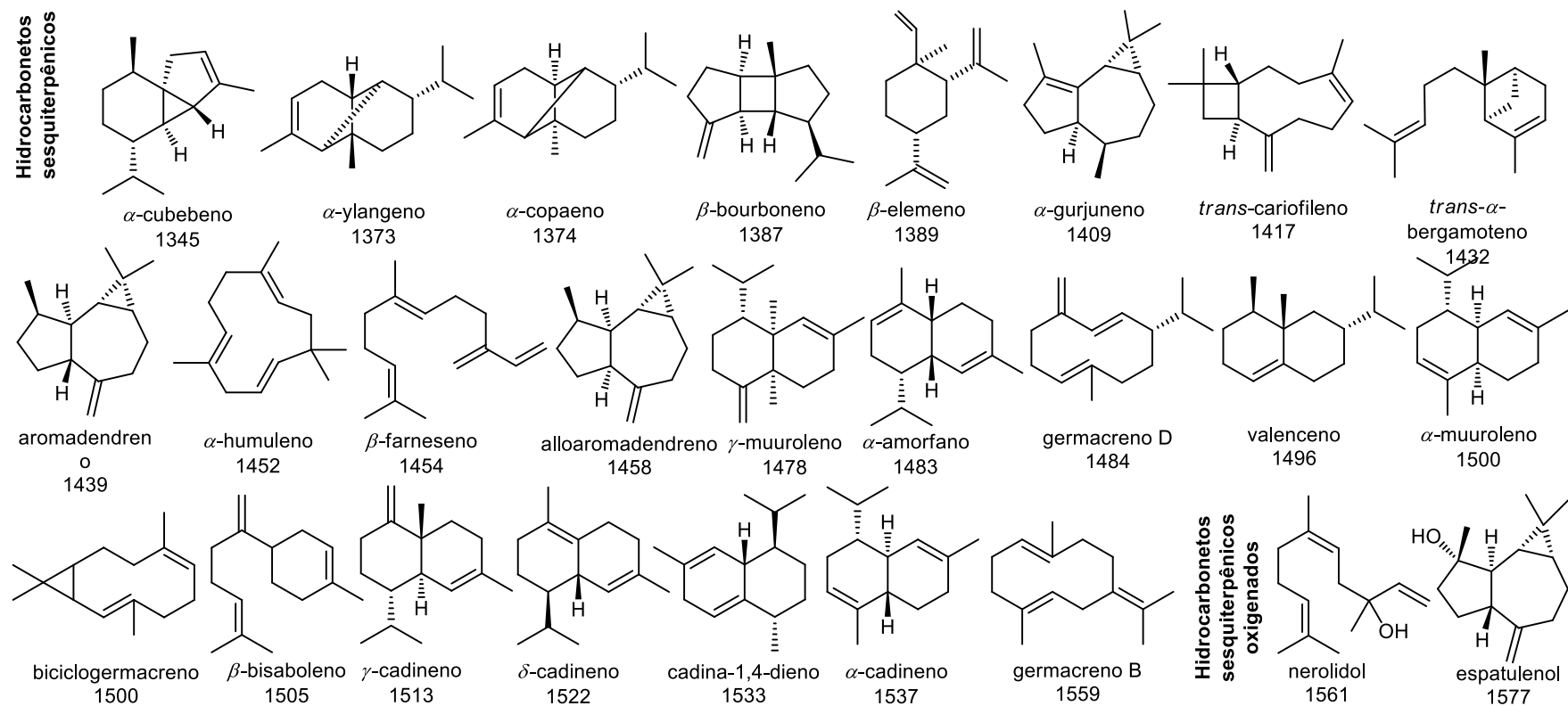


Figura 1.30. Demais terpenóides identificados neste trabalho com seus respectivos índices aritméticos descritos por Adams (2007).

3.2. Substâncias isoladas/identificadas

3.2.1. Timol (1) e Carvacrol (2) em *Lippia triplinervis*

Durante os testes de atividade biológica (**Capítulo 2**), observou-se que os extratos em hexano e metanol de *L. triplinervis* e suas respectivas frações apresentavam atividade similar a do óleo essencial desta planta. A hipótese levantada foi a de que como o óleo essencial é rico em timol e carvacrol o mesmo poderia ser observado para os extratos e frações e assim as suas atividades biológicas estariam ligadas também à presença destas duas substâncias. Dessa forma, foram realizadas a caracterização e quantificação destas substâncias nestes extratos e também nas suas frações.

Inicialmente, a presença de timol (1) e carvacrol (2) no extrato bruto em hexano foi detectada quando comparados os Rf's dos padrões destas substâncias com o Rf das substâncias presentes no extrato (0,086 e 0,077, respectivamente) (**Figura 1.31**).

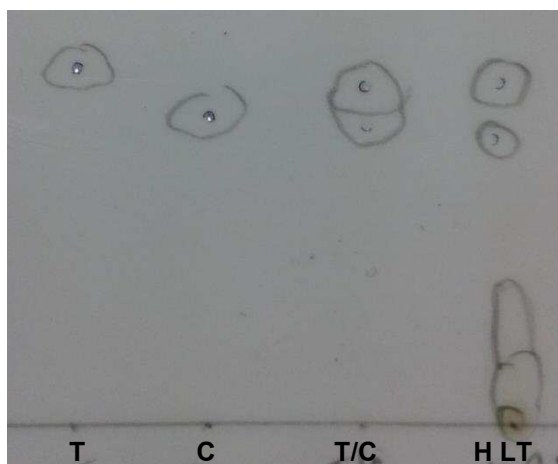


Figura 1.31. Placa de CCD para T=timol, C=carvacrol, T/C=co-aplicação de timol e carvacrol. **HLT** = Extrato bruto em hexano para *L. triplinervis*. (eluente = hexano/AcOet – 9,8:0,2 - v/v). Revelador: Radiação ultravioleta.

A confirmação da presença destas duas substâncias no extrato bruto de hexano foi realizada utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. A metodologia utilizada foi otimizada de modo a fornecer uma análise cromatográfica mais rápida e com uma boa resolução em relação aos compostos timol e carvacrol. Assim, os tempos de retenção dos padrões de timol e carvacrol ($t_r = 7,82$ e $7,94$ minutos, respectivamente) foram os mesmos observados para dois picos encontrados em **HLT** (**Figura 1.32**).

Neste cromatograma é possível ver a exata sobreposição entre os picos de timol (azul) e carvacrol (vermelho) dos padrões com os picos destas substâncias, presentes em **HLT**.

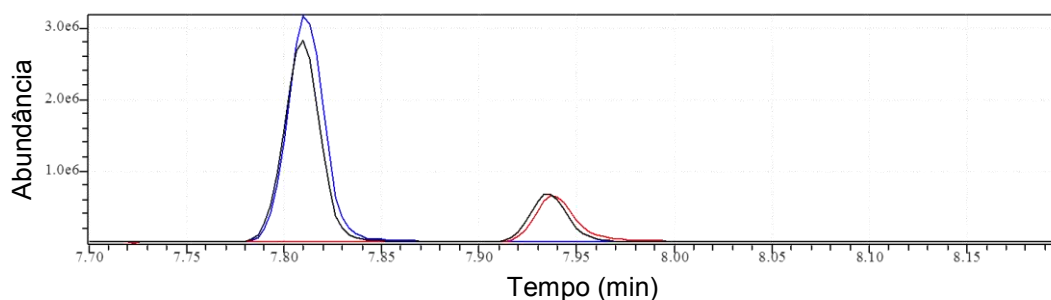


Figura 1.32. Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de timol (1) (azul) e carvacrol (2) (vermelho) e do extrato bruto **HLT** (preto).

Após a escolha da metodologia, o sistema de análise por espectrometria de massas foi realizado com o detector do equipamento operando no modo “SIM” (Monitoramento de Íon Seleccionado), que permitiu realizar o monitoramento dos íons seleccionados e assim obter maior sensibilidade e seletividade em relação à aquisição no modo TIC (Corrente Iônica Total), adquirindo-se ao final uma melhor relação sinal/ruído.

Assim os espectros de massas obtidos para o timol (**1**) e carvacrol (**2**) por esta metodologia (**Figura 1.33**), apresentaram os picos característicos da fragmentação destas substâncias em m/z 150 [pico do íon molecular (M^+)], e os picos em m/z 135 (pico base) e em m/z 91 (CHEN et al., 2014).

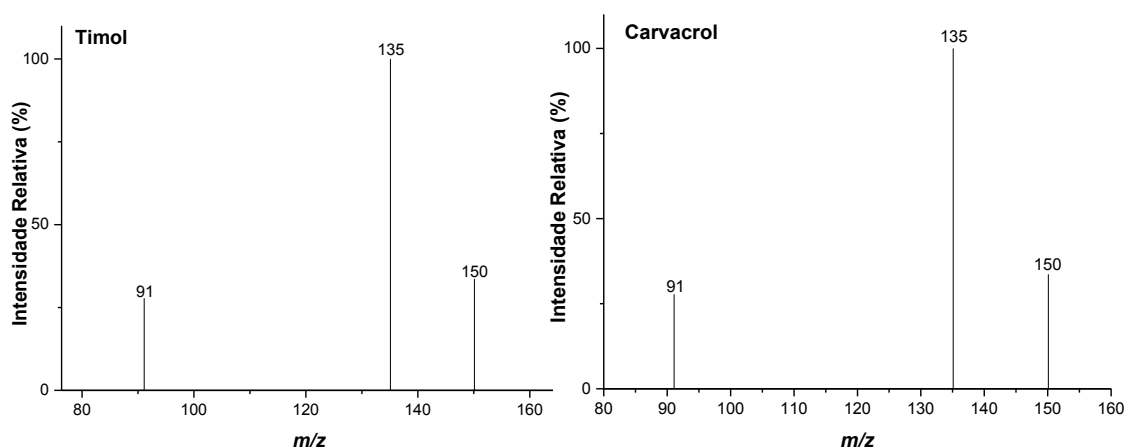


Figura 1.33. Espectros de massas (GC/MS-EI) do timol (**1**) e do carvacrol (**2**) obtidos no modo SIM.

A proposta de fragmentação para explicar os picos obtidos pode ser observada na **Figura 1.34** (pág. 74) Para o timol, o íon molecular ocorre em m/z 150 e a perda de um radical metila gera o pico base em m/z 135. Posteriormente a perda de uma molécula de propano gera o íon com m/z 91.

Para o carvacrol, o íon molecular também ocorre em m/z 150 e, assim como no caso do timol, a perda de um radical metila gera o íon em m/z 135 (pico base). No entanto, a formação do íon em m/z 91 ocorre pela perda de um radical isopropila seguida da perda de uma molécula de metano (**Figura 1.34**, pág. 74).

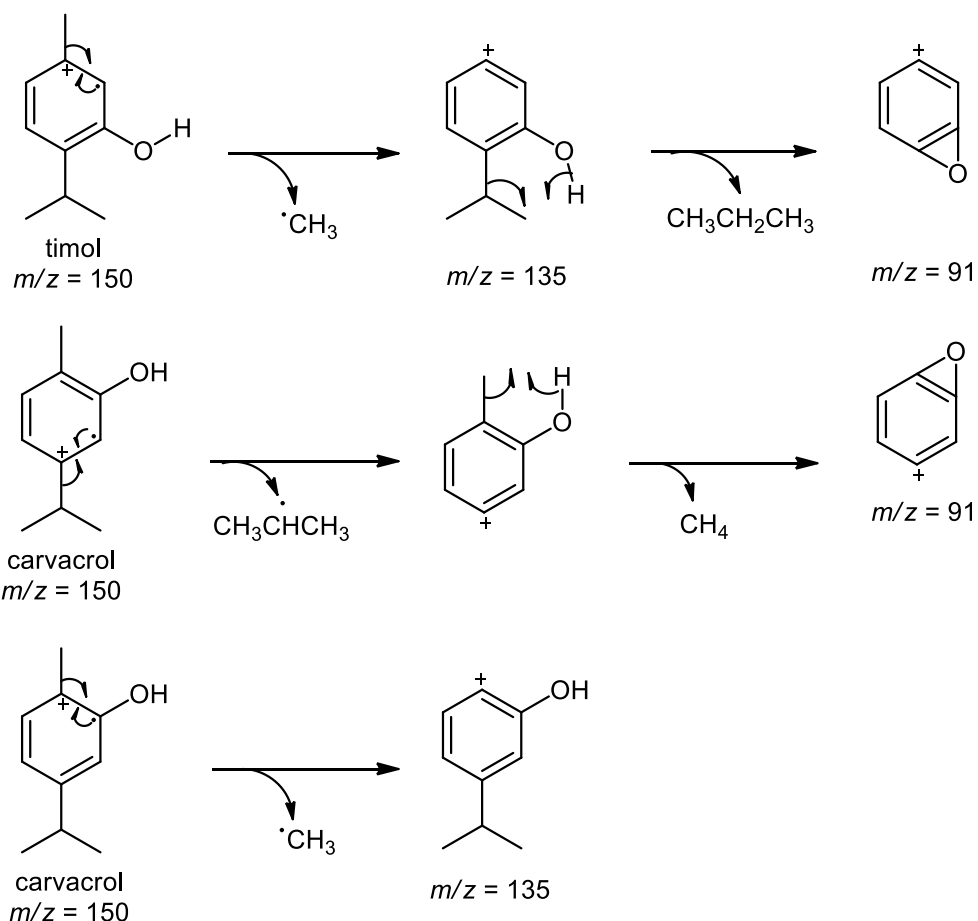


Figura 1.34. Proposta mecanística para as fragmentações do timol (1) e carvacrol (2).

Após a caracterização de timol e carvacrol no extrato de **HLT**, foi realizada a quantificação destas substâncias nestes extratos e nas frações **HHLT**, **HDLT**, **HAeLT**, **HMLT** bem como no extrato em metanol **MLT** e em suas respectivas frações **MDLT**, **MAeLT** e **MMLT** utilizando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Para a quantificação do timol nos extratos e nas frações foram preparadas soluções do padrão, em diclorometano, nas concentrações de 1,0; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mg/mL. Para o carvacrol foram preparadas as soluções do padrão nas concentrações de 0,025; 0,0125; $6,25 \times 10^{-3}$; $3,1 \times 10^{-3}$ e $1,5 \times 10^{-3}$ mg/mL. Para os extratos e frações as soluções foram preparadas em diclorometano, nas concentração de 1,0 mg/mL.

Após esta etapa, as amostras foram analisadas por GC/MS e foram obtidas as áreas cromatográficas dos picos referentes a cada uma das concentrações analisadas. A partir destes dados, foi possível obter as curvas de calibração para o timol (**Figura 1.35**) e para o carvacrol (**Figura 1.36**).

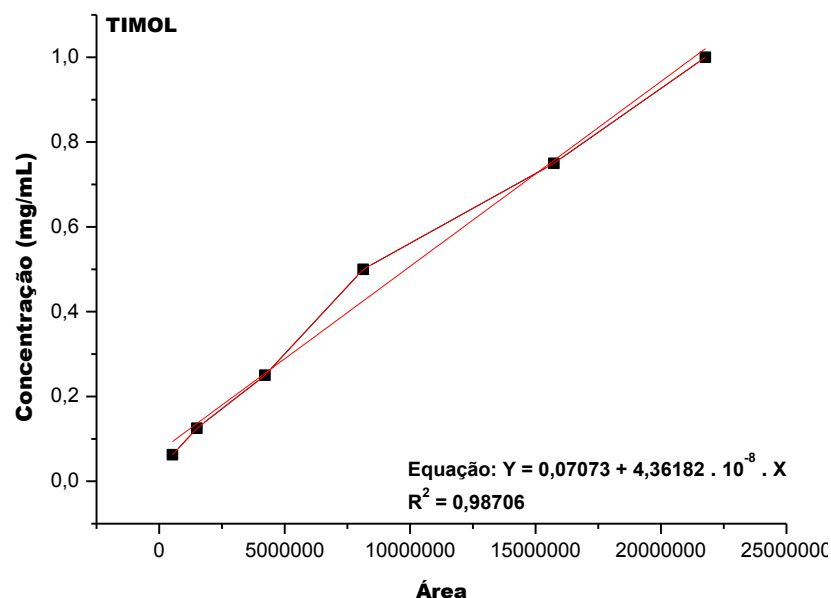


Figura 1.35. Curva de calibração obtida para as soluções de timol (1).

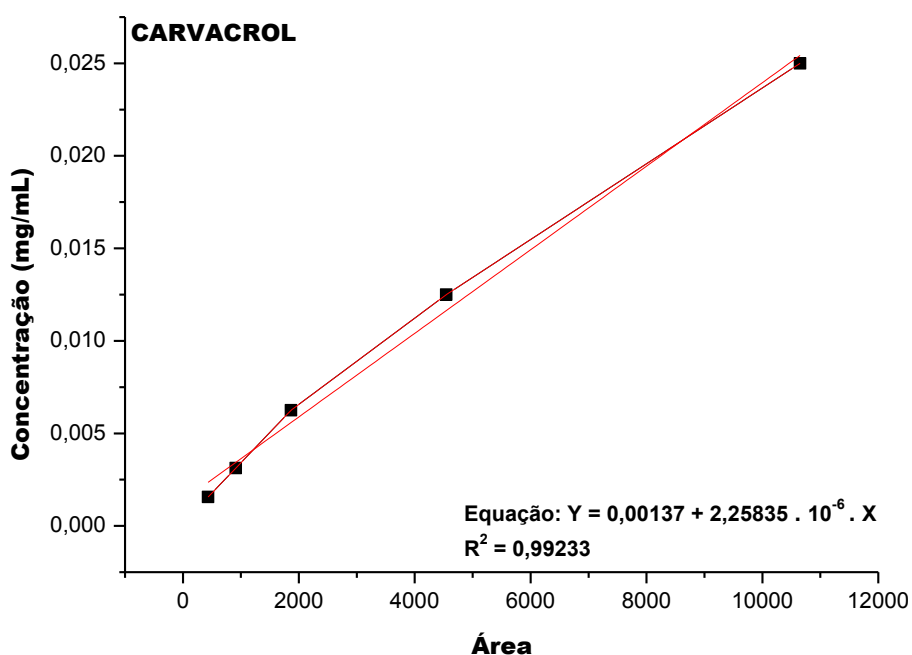


Figura 1.36. Curva de calibração obtida para as soluções de carvacrol (2).

Pelas equações obtidas das curvas de calibração foi possível calcular a concentração destas substâncias em cada uma das amostras analisadas (utilizando a área cromatográfica obtida para cada pico referente ao timol e ao carvacrol em cada uma das soluções dos extratos e frações).

Na **Tabela 1.6** estão descritas as concentrações de **1** e **2** nos extratos de *L. triplinervis* e suas respectivas frações, bem como as suas concentrações relativas (%).

Tabela 1.6. Concentração de timol (**1**) e carvacrol (**2**) presentes nos extratos e frações de *L. triplinervis* (**LT**)

	1 (mg/mL)	1 (%)	2 (mg/mL)	2 (%)
HLT	0,216	21,6	0,190	19,0
HHLT	0,074	7,4	0,006	0,6
HDLT	0,370	37,0	0,425	42,5
HAeLT	0,073	7,3	0,006	0,6
MLT	0,125	12,5	0,070	7,0
MDLT	0,282	28,2	0,283	28,3
MAeLT	0,078	7,8	0,012	1,2
MMLT	0,071	7,1	0,001	0,1

Por estes dados é possível observar que as maiores quantidades de timol e carvacrol ocorrem no extrato bruto de hexano **HLT** (21,6 e 19%) e nas frações **HDLT** (37 e 42,5%) e **MDLT** (28,2 e 28,3%). A maior afinidade de timol e carvacrol pelo diclorometano, em comparação ao hexano e metanol, faz com que estas substâncias apareçam em maior concentração justamente nas frações obtidas por cromatografia líquida a vácuo onde foi utilizado este solvente.

Sendo assim, as atividades biológicas, contra fungos patogênicos e fitopatogênicos e contra o carrapato *Rhipicephalus microplus*, observadas no **Capítulo 2**, apresentadas pelo extrato em hexano **HLT** de *L. triplinervis* e as frações em diclorometano **HDLT** e **MDLT** podem estar associadas com a presença de timol e carvacrol em maior quantidade nestas amostras.

3.2.2. Mistura de substâncias (MS2) em *Myrsine squarrosa*

Do extrato em hexano de *M. squarrosa*, as frações em diclorometano (**HDMS**) e em acetato de etila (**HAeMS**) apresentaram atividade formicida quando testadas contra as formigas cortadeiras *Atta sexdens* (**Capítulo 2, pág. 200**). Estas frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada e por esta análise foi possível observar duas manchas com características similares e valores de R_f semelhantes em cada fração, sendo 0,49 para **HDMS** e 0,50 para **HAeMS** (Hex:AcOEt – 3:1 v/v) (**Figura 1.37**). Dessa forma, assumiu-se serem estas substâncias presentes nas referidas manchas as responsáveis pela atividade formicida e assim foram realizadas tentativas para o isolamento destas.

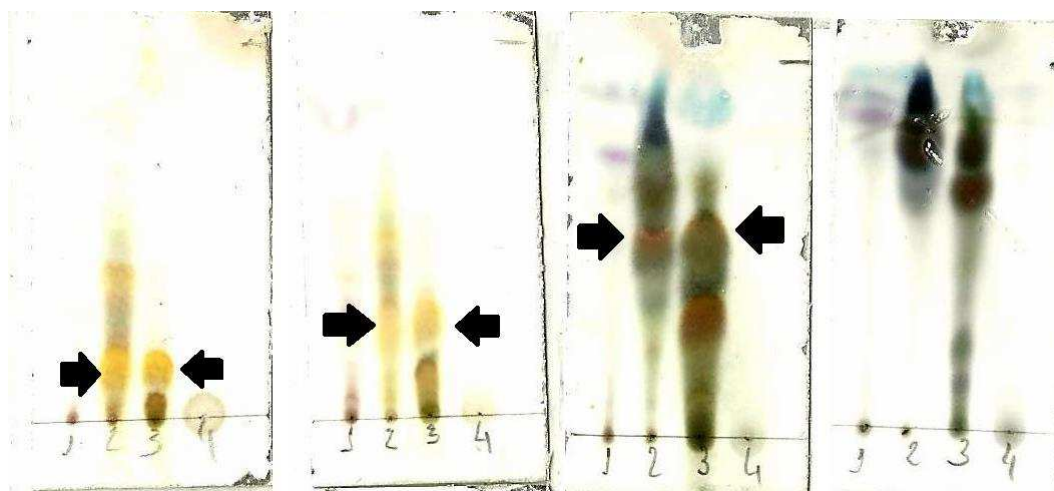


Figura 1.37. Placas de CCD para as frações de **HMS**. Placa 1, eluente hexano:AcOEt 9:1; Placa 2, eluente hexano:AcOEt 6:1; Placa 3, eluente hexano:AcOEt 3:1; Placa 4, eluente hexano:AcOEt 1:1. 1 = **HHMS**, 2=**HDMS**, 3 = **HAeMS**, 4 = **HMMS**. Revelador: Vanilina ácida.

Para o isolamento das substâncias presentes nas frações ativas, inicialmente, de **HDMS** (5,41 g) foram retirados 100 mg. Esse material foi submetido a um processo de separação por cromatografia líquida em coluna utilizando como sistema de eluentes hexano:acetato de etila:acetona:ácido acético (140:70:20:10 v/v). No total foram coletadas 111 frações e as frações 32-38 foram reunidas e seu volume foi reduzido em evaporador.

O material obtido após a evaporação do solvente (40,8 mg) foi purificado por CCD preparativa utilizando uma placa de vidro 20 x 20 cm, e o mesmo sistema de eluente utilizado para a cromatografia líquida em coluna. O material foi retirado da placa preparativa e extraído com clorofórmio (3 x 10 mL), e depois com metanol (3 x 5 mL). Em seguida ele foi filtrado em funil sinterizado e o filtrado teve seu volume reduzido em evaporador rotatório dando origem a um óleo vermelho **MS2** (13,4 mg).

De **HAeMS** (9,89 g) foram retirados 200 mg. Esse material foi submetido a um processo de separação por cromatografia líquida em coluna utilizando o sistema de eluentes hexano:clorofórmio:AcOEt (4:1:1). Foram coletadas 56 frações e, destas, as frações 10-24 foram reunidas e tiveram seu volume reduzido em evaporador rotatório.

O material obtido (61,0 mg) foi purificado por CCD preparativa utilizando-se uma placa de vidro 20 x 20 cm, e o mesmo sistema de eluente utilizado para a cromatografia líquida em coluna (corrida duas vezes). O material foi raspado da placa preparativa e extraído com clorofórmio (3 x 10 mL), e depois com metanol (3 x 5 mL). Em seguida ele foi filtrado em funil sinterizado e posteriormente teve o seu volume reduzido em evaporador rotatório dando origem a um óleo vermelho **MS2** (9,0 mg).

O óleo vermelho obtido foi levado para ser analisado por cromatografia gasosa. Nesta análise verificou-se a presença de duas substâncias que ocorriam sobrepostas ($t_r = 34,68$ e $34,75$ min) (**Figura 1.38**). Outras metodologias de caracterização foram utilizadas, tais como espectroscopia no infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, no entanto, não foi possível caracterizar estas duas substâncias.

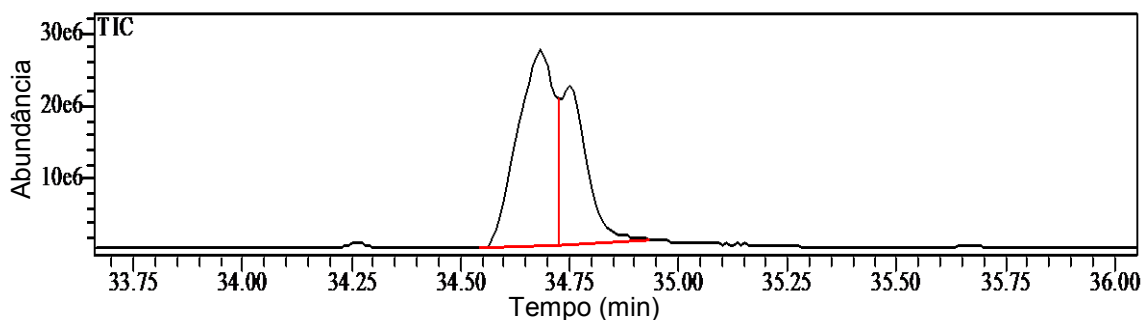


Figura 1.38. Cromatograma (GC-MS/EI) para a mistura **MS2**.

3.2.3. (-)-(S)-Ácido úsnico (3) em *Cladonia rappii*

Isolamento utilizando etanol como solvente extrator (Metodologia A)

Após a obtenção das frações por cromatografia líquida a vácuo, estas foram analisadas por CCD e após esta análise optou-se por realizar uma tentativa de isolamento da substância que aparecia como uma mancha azul escura em **EAeCR**, devido a esta fração aparentar estar mais pura (**Figura 1.39**).

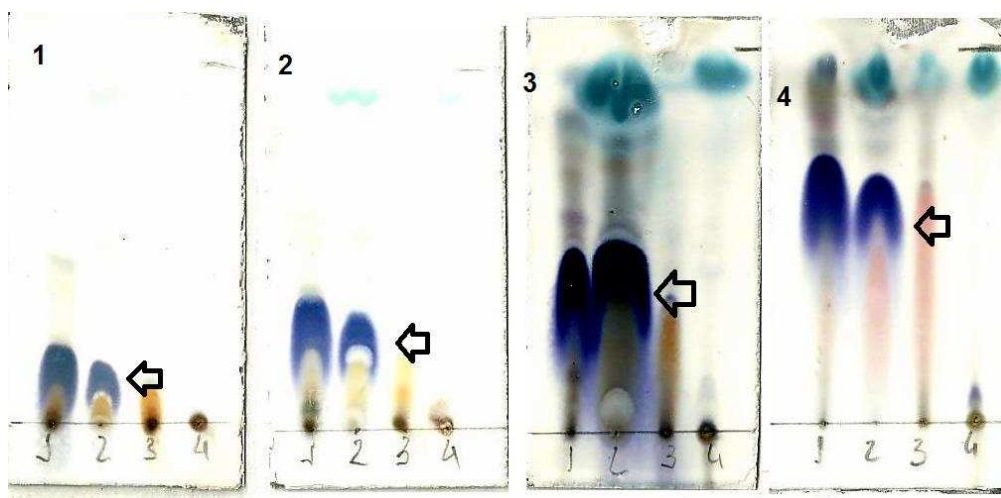


Figura 1.39. Placas de CCD para as frações de **ECR**. Placa 1, eluente hexano:AcOEt 9:1; Placa 2, eluente hexano:AcOEt 6:1; Placa 3, eluente hexano:AcOEt 3:1; Placa 4, eluente hexano:AcOEt 1:1. 1 = **EHCR**, 2=**EDCR**, 3=**EAeCR**, 4=**EMCR**. Revelador: Vanilina ácida. Em detalhe a substância 4 (mancha azul).

Como é possível visualizar nas placas 3 e 4 (**Figura 1.39**), ao aumentar a polaridade da fase móvel, observou-se a presença de outras substâncias sobrepostas à substância caracterizada pela mancha azul. Estas substâncias dificultariam a separação por cromatografia em coluna utilizando o sistema de eluente contendo hexano:acetato de etila. Dessa forma, outros sistemas foram testados e o que melhor promoveu a separação foi o sistema hexano:AcOEt:acetona:ácido acético – 70:35:10:10 v/v.

Após a escolha do sistema de solventes, foi purificado 1,0 g da fração **EAeCR**, por cromatografia em coluna. No total foram recolhidas 80 frações, destas, as frações 28 a 36 foram reunidas e seu volume reduzido em evaporador rotatório. Após esta etapa, foram obtidos 38,4 mg (3,84%) de um pó amarelo.

O pó amarelo foi enviado para análise por RMN e após comparar os dados de deslocamento químico do espectro de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C obtidos, com os dados de deslocamentos químicos descritos por Rashid e colaboradores (1999) para o ácido úsnico isolado de *Parmelia kamstchandalis* Ach. (**Tabela 1.7, página 85**), foi possível concluir que a amostra isolada também era o ácido úsnico (**3**). Após a caracterização prévia da substância como sendo ácido úsnico (**3**) foi aplicada outra forma, mais simples, para extraí-lo (**Metodologia B**).

Isolamento utilizando acetona como solvente extrator (Metodologia B)

Para facilitar a extração do ácido úsnico (**3**), foi utilizada uma metodologia de precipitação descrita por Mayo e colaboradores (2011) utilizando acetona como solvente extrator. Após a cristalização do ácido úsnico (**3**) em uma mistura de acetona e etanol na proporção de 10:1 v/v, como cristais de agulhas amarelas (3,6 g; 4,25%), a faixa de temperatura de fusão medida foi de 193,7 °C a 194,3 °C, semelhante ao valor encontrado na literatura de 193,0 °C (SMITS, 1903).

Pela análise do espectro no infravermelho de **3** (**Figura 1.40, pag. 81**) foi possível atribuir a banda em 1688 cm^{-1} referente à carbonila da cetona **C1**. Em 1627 cm^{-1} observou-se uma banda referente ao estiramento da carbonila **6-O $\underline{\text{C}}$ CH₃** e em 1605 cm^{-1} referente à carbonila **2-O $\underline{\text{C}}$ CH₃** ambas com números de onda bastante reduzidos devido à ligação de hidrogênio e efeito de deslocalização eletrônica com as hidroxilas em **C7** e **C3**, respectivamente.

Os números de onda em 1283 cm^{-1} e 1067 cm^{-1} foram atribuídos aos estiramentos assimétrico e simétrico de **C-O-C**, referentes a éteres cíclicos (EDWARDS et al., 2003).

Não foram observadas as bandas ν O-H, na região de 3400 cm^{-1} , isto pode ser atribuído ao fato de ocorrerem ligações de hidrogênio intermoleculares e, neste caso, as bandas ocorrem na faixa de $3200\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$ podendo não serem observadas (BARBOSA, 2007).

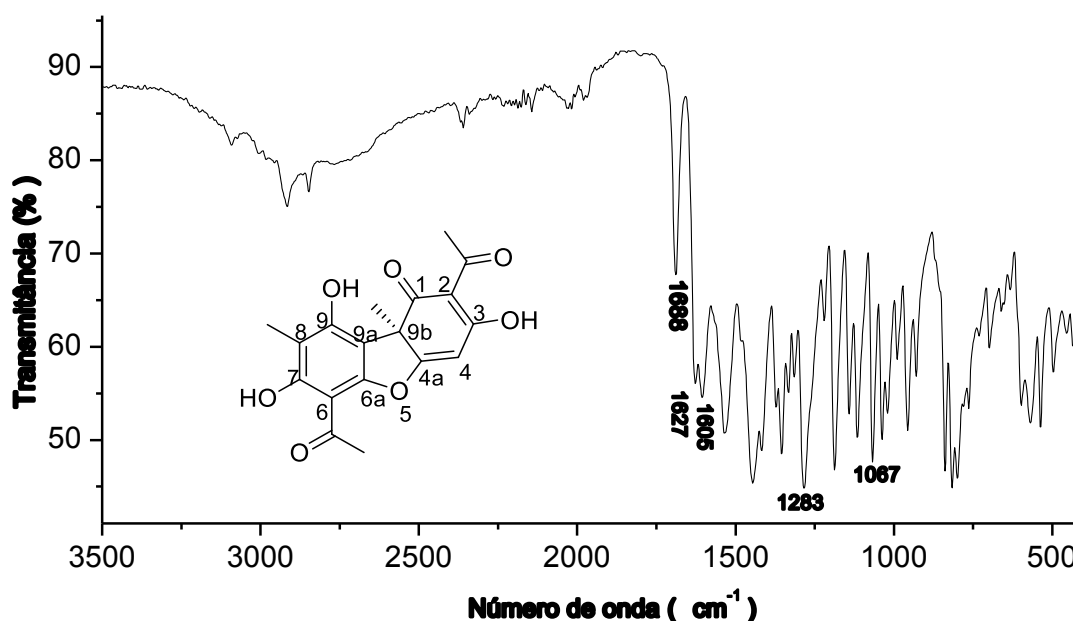


Figura 1.40. Espectro no infravermelho do (-)-(S)-ácido úsnico (**3**) (Reflectância/ λ_{max}).

No espectro de RMN de ^1H do (-)-(S)-ácido úsnico (**3**) (**Figura 1.41**, **pág. 83**) foram observados apenas simpletos para os hidrogênios presentes na molécula.

Os sinais referentes aos hidrogênios dos grupos metila **9b-CH₃** e **8-CH₃** foram observados em δ 1,75 e δ 2,08, respectivamente. Os sinais dos hidrogênios dos grupos metilas **2-OCCH₃** e **6-OCCH₃** foram observados, ligeiramente sobrepostos, em δ 2,65 e δ 2,66, respectivamente. Para o hidrogênio (**H4**) foi atribuído o sinal em δ 5,97.

Os deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios das hidroxilas de **3** são muito incomuns quando comparados com os deslocamentos normais de hidroxilas, que ocorrem na faixa de δ 4,0 – 9,0 (PAVIA et al., 2010). O sinal de **9-OH** foi observado em δ 11,02, este sinal mais desblindado ocorre devido ao efeito de deslocalização eletrônica com o grupo **6-OCCH₃** na posição *para*.

Com relação à hidroxila **7-OH**, a ligação de hidrogênio, confirmada pela análise de raios-x, e o efeito de ressonância com o grupo ceto **6-OCCH₃** gerou um sinal desblindado em δ 13,31. O sinal de hidrogênio da hidroxila **3-OH** foi observado como um simpleto bastante desblindado em δ 18,85. Isto ocorreu devido ao efeito de deslocalização eletrônica com os grupos ceto **C1** e **2-OCCH₃** além da ligação de hidrogênio com o grupo **2-OCCH₃**, também confirmada pela análise de raios-x, tornando este hidrogênio o mais desblindado na molécula.

Para o espectro de RMN de ¹³C (**Figura 1.42, pág. 84**) o sinal referente ao **C9-OH** ocorre em δ 157,4, enquanto os sinais para **C7-OH** e **C3-OH** ocorrem em δ 163,8 e δ 191,7, respectivamente.

Para os carbonos das carbonilas das cetonas foram observados sinais em δ 198,0 para **C1**, δ 200,3 para **6-OCCH₃** e δ 201,7 para **2-OCCH₃**.

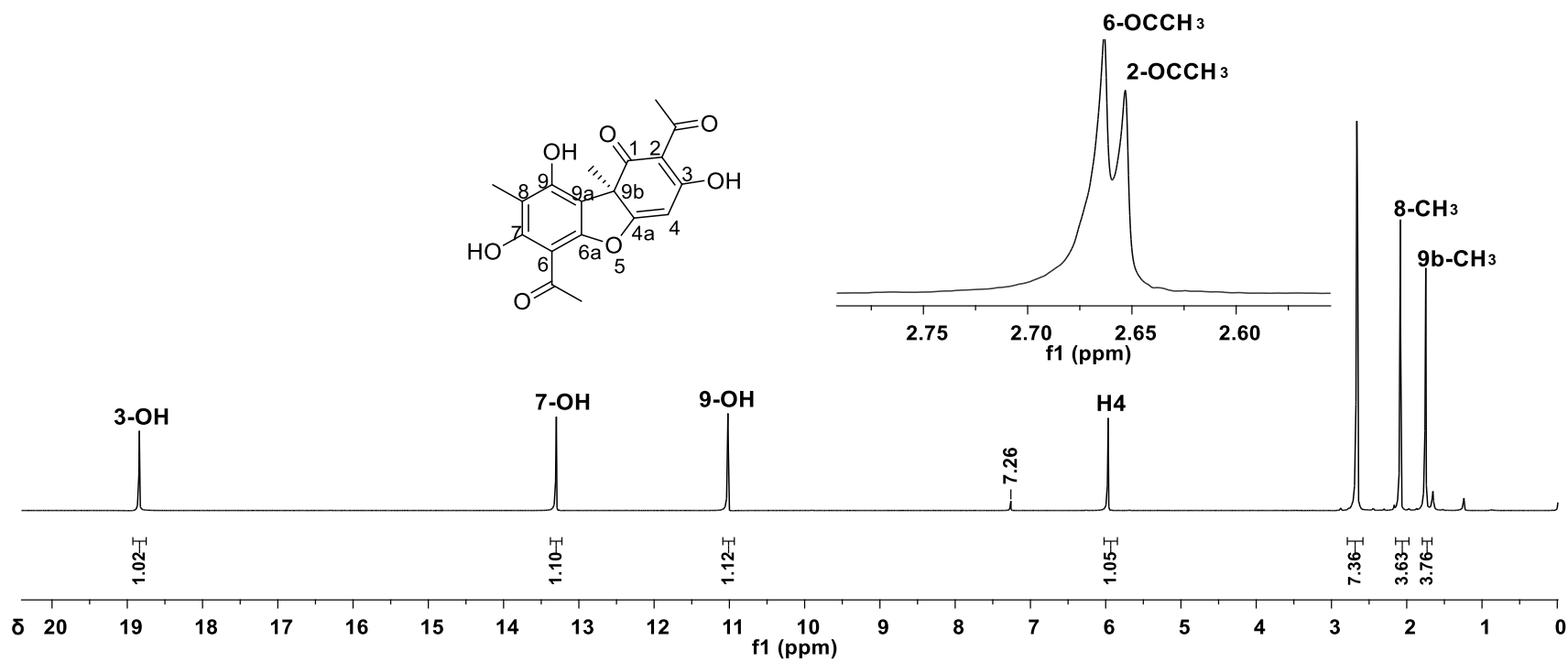


Figura 1.41. Espectro de RMN de ^1H do (-)-(S)-ácido úsnico (**3**) (300 MHz, CDCl_3 - δ_{CHCl_3} 7,26).

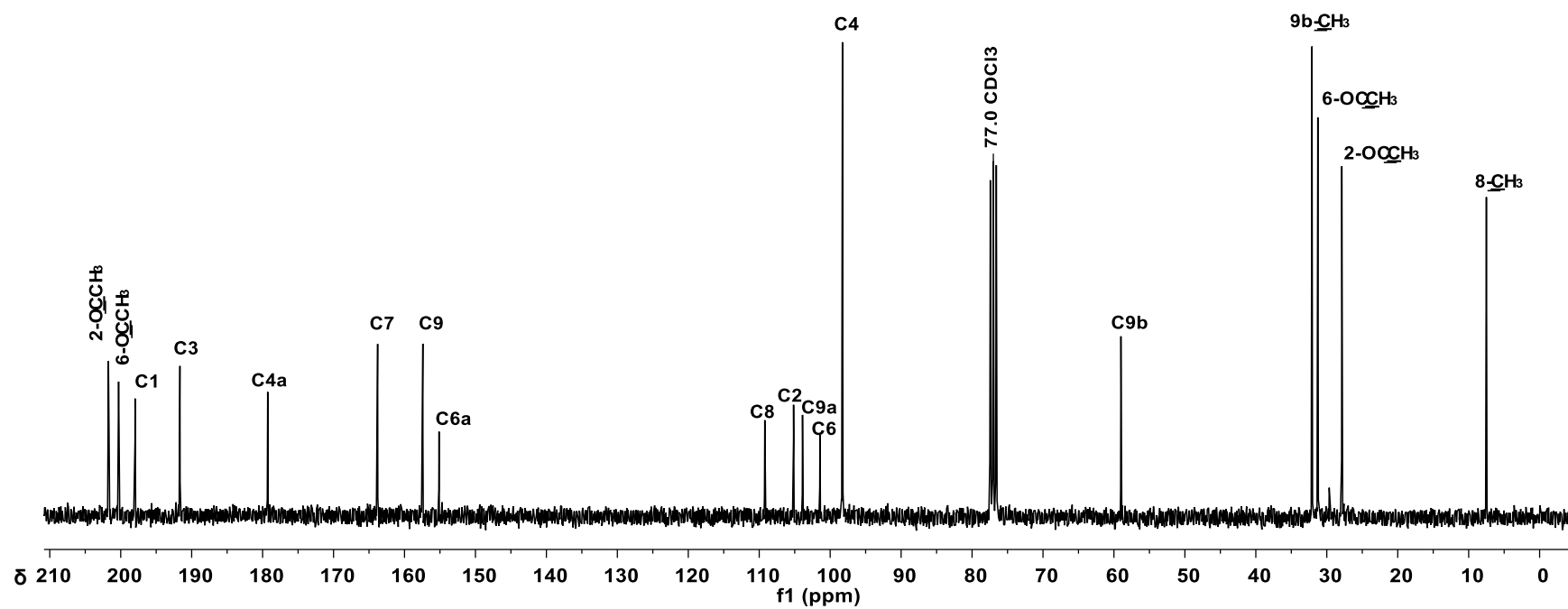


Figura 1.42. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 - δ_{CHCl_3} 77,0) (-)-(S)-ácido úsnico (**3**).

Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C foram comparados com os dados da literatura e encontram-se sumarizados na **Tabela 1.7** (RASHID et al., 1999).

Tabela 1.7. Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C de **3** e do ácido úsnico descrito na literatura* (RASHID et al., 1999 – obtido em CDCl_3).

Posição	^1H (δ) mult	^1H (δ) mult*	^{13}C (δ)	$^{13}\text{C}^*$ (δ)
1	-	-	198,0	198,1
2	-	-	105,2	105,1
2-OCCH ₃	-	-	201,7	201,8
2-OCCH ₃	2,65 s	2,65 s	27,9	27,9
3	-	-	191,6	191,7
3-OH	18,84 s	18,81 s	-	-
4	5,97 s	5,96 s	98,3	98,3
4a	-	-	179,3	179,4
6	-	-	101,4	101,5
6-OCCH ₃	-	-	200,3	200,3
6-OCCH ₃	2,66 s	2,66 s	31,3	31,3
6a	-	-	155,1	155,2
7	-	-	163,8	163,9
7-OH	13,30 s	13,30 s	-	-
8	-	-	109,2	109,4
8-CH ₃	2,08 s	2,1 s	7,5	7,5
9	-	-	157,4	157,5
9-OH	11,02 s	11,01s	-	-
9a	-	-	103,9	104,0
9b	-	-	59,0	59,1
9b-CH ₃	1,75 s	1,75 s	32,1	32,1

O espectro de massas de alta resolução confirmou a fórmula molecular ($\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_7$) para **3**, sendo a massa teórica calculada m/z (int. rel) 343,0823 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) e a massa experimental medida em m/z (int. rel) 343,0792 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) (**Figura 1.43, pág. 86**).

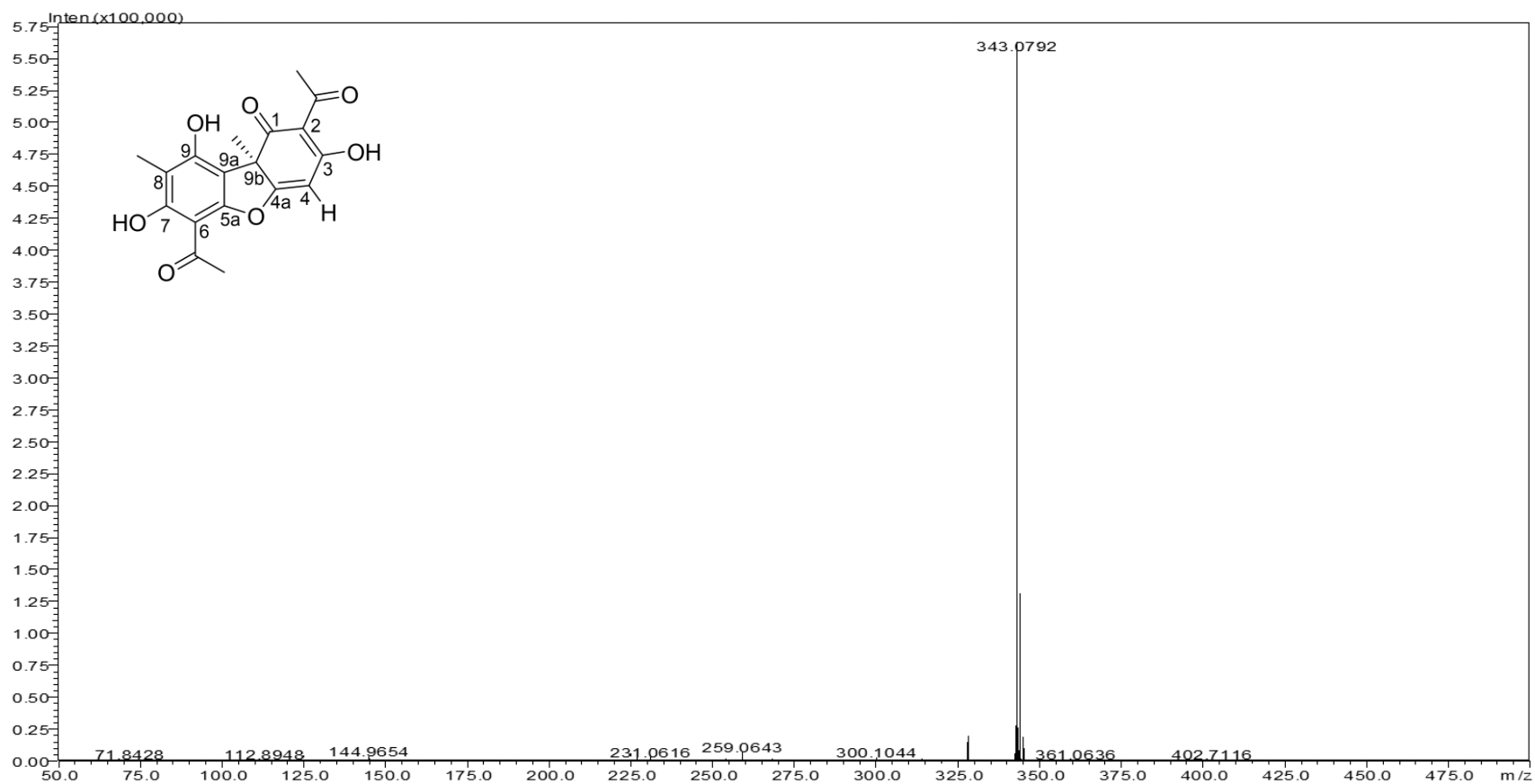


Figura 1.43. Espectro de massas de alta resolução em modo negativo para **3** (LCMS-IT-TOF, Shimadzu).

Após a confirmação da estrutura do ácido úsnico através dos dados espectroscópicos e espectrométricos e também por comparação com os dados da literatura, a amostra foi submetida a uma análise de rotação específica para a confirmação da estereoquímica do carbono **C-9b**. Para tanto, os dados foram obtidos em clorofórmio (0,7 g em 100 mL), fornecendo $[\alpha]^{20}_D = -391^\circ$, o que confirma a configuração absoluta do carbono 9b como sendo S. Bézivin e colaboradores (2004) encontraram o valor de $[\alpha]^{20}_D = -486^\circ$ (C = 0,4, CHCl₃) e a disparidade entre os resultados se deve à diferença na concentração de ácido úsnico utilizada para realizar a análise.

Para corroborar com os dados de rotação específica bem como com os dados espectroscópicos obtidos, a estrutura do ácido úsnico foi investigada por análise de difração de raios-X (Os dados de refinamento da estrutura podem ser visualizados nos anexos). Esta análise foi essencial para realizar a confirmação inequívoca desta substância, extraída de *C. rappii*, como sendo o enantiômero S (C7A e C7B), conforme pode ser observado na representação ORTEP de **3** (Figura 1.44).

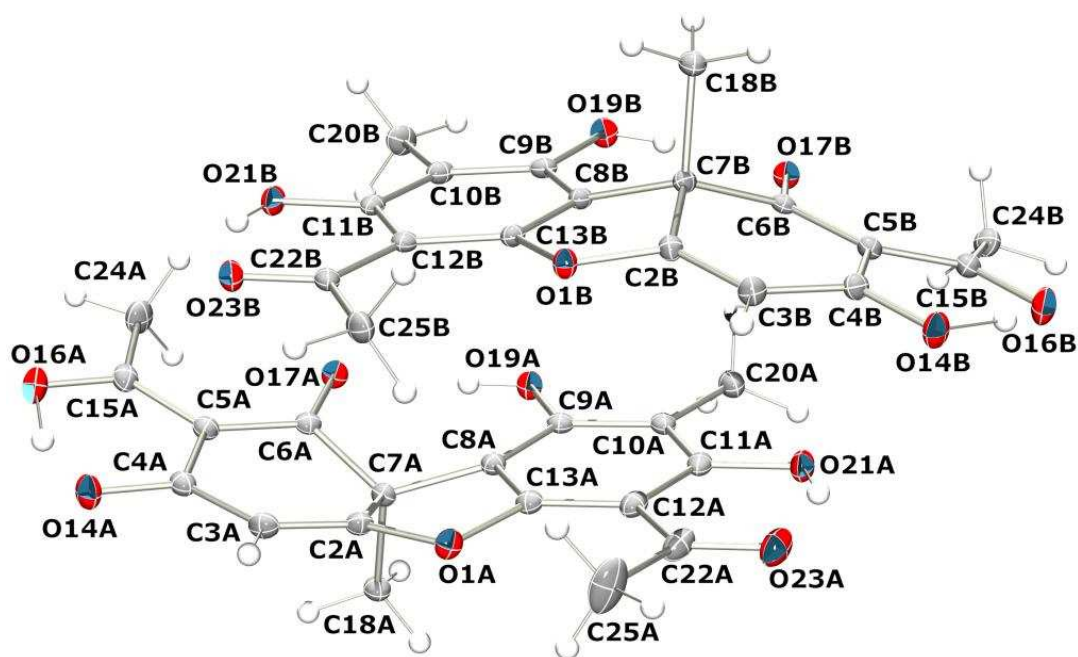


Figura 1.44. Representação ORTEP para o (-)-(S)-ácido úsnico (**3**).

Pela análise cristalográfica por raios-x, foi possível observar a presença de duas moléculas independentes de **3** por unidade assimétrica e a ligação de hidrogênio intramolecular envolvendo os átomos O14–H...O16, com distância de 2,402 Å o que confirma a ocorrência do deslocamento químico incomum, em uma região altamente desblindada, observado no espectro de RMN de ^1H , para esta hidroxila conforme discutido anteriormente.

A ligação de hidrogênio também foi observada entre a hidroxila **7-OH** (O21) e a carbonila **6-OCCH₃** (O23), com uma distância um pouco maior (2,538 Å). Isto também explicaria a ocorrência de um sinal bastante desblindado no espectro de RMN de ^1H .

A determinação da configuração absoluta do ácido úsnico por difração de raios-X foi realizada apenas para o enantiômero *R* por Huneck (1981). Até a presente data, não foram encontrados trabalhos na literatura descrevendo a configuração absoluta para o enantiômero *S* por esta técnica.

Estudos quimiotaxonômicos demonstraram que os metabólitos secundários de líquens mais comuns estão entre as classes de depsídeos, depsidonas e dibenzofuranos como o ácido úsnico (HONDA et al., 1999; HONDA et al., 2010; SHUKLA et al., 2010).

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandiona; C₁₈H₁₆O₇] foi primeiramente reportado na literatura por Rochleder e Heldt (1843) nos líquens *Ramalina fraxinea* e *Usnea barbata* sendo a sua distribuição posteriormente estudada por Zopf, Hesse e Knop que comprovaram, a ocorrência dessa substância em mais de 75 espécies de líquens (CURD; ROBERTSON, 1933; INGOLFSDÓTTIR et al., 1988; INGOLFSDÓTTIR, 2002).

O ácido úsnico é um pigmento amarelo e ocorre em duas formas enantioméricas, (+)-(*R*)-ácido úsnico e (-)-(*S*)-ácido úsnico, que foram primeiramente reportados por Salkowski em 1875 (SALKOWSKI, 1875; CURD; ROBERTSON, 1933), diferindo um do outro pela posição espacial da metila presente no carbono quiral **C9b** (Figura 1.45, pág. 89) (INGOLFSDÓTTIR, 2002).

O ácido úsnico possui como característica marcante hidroxilas com caráter muito ácidas. A hidroxila **3-OH** é a mais ácida dentre as três presentes nesta molécula, seu valor de $pK_a = 4,4$, e isto ocorre devido ao efeito de deslocalização eletrônica entre esta hidroxila e o grupo **2-OCCH₃**. A hidroxila fenólica **9-OH** ocorre com valor de $pK_a = 8,8$ devido ao efeito de deslocalização eletrônica com o grupo **6-OCCH₃** na posição *para*. A hidroxila **7-OH** é fracamente ácida ($pK_a = 10,7$) possivelmente por causa da ligação de hidrogênio intramolecular com o grupo **6-OCCH₃** (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Estes dados também estão de acordo com os deslocamentos químicos incomuns para hidroxilas observados nos espectros de RMN de 1H e de RMN de ^{13}C , conforme discutido anteriormente.

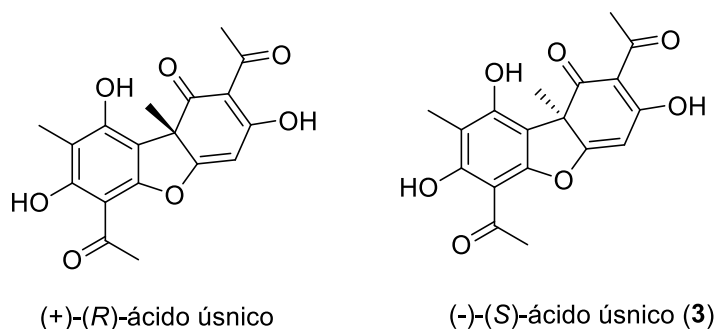


Figura 1.45. Estruturas para o (-)-(S)-ácido úsnico (**3**) e (+)-(R)-ácido úsnico.

A biossíntese do ácido úsnico ocorre pela via do acetato e foi desvendada por Taguchi e colaboradores (1966) (TAGUCHI et al., 1966). O processo se inicia com a condensação com a incorporação de uma unidade de carbono à molécula, pela ação da S-adenosilmetionina (SAM), antes da etapa de ciclização que formará a unidade metilfloroacetofenona. Posteriormente ocorre a oxidação desta molécula a um radical **A** e suas estruturas de ressonância **B** e **C**.

O acoplamento radicalar entre as estruturas de ressonância **B** e **C** forma o intermediário **D**, que por tautomerismo ceto-enólico leva à formação do esqueleto dibenzofuranico. A perda de uma molécula de água gera um intermediário que por tautomerismo ceto-enólico leva à formação do ácido úsnico (**3**) (DEWICK, 2009) (**Figura 1.46, pág. 90**).

O composto (**4**) foi observado em todas as frações de CCD, sempre próximo a linha de partida da corrida cromatográfica, como uma mancha negra, quando revelado com vanilina ácida, conforme destacado pelas setas na **Figura 1.47**.

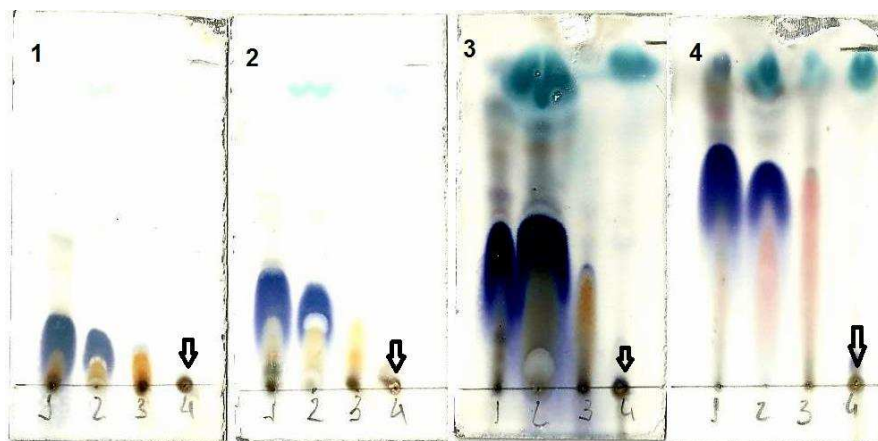


Figura 1.47. Placas de CCD para as frações de **ECR**. Placa 1, eluente hexano:AcOEt 9:1; Placa 2, eluente hexano:AcOEt 6:1; Placa 3, eluente hexano:AcOEt 3:1; Placa 4, eluente hexano:AcOEt 1:1. 1 = **EHCR**, 2=**EDCR**, 3=**EAeCR**, 4=**EMCR**. Revelador: Vanilina ácida. Em detalhe a substância **4** (mancha negra, próxima a linha).

A temperatura de fusão do ácido fumarprotocetrárico não foi possível ser medida, pois se observava a decomposição da substância após a temperatura de 220 °C. No trabalho publicado por Su e colaboradores (2003), a faixa de temperatura de fusão observada foi de 252-260 °C.

No espectro no infravermelho de **4** (**Figura 1.48, pág. 92**) foi possível observar os estiramentos simétrico e assimétrico para os carbonos sp^2 $\nu(C=C)$ em 3094 cm^{-1} . O estiramento da carbonila, referente a lactona ocorreu em 1747 cm^{-1} . Os estiramentos referentes às outras carbonilas presentes em **4** aparecem em frequências mais baixas do que o normal devido aos efeitos de deslocalização eletrônica e de ligações de hidrogênio.

Assim, observou-se a banda 1699 cm^{-1} referente ao $\nu(\text{C=O})$ do éster de cadeia aberta e para o ácido carboxílico desta mesma cadeia carbônica. Para o $\nu(\text{C=O})$ do aldeído e ácido carboxílico ligados ao anel aromático foi atribuída a banda em 1655 cm^{-1} . Foram atribuídas também as bandas referentes ao estiramento de carbonos sp^2 aromáticos em 1615 cm^{-1} e 1575 cm^{-1} e em 1155 cm^{-1} para o estiramento C-O-C do anel de sete membros (EDWARDS et al., 2003).

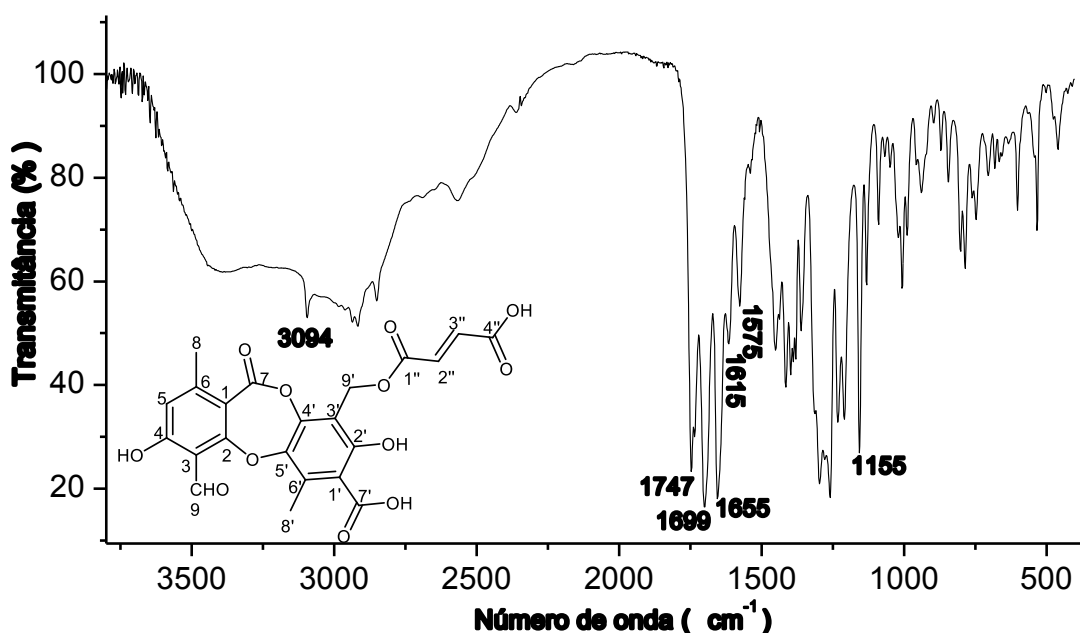


Figura 1.48. Espectro no infravermelho do ácido fumarprotocetrário (4) (Reflectância/ λ_{max}).

No espectro de RMN de ^1H do ácido fumarprotocetrário (**Figura 1.49A, pág. 94**) foram observados sinais referentes aos grupos metila em δ 2,41 (H8') e δ 2,44 (H8). Um simpleto, integrado para dois hidrogênios, referente aos hidrogênios metilênicos (H9') em δ 5,29. O hidrogênio aromático (H5) foi observado em δ 6,83 e para o hidrogênio do aldeído (H9) foi atribuído o simpleto em δ 10,56.

Interessantemente os sinais dos hidrogênios sp^2 (H2'' e H3'') foram observados sobrepostos em δ 6,63 (integrado para dois hidrogênios). Isto pode ter ocorrido porque estes hidrogênios são magneticamente semelhantes (SU et al., 2003).

No entanto, por um experimento simples, no próprio tubo de RMN, onde ocorre a reação entre o ácido fumarprotocetrárico (**4**) e a trietilamina para produzir o sal do ácido fumarprotocetrárico (**4a**) (**Figura 1.49B, pág. 94**) e assim desdobrar os sinais sobrepostos. A síntese do sal na própria solução a ser analisada gera um agente de deslocamento químico *in situ* que produz o desdobramento dos sinais no espectro de RMN de ^1H , sendo agora observados dois dupletos em δ 6,23 para H2'' e δ 6,62 para H3'' com constante de acoplamento de 15,6 Hz, o que confirma a estereoquímica *trans* entre estes hidrogênios.

O sinal mais desblindado ocorre em δ 11,96 e este poderia ser atribuído a um dos hidrogênios dos ácidos carboxílicos, H7' ou H4'' ou ainda a uma das hidroxilas OH-4 ou OH-2'.

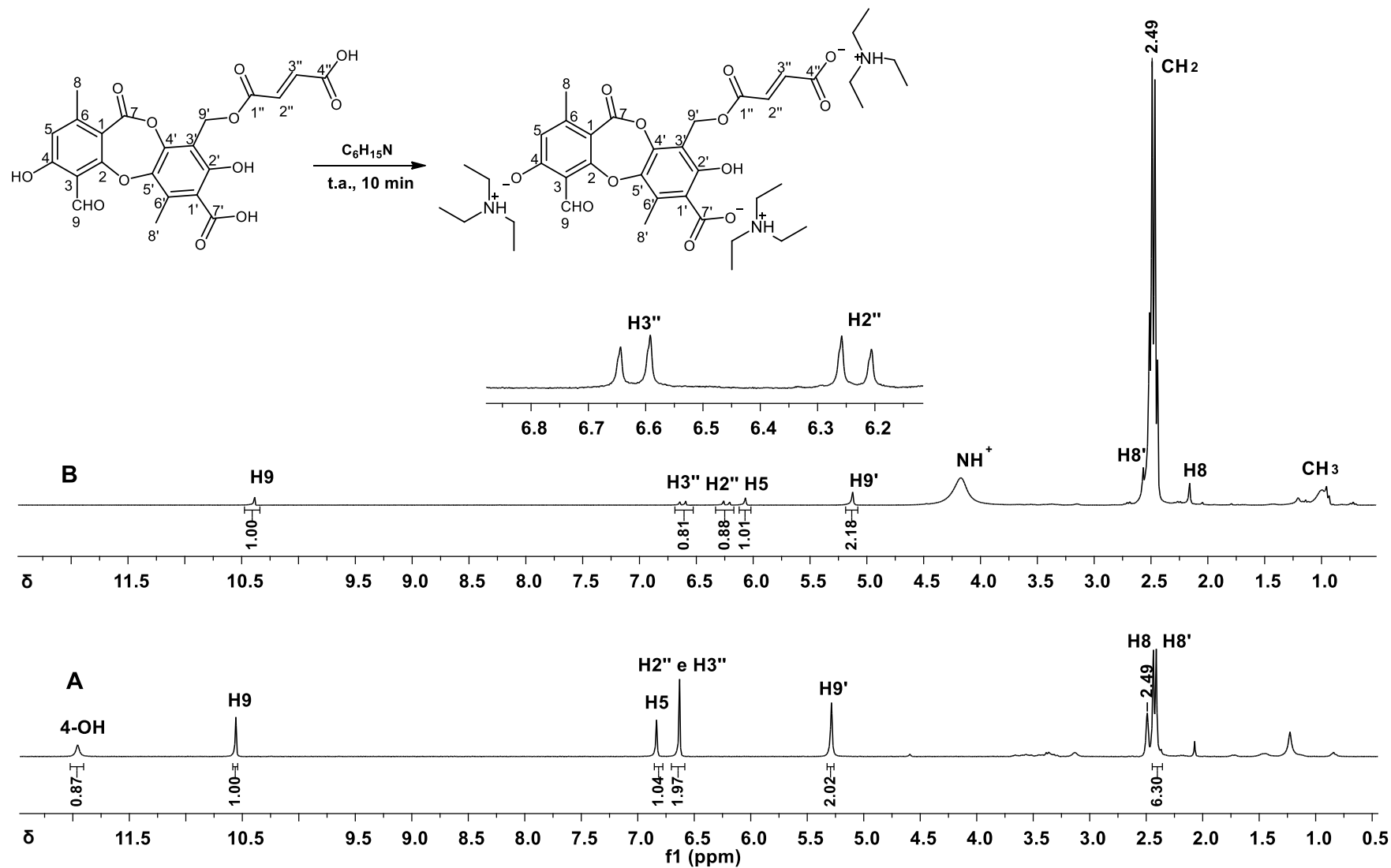


Figura 1.49. A) Espectro de RMN de ^1H do ácido fumarprotocetrário (4) (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ – $\delta_{(\text{CD}_3)_2\text{SO}} = 2,49$). B) Espectro de RMN de ^1H do sal de trietilamina do ácido fumarprotocetrário (4a) (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ – $\delta_{(\text{CD}_3)_2\text{SO}} = 2,49$).

No espectro de RMN de ^{13}C de **4** (**Figura 1.50, pág. 96**) foram observados 21 sinais ao invés dos 22 esperados devido à sobreposição dos sinais referentes aos carbonos C2 e C4, em δ 163,9 (SU et al., 2003).

Os sinais em δ 14,6 e δ 21,3 foram assinalados como referentes aos carbonos metílicos C8' e C8, respectivamente. Para o carbono metilênico, C9', foi atribuído o sinal em δ 56,8. Para os carbonos aromáticos foram observados 12 sinais na faixa de δ 112,0 a δ 163,9. Os carbonos da ligação dupla em cadeia aberta foram observados com δ 131,9 e δ 135,0, para C2'' e C3'', respectivamente.

Os sinais dos carbonos ligados nas hidroxilas foram atribuídos em δ 155,3 e δ 163,9 para C2' e C4, respectivamente. As carbonilas foram atribuídas em δ 160,9 para a lactona e δ 164,6 para o éster de cadeia aberta, já os sinais em δ 165,6 e δ 170,1 foram atribuídos aos ácidos carboxílicos ligados ao C3'' e ao anel aromático, respectivamente, além do sinal em δ 191,0 atribuído para o aldeído (SU et al., 2003).

Na **Tabela 1.8, página 97**, estão apresentadas as atribuições de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C para o ácido fumarprotocetrárico (**4**) e seu sal de trietilamina (**4a**), bem como a comparação com os dados provenientes da literatura (SU et al., 2003).

O espectro de massas de alta resolução confirmou a fórmula molecular ($\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{O}_{12}$) para **4**, sendo a massa teórica calculada m/z (int. rel) 472,0600 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) e a massa experimental medida em m/z (int. rel) 471,0603 ($[\text{M}-\text{H}]^-$) (**Figura 1.51, pág. 98**).

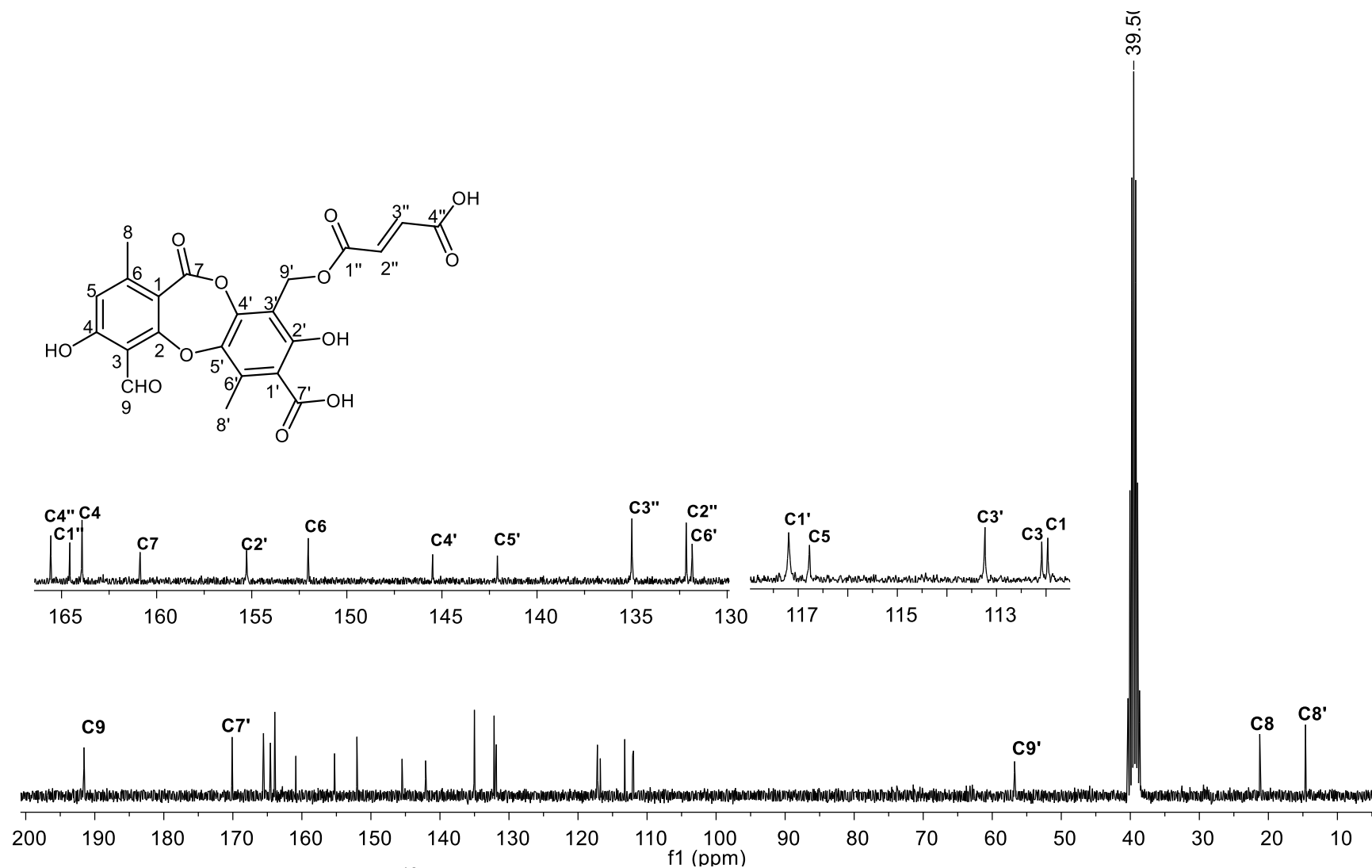


Figura 1.50. Espectro de RMN de ^{13}C do ácido fumarprotocetrárico (**4**) (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, $\delta_{(\text{CDCl}_3)_2\text{SO}} = 39,5$).

Tabela 1.8. Deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C de **4**, **4a** e do ácido fumarprotocetrárico e seu respectivo sal de trietilamina descritos na literatura (*SU et al., 2003)

Posição	^1H (δ) 4 , mult., <i>J</i> , integração	^1H (δ) 4 [*] , mult., <i>J</i> ,	^1H (δ) 4a mult., <i>J</i> , integração	^1H (δ) 4a [*] mult., <i>J</i> ,	^{13}C (δ) 4	^{13}C (δ) 4 [*]
1					112,0	111,9
2					163,9	163,8
3					112,1	112,0
4					163,9	163,8
5	6,85; s; 1H	6,85; s	6,12; s; 1H	6,37; s	116,8	117,1
6					152,0	152,0
7					160,9	160,7
8	2,46; s; 1H	2,46; s	2,49; s; 1H	2,30; s	21,3	21,1
9	10,58; s; 1H	10,58; s	10,38; s; 1H	10,51; s	191,6	191,4
1'					117,2	116,6
2'					155,3	155,2
3'					113,2	113,1
4'					145,5	145,4
5'					142,1	142,0
6'					131,9	131,8
7'					170,1	170,0
8'	2,43; s; 1H	2,44; s	2,52; s; 1H	2,65; s	14,6	14,5
9'	5,31; s; 2H	5,31; s	5,18; s; 2H	5,19; s	56,8	56,6
1''					164,6	164,4
2''	6,65; s; 2H	6,65; s	6,28; d; 15,6 Hz; 1H	6,29; d; 15,7 Hz	132,1	132,0
3''	6,65; s; 2H	6,65; s	6,67; d; 15,6 Hz; 1H	6,66; d; 15,7 Hz	135,0	134,9
4''					165,6	165,4
NH ⁺			4,18; sl			
CH ₂			2,48; q; 6,9 Hz			
CH ₃			0,99; pt			

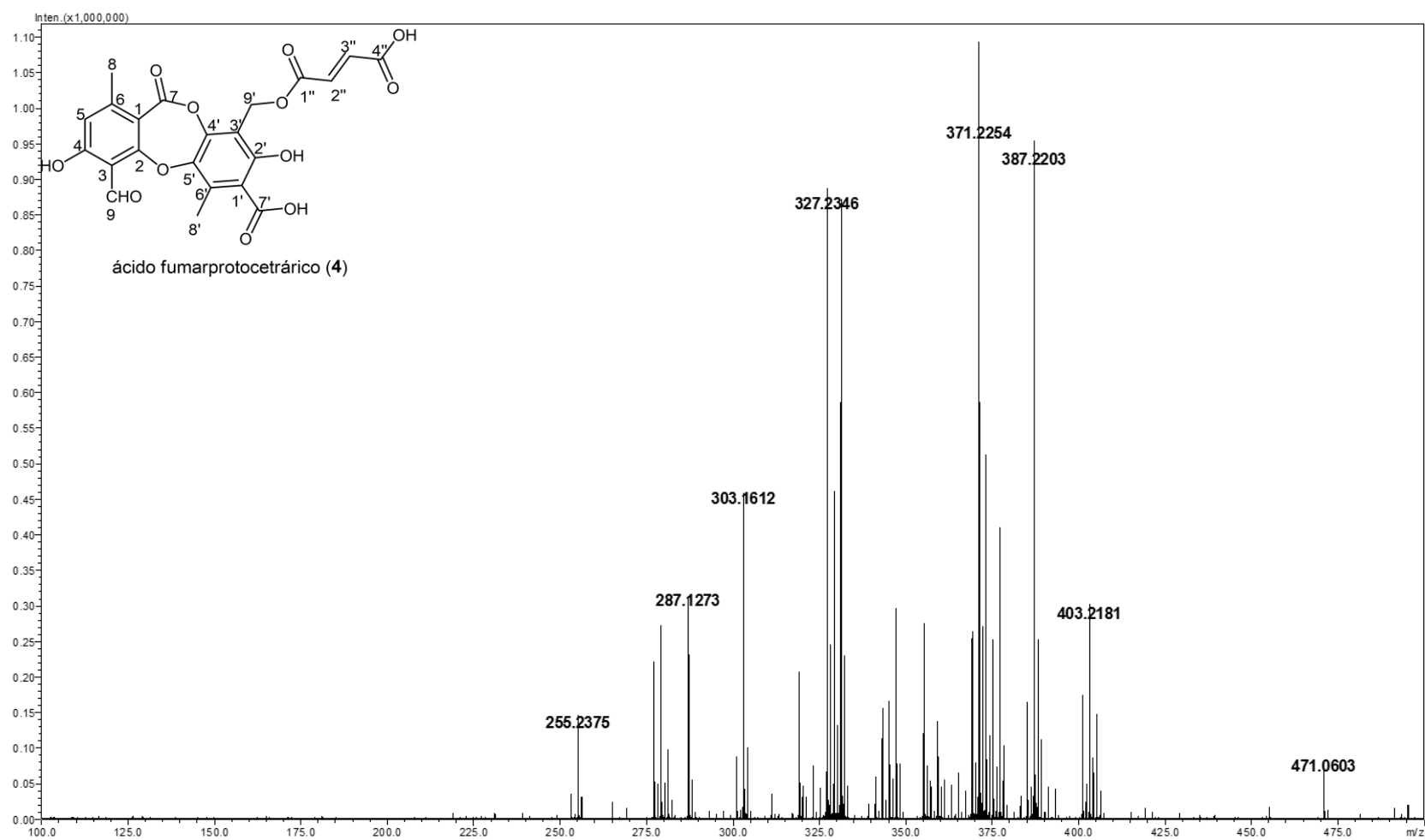


Figura 1.51. Espectro de massas de alta resolução em modo negativo para o ácido fumarprotocetrárico **4** (LCMS-IT-TOF, Shimadzu).

O ácido fumarprotocetrárico [ácido-(*E*)-9-(3-carboxiacriloximetil)-4-formil-3,8-dihidroxi-1,6-dimetil-11-oxo-11*H*-dibenzo[*b,e*]dioxepine-7-carboxílico; C₂₂H₁₆O₁₂] é uma depsidona β-orsinólica, largamente encontrada nos gêneros *Bryori* e *Cladonia* sendo isolado pela primeira vez por Hesse (1904) (SU et al., 2003). Algumas atividades biológicas já foram reportadas para esta substância, como antioxidante, expectorante (ALVES et al., 2014), antimicrobial e anticâncer (KOSANIC et al., 2014).

A biossíntese de depsidonas como o ácido fumarprotocetrárico ainda não está bem esclarecida, diversos autores atribuem a origem destas substâncias ao mesmo processo pelo qual se originam os depsídeos. De fato, além da semelhança estrutural, estas classes de substâncias vêm sendo consideradas como precursoras das depsidonas (HONDA; VILEGAS, 1998; LEGAZ et al., 2011).

O processo ocorre pela via biossintética do acetato, onde a condensação de uma unidade de acetil-CoA mais três unidades de malonil-CoA forma um β-ceto-éster. Posteriormente ocorre a metilação pela ação da S-adenosilmetionina (SAM), seguida da ciclização do β-ceto-éster por uma reação aldólica intramolecular, catalisada pela enzima ácido orselínico sintase (AOS). A posterior desidratação da molécula forma um sistema conjugado com a carbonila seguido por um processo de enolização favorecido pela formação de um anel aromático dando origem ao intermediário chave metil-3-orselinato (**Figura 1.52, pág. 100**) (DEWICK, 2009; LEGAZ et al., 2011).

Após estas etapas seguem-se dois caminhos distintos, por um deles ocorre uma reação de esterificação do metil-3-orselinato com SAM, catalisada pela enzima metil transferase, para a formação de uma unidade de metil β-orsinol carboxilato.

No outro caminho, ocorre a oxidação do grupo 3-metil a álcool, catalisado por uma oxidase, formando o álcool hematomoílico que passa por outra oxidação, dessa vez pela ação da enzima hematomoil álcool desidrogenase (HMA) para a formação do aldeído hematomoílico.

Os dois produtos formados nestas etapas, o metil β -orcinol carboxilato e o aldeído hematomoílico são unidos por uma reação de esterificação catalisada pela enzima Orselinato Depsídeo Hidrolase (ODH) para a formação do depsídeo precursor do ácido fumarprotocetrárico, a atranorina (**Figura 1.52**) (LEGAZ et al., 2011).

Posteriormente através da reação de oxidação da atranorina catalisada por enzimas do citocromo P450 ocorre o fechamento do anel que dá origem ao esqueleto depsidônico. Outra oxidação, dessa vez formando um álcool metílico, gera o ácido protocetrárico que por uma reação de esterificação utilizando succinil-CoA seguida da desidrogenação catalítica pelo FAD forma o ácido fumarprotocetrárico (**4**) (**Figura 1.52**) (PEREIRA et al., 1998; LEGAZ et al., 2011).

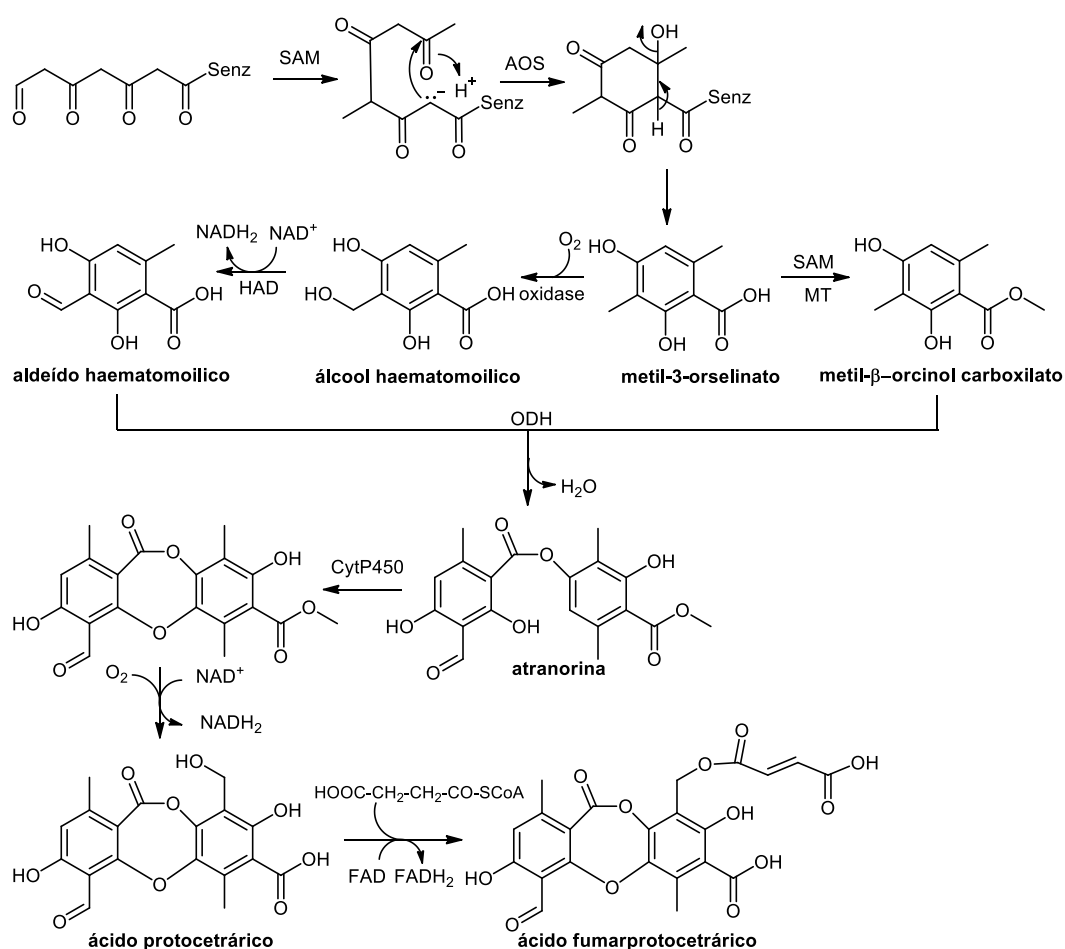


Figura 1.52. Rota biossintética para o ácido fumarprotocetrárico (**4**).

3.2.5. Ácido rappiidico (5) em *Cladonia rappii*

A purificação da fração de diclorometano **ADCR** (309,0 mg) do extrato bruto em acetona **ACR** produziu 99 frações, estas frações foram reunidas na seguinte sequência 1 a 10 (**I** – 18,0 mg), 11 a 24 (**II** – 16,0 mg), 25 a 31 (**III** – 12,0 mg), 32 a 46 (**IV** – 47,0 mg), 47-62 (**V** – 44,0 mg), 63 a 72 (**VI** – 15,0 mg), 73 a 80 (**VII** – 30,0 mg) e 81 a 99 (**VIII** – 12,0 mg). Na **Figura 1.53** é possível observar a análise em CCD realizada para visualizar o resultado da purificação cromatográfica.

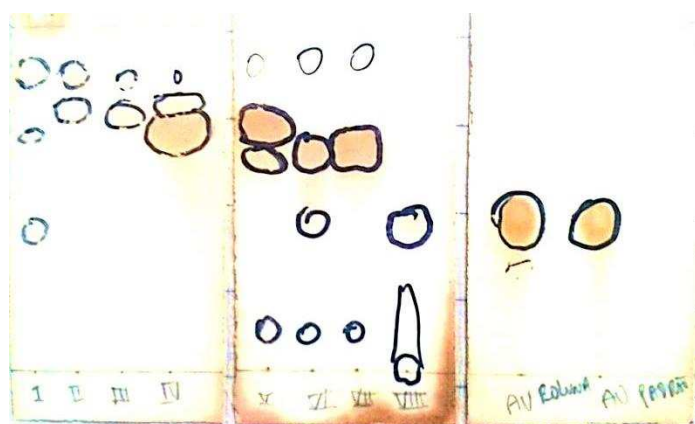


Figura 1.53. Análise por CCD (DCM:Hex – 2:1) das frações I a VIII obtidas após a purificação de **ADCR** por cromatografia em coluna. A fração VIII foi identificada como o sendo o ácido úsnico após a comparação com o R_f do ácido úsnico (**3**) isolado anteriormente. Revelador: Vanilina ácida.

A primeira tentativa de purificação das frações ocorreu com VII, por cromatografia em coluna (DCM:Hex – 1:1), e obtiveram-se 21,0 mg de material. No entanto, na análise por CCD do material purificado, utilizando o eluente CH_3Cl :Hex – 1:1, foi possível observar a presença não só de uma, mas de quatro manchas, indicando a presença de outras substâncias.

Um novo procedimento de purificação por cromatografia em coluna foi realizado, utilizando o eluente CH_3Cl :Hex – 1:1, mas não foi possível separar as substâncias.

Na fração IV, foi observada a presença de duas manchas, uma com $R_f = 0,68$ e outra com $R_f = 0,56$ (CCD - Hex:CHCl₃:acetona – 10:1:0,5) (**Figura 1.54A**). Pelo processo de purificação por cromatografia em coluna foi possível obter somente a mancha com $R_f = 0,56$, que foi identificada como IV-A, 39,0 mg (**Figura 1.54A**). A análise de IV-A, por CCD, utilizando o eluente Hex:CHCl₃:acetona – 15:1:0,5, mostrou o desdobramento da mancha IV-A em mais quatro manchas, com R_f 's = 0,80; 0,58; 0,46; 0,12 (**Figura 1.54B**).

A mancha com $R_f = 0,58$ foi isolada por cromatografia em camada delgada preparativa (Hex:CHCl₃:acetona – 15:1:0,5) e foi identificada como sendo IV-A-2 (13,7 mg). No entanto, ao eluir a placa com o eluente tolueno:ácido acético – 200:30 (**Figura 1.54C**), observou-se a presença de outras duas manchas, que foram identificadas como IV-A-2-0 ($R_f = 0,82$), IV-A-2-1 ($R_f = 0,60$) e IV-A-2-2 ($R_f = 0,47$). Assim, a mancha IV-A-2-1 foi isolada por cromatografia em camada delgada preparativa (tolueno:ácido acético – 200:30) e posteriormente foi identificada como sendo o composto **5** (8,0 mg) (**Figura 1.54D**).

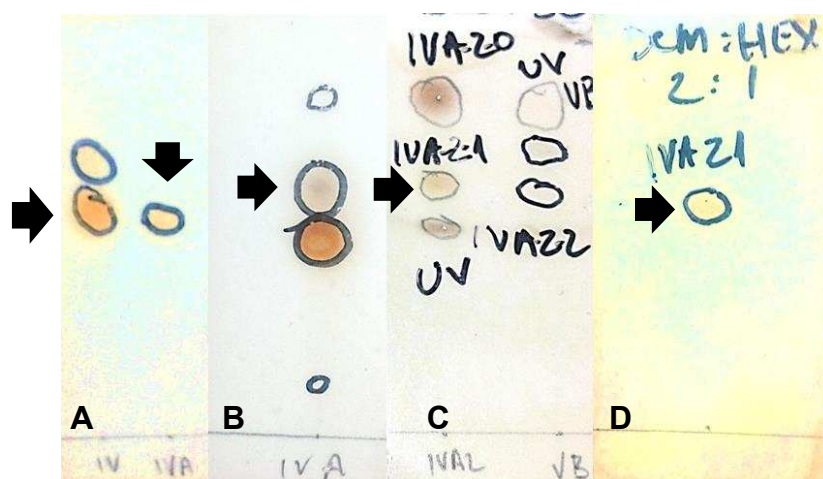


Figura 1.54. **A** – Mancha IV desdobrada em duas manchas após o isolamento por cromatografia em coluna (HEX:CHCl₃:Acetona – 10:1:0,5) e mancha IV-A purificada. **B** – Mancha IV-A desdobrada em quatro novas manchas após a aplicação de um novo sistema eluente (HEX:CHCl₃:Acetona – 15:1:0,5) em detalhe mancha IV-A-2. **C** – Mancha IV-A-2 desdobrada em três novas manchas após a aplicação do sistema eluente (Tolueno:HAc – 200:30), no detalhe a mancha IVA-2-1. **D** – Composto **5** (IVA-2-1) isolado por cromatografia em camada preparativa (Tolueno:HAc – 200:30).

Através da análise do espectro no infravermelho de **5** foi possível observar as bandas de estiramento assimétrico e simétrico $\nu(\text{C}_{\text{sp}3}\text{-H})$ de 2958 a 2856 cm^{-1} , a banda deslocada de $\nu(\text{C=O})$ em 1650 cm^{-1} devido a ligação de hidrogênio intramolecular. Os estiramentos relativos às ligações (C=C) de compostos aromáticos foram observados 1577 cm^{-1} e os estiramentos $\nu(\text{C-O})$ para éteres alquil-arilas em 1254 e 1048 cm^{-1} (**Figura 1.55**).

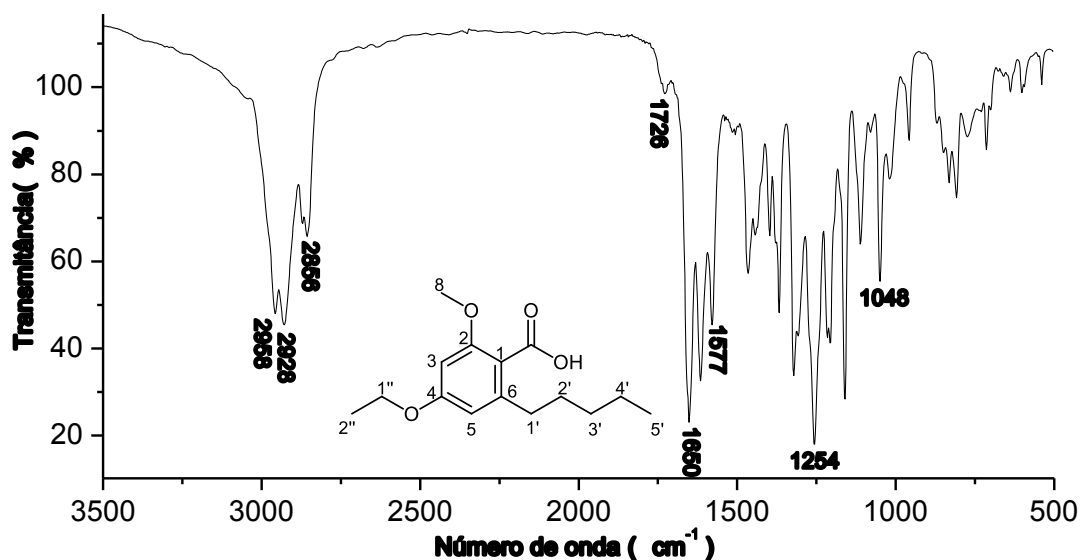


Figura 1.55. Espectro no infravermelho do ácido rappiidoico (**5**) (Reflectância/ λ_{max}).

A análise do espectro de RMN de ^1H de **5** (**Figura 1.56**, pág. 105) possibilitou a atribuição dos sinais dos hidrogênios aromáticos H3 e H5, como dupletos, em δ 6,28 ($J = 2,7$ Hz) e em δ 6,33 ($J = 2,7$ Hz), respectivamente. Estes sinais são referentes ao acoplamento *meta* que ocorre entre estes hidrogênios, o que foi confirmado pelo valor de $J = 2,7$ Hz.

Foi observado também um simpleto intenso em δ 3,80, bem característico de CH_3 de grupo metoxila (H8) e para o hidrogênio do ácido carboxílico (H7) foi observado um simpleto em δ 11,84.

Para os hidrogênios das cadeias laterais foi assinalado um quarteto para H1'' ($J = 7,2$ Hz) em δ 4,40 e um tripleto para H2'' ($J = 7,2$ Hz) em δ 1,41. O sinal de H1' apareceu como um tripleto ($J = 2,1$ Hz) em δ 2,86 e o de H2' como um pseudo quinteto em δ 1,57. Os sinais dos hidrogênios H3' e H4' apareceram sobrepostos e assim foi observado um multipletto na faixa de δ 1,30-1,37 que foi integrado para quatro hidrogênios. Para H5' foi observado um tripleto ($J = 6,9$ Hz) em δ 0,90.

Pela análise do mapa de contornos COSY (**Figura 1.57, pág. 106**) foi possível confirmar algumas das atribuições apresentadas acima. Observou-se o acoplamento entre os hidrogênios H1'' e H2'', bem como entre H1' e H2' e entre H4' e H5'.

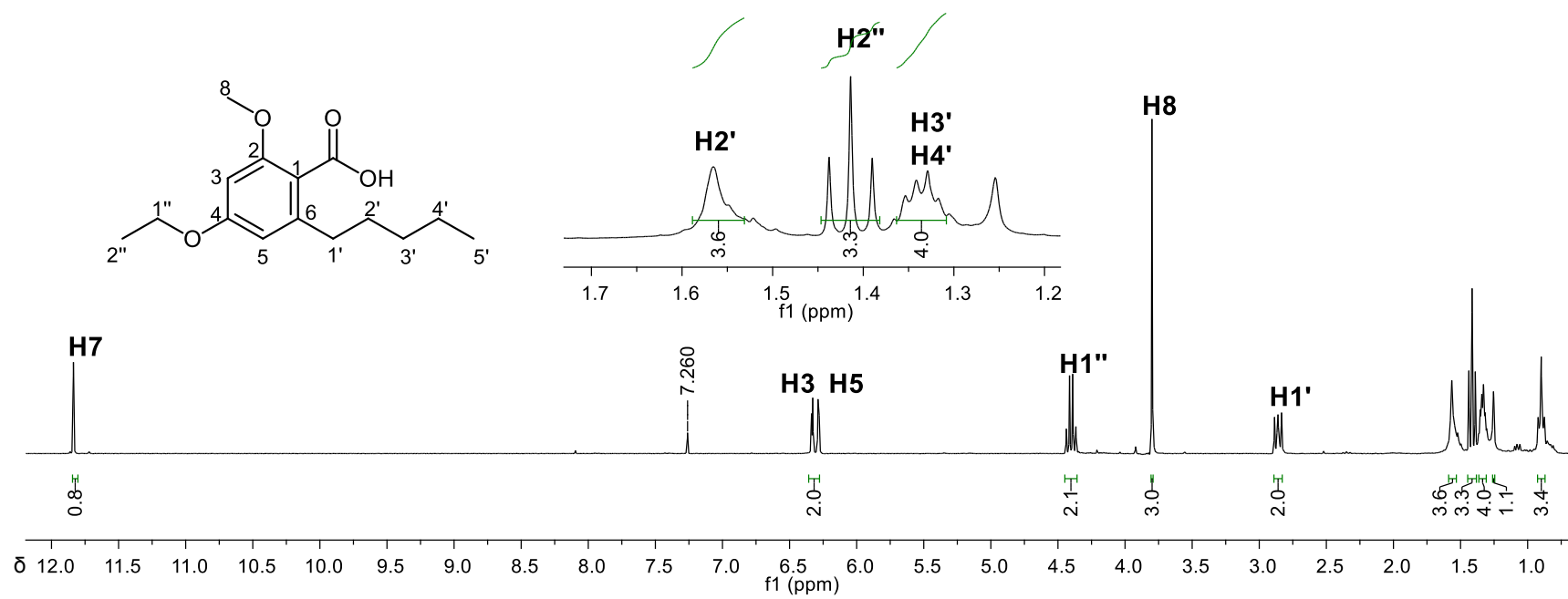


Figura 1.56. Espectro de RMN de ^1H do ácido rappidico (**5**) (300 MHz, CDCl_3 - δ_{CHCl_3} 7,26).

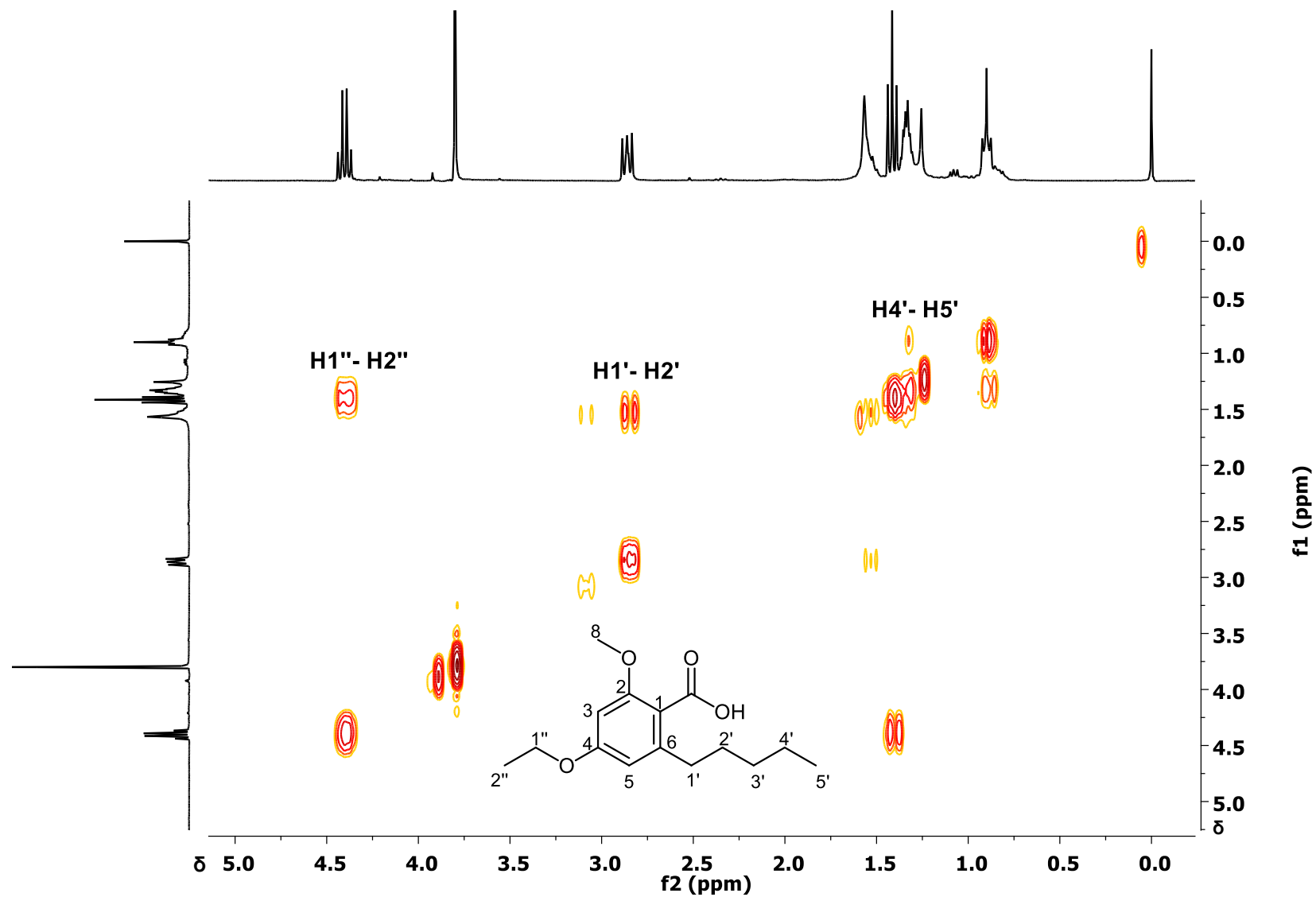


Figura 1.57. Mapa de contornos COSY (300 MHz, $CDCl_3$) para o composto 5.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 1.58, pág. 108**) de **5** foram observados 15 sinais. A atribuição correta desses sinais, bem como a correlação com os seus respectivos hidrogênios só foi possível pela análise do espectro de RMN obtido pelo experimento DEPT e do experimento em duas dimensões HETCOR (**Figuras 1.59, pág. 108 e 1.60, pág. 111, respectivamente**).

Os sinais referentes aos carbonos metilênicos C1' (δ 61,2), C1'' (δ 37,0), C2'' (δ 31,7), C3'' (δ 32,1), C4'' (δ 22,6) foram confirmados pela análise do experimento de DEPT 135, quando ocorreram como sinais negativos (**Figura 1.59, pág. 108**). Os sinais positivos foram atribuídos para os carbonos C3 (δ 110,6) e C5 (δ 98,8) como sendo do tipo $-\text{CH}$ e em δ 55,3, δ 14,07 e δ 14,13 para as metilas C8, C5' e C2'', respectivamente.

Através da análise do mapa de contornos HETCOR (**Figura 1.60, pág. 109**) foi possível confirmar todas as atribuições acima.

As atribuições de RMN para todos os sinais obtidos da análise de **5** estão sumarizados na **Tabela 1.9, pág. 110**. Até a presente data não foram encontrados dados da literatura sobre o ácido rappiidico (**5**), sendo esta a primeira descrição para esta molécula.

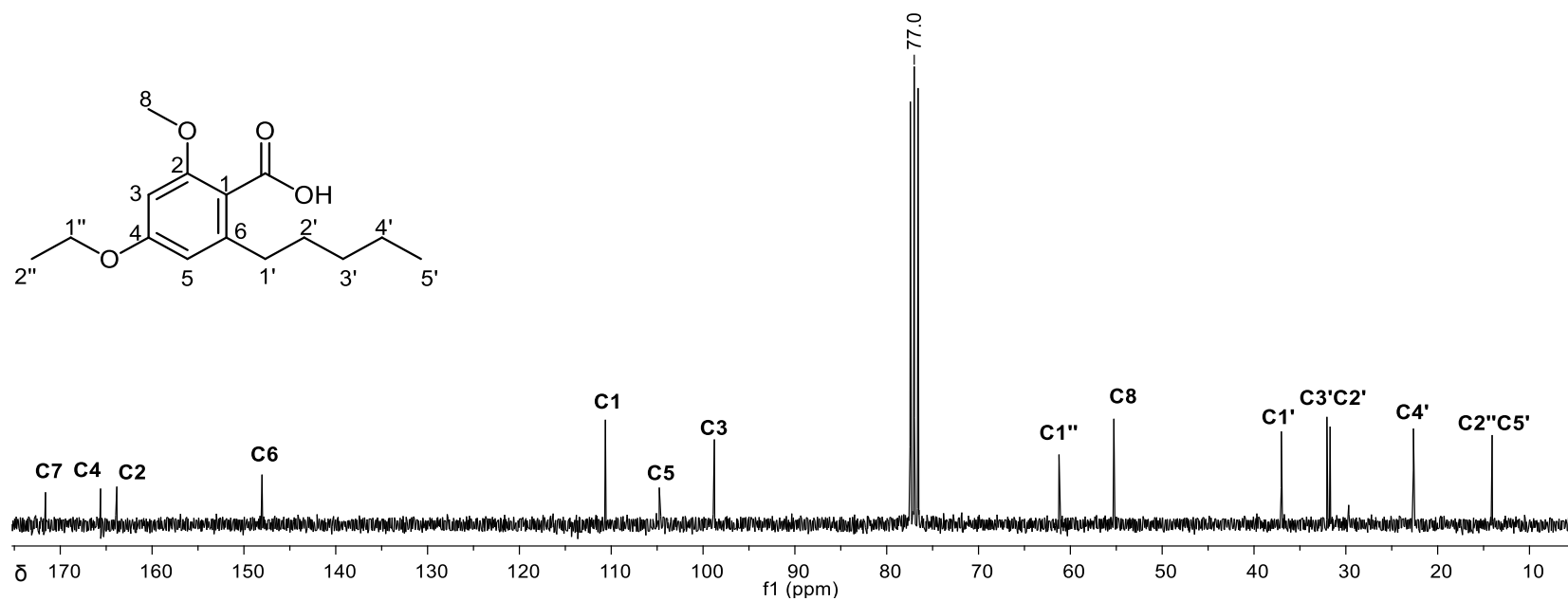


Figura 1.58. Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 - δ_{CHCl_3} 77,0) do ácido rappiídico (5).

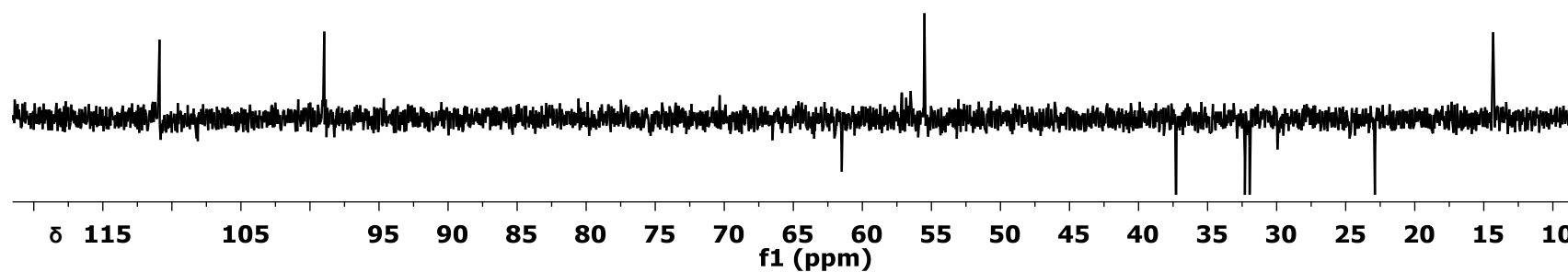


Figura 1.59. Espectro de DEPT-135 (75 MHz, CDCl_3) do ácido rappiídico (5).

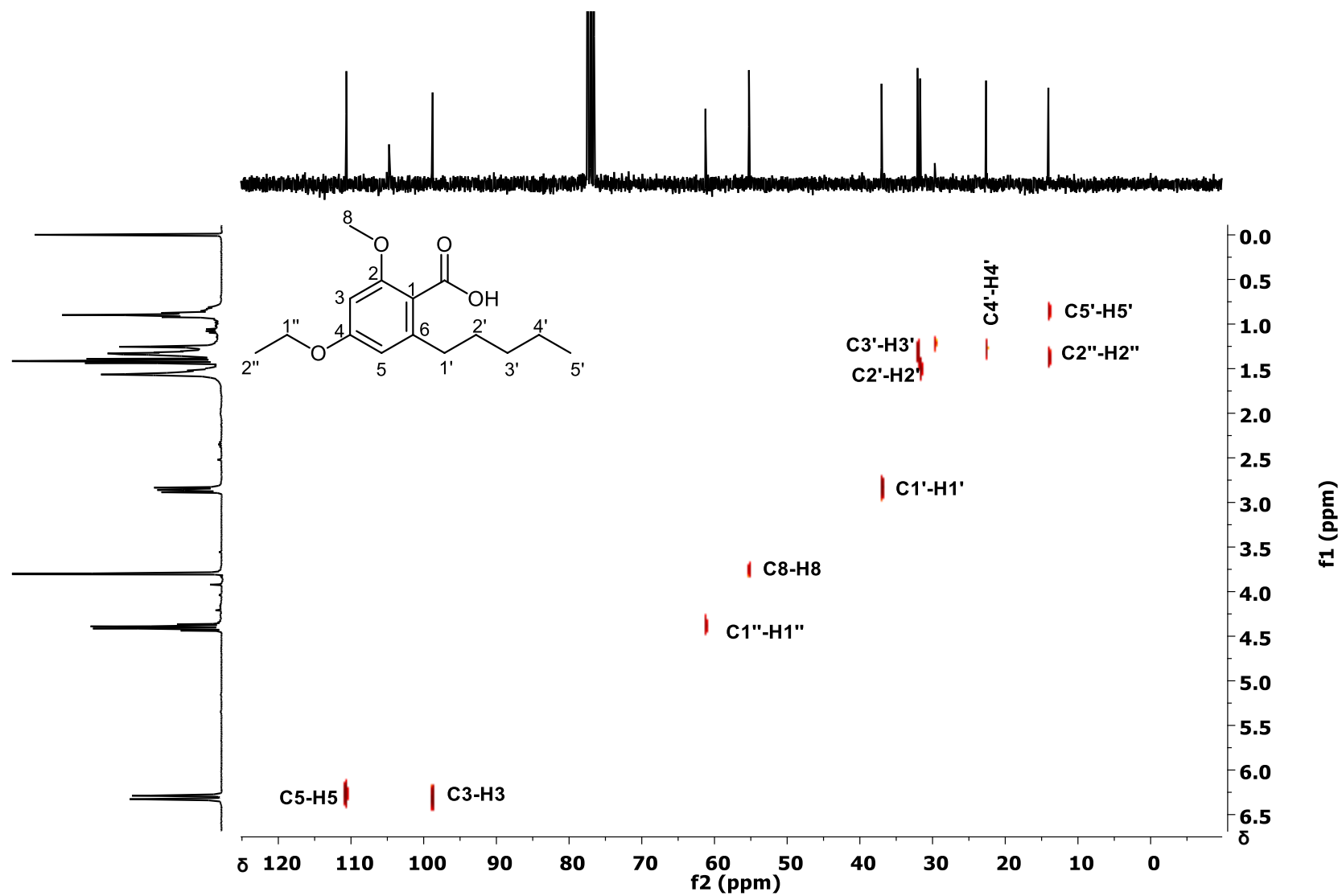


Figura 1.60. Mapa de contornos HETCOR do ácido rappidico **5** (75 x 300 MHz, CDCl_3).

Tabela 1.9. Dados de deslocamentos químicos de RMN de ^1H , ^{13}C , Dept e as correlações em duas dimensões para COSY e HETCOR de **5**

Posição	^1H (δ), mult., J, integração	^{13}C (δ)	COSY	HETCOR
1		104,8		
2		163,8		
3	6,28; d; 2,7 Hz; 1H	110,6; (CH)		6,28/110,6
4		165,6		
5	6,33; d; 2,7 Hz; 1H	98,8; (CH)		6,33/98,8
6		148,0		
7	11,84; s; 1H	171,6		
8	3,8; s; 3H	55,3; (CH ₃)		3,80/55,3
1'	2,86; t; 2,1 Hz; 2H	37,0; (CH ₂)	2,86/1,57	2,86/37,0
2'	1,57; <i>p. quin</i> ; 2H	31,7; (CH ₂)	1,57/2,86	1,57/31,7
3'	1,30-1,37; m; 2H	32,1; (CH ₂)		1,30/32,1
4'	1,30-1,37; m; 2H	22,6; (CH ₂)	1,30-1,37/0,90	1,30/22,6
5'	0,90; t; 6,9 Hz; 3H	14,07; (CH ₃)	0,90/1,30-1,37	0,90/14,07
1''	4,40; q; 7,2 Hz; 2H	61,2; (CH ₂)	4,40/1,41	4,40/61,2
2''	1,41; t; 7,2 Hz; 3H	14,13; (CH ₃)	1,41/4,40	1,41/14,13

No espectro de massas (GC-MS/EI) para **5** observou-se o pico do íon molecular em $m/z = 266$ (16,41%) e o pico base em $m/z = 164$ (100%) (Figura 1.61).

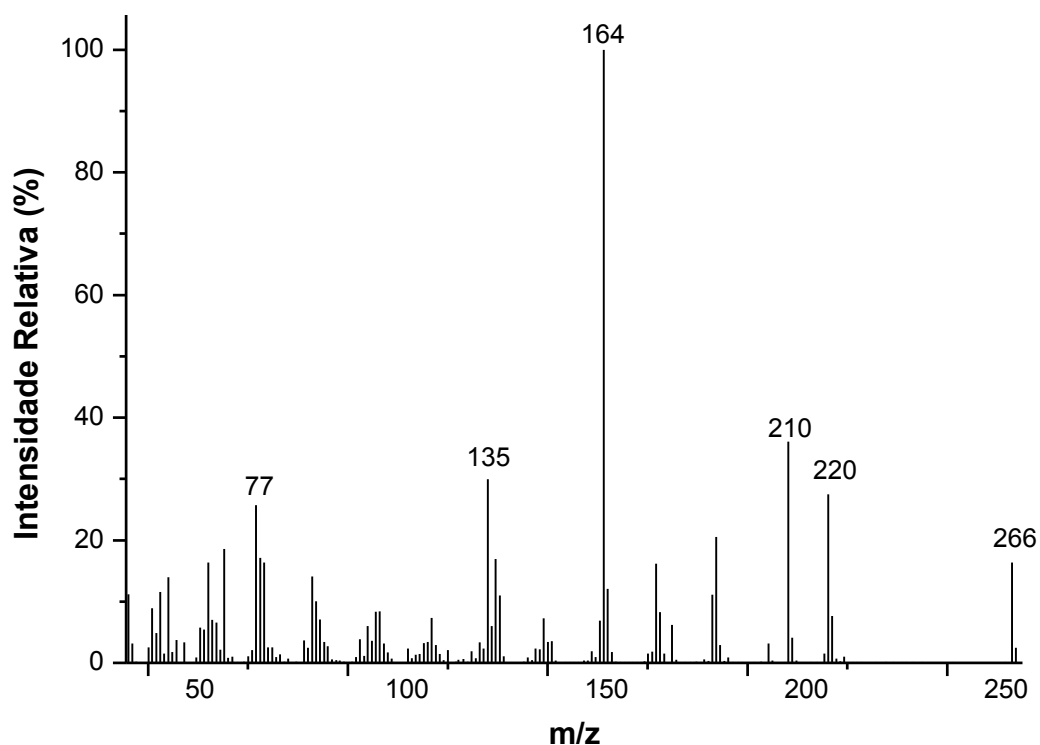


Figura 1.61. Espectro de massas (GC-MS/EI) para o ácido rappiídico **5**.

A descarboxilação do pico do íon molecular em m/z 266 da origem ao cátion em m/z 221, que após a clivagem da cadeia lateral alifática entre os carbonos C1' e C2' formam o cátion radical correspondente o pico base em m/z 164 (**Figura 1.62**).

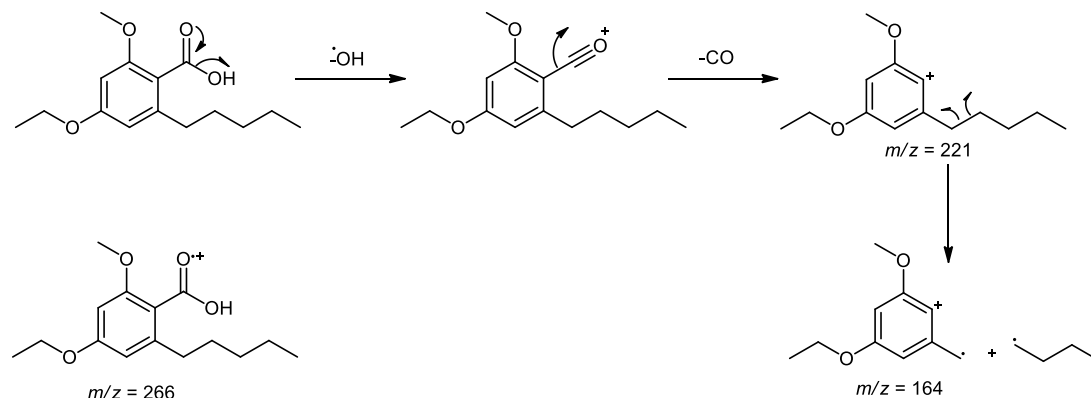


Figura 1.62. Proposta mecanística para a fragmentação do ácido rapiidico (5) até o fragmento correspondente ao pico do íon molecular.

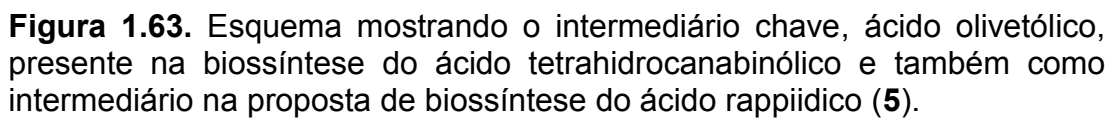
Devido ao seu aspecto estrutural, o ácido rapiidico **5** (ácido 4-etoxi-2-metoxi-6-pentilbenzóico) pode ser classificado como um alquilresorcinol. Nesta classe de substâncias estão incluídos desde homólogos simples ao orcinol até derivados com modificações na cadeia lateral e no anel aromático. Na maioria dos casos, a cadeia lateral dos alquilresorcinóis possui número ímpar de carbonos assim como o ácido rapiidico **5**. Os alquilresorcinóis pertencem a família dos lipídios fenólicos que ocorrem em plantas, fungos e bactérias (KOZUBEK, TYMAN; 1999; BAERSON et al., 2010)

A proposta para a biossíntese do ácido rapiidico (**5**) é de que ela pode ocorrer pela via do acetato. Em um primeiro momento uma reação de condensação de Claisen entre acetil-SE e malonil-SACP forma o acetoacetil-SACP. Os processos de redução, eliminação Syn e uma nova redução ocorrem e posteriormente se inicia o processo de alongamento da cadeia utilizando outra unidade de malonil-SACP. Os processos de redução, eliminação e redução se repetem e a adição de uma molécula de água gera o ácido hexânico (MANN, 2005; DEWICK, 2009) (**Figura 1.63, página 113**).

O restante da proposta é um tanto interessante. Poderia se especular que a biossíntese do ácido rappiidico (**5**) possa ocorrer por etapas semelhantes às descritas para a biossíntese dos ácidos canabinóicos, como o THC. Um intermediário chave, produzido por esta via de biossíntese, é o ácido olivetólico (**Figura 1.63, pág. 113**) (AUSTIN, NOEL; 2003; STOUT et al., 2012). Esta substância possui estrutura semelhante a do ácido rappiidico (**5**) e dessa forma este processo poderia também ser expandido para a biossíntese de (**5**).

Por esta proposta, pela ação da enzima Hexanoil-CoA Sintase ocorre a formação de uma unidade de hexanoil-SCoA a partir do ácido hexânico. Posteriormente a enzima especializada policetídeo sintase do tipo III (PKSII) catalisa a introdução de três unidades de malonil-SCoA, a reação de ciclização aldólica intramolecular e as reações de enolização subsequentes para a formação do precursor chave ácido olivetólico (AUSTIN, NOEL; 2003; BAERSON et al., 2010; STOUT et al., 2012) (**Figura 1.63, pág. 113**).

Após a formação do ácido olivetólico, ocorrem as etapas de alquilação dos oxigênios das hidroxilas. Em uma primeira etapa, a introdução de uma metila e subsequente formação do grupo metoxila, ocorre pela ação da enzima S-metiladenosina (SAM). A formação do grupo etoxila pode ocorrer através da reação da hidroxila com acetaldeído (LOBO, LOURENÇO; 2007) que após um processo de eliminação Syn e posterior redução utilizando NADPH + H⁺ forma o ácido rappiidico (**5**) (**Figura 1.63, pág. 113**).



4. Conclusões

Como pôde ser observado neste capítulo 1, o trabalho foi direcionado para o isolamento e caracterização dos metabólitos secundários presentes nos óleos essenciais e extratos das plantas e líquen coletados no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB) e no Campus da Universidade Federal de Viçosa – UFV.

A identificação dos constituintes químicos dos óleos essenciais de *Lippia triplinervis* e *Baccharis platypoda* permitiu, pela primeira vez, caracterizar parte do metabolismo secundário destas plantas presentes no PESB. Sendo possível determiná-las como quimiótipos distintos daqueles encontrados por Leitão e colaboradores (2011) e por Ferracini e colaboradores (1995) para estas plantas, respectivamente.

A determinação metabólitos secundários do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* coletada no Campus da UFV e as tentativas de isolamento de substâncias dos extratos de *Myrsine squarrosa*, serão de grande importância para a avaliação das atividades biológicas inerentes a essas plantas.

Além disso, foi descrita a presença de *Cladonia rappii* no PESB pela primeira vez, o que levou aos estudos para a identificação dos metabólitos secundários presentes neste líquen, onde foram encontrados o (-)-(S)-ácido úsnico, ácido fumarprotocetrárico e a substância inédita ácido rappiídico.

Estes estudos trazem significativas contribuições para a valorização da biodiversidade existente no PESB, pois se torna uma estrutura de apoio para o conhecimento químico do ecossistema presente neste local. Em adição, fornece importantes informações para estudos sobre a prospecção (ética) de produtos naturais para serem utilizados como medicamentos ou agroquímicos pelo homem.

Neste contexto, no **Capítulo 2**, serão descritos os testes de atividade biológicas realizados neste trabalho.

CAPÍTULO 2. TESTES DE **ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

1. Avaliação da Atividade Antifúngica contra Fungos Patogênicos

1.1.Introdução

Os fungos são organismos eucariontes, multi ou unicelulares, pertencentes ao reino *Fungi* e são classificados como organismos heterotróficos. Ao todo, quase 100.000 espécies já foram identificadas e cerca de 1.700 novas espécies são descobertas a cada ano. O número total de espécies estimado é de cinco milhões e cem mil, colocando os fungos como o segundo maior reino, suplantado apenas pelos insetos (RAVEN et al., 2001; BLACKWELL, 2011).

De todas as espécies de fungos conhecidas, cerca de 100 são responsáveis por causar enfermidades em seres humanos. Das espécies que são prejudiciais ao homem, os fungos oportunistas são aqueles de baixa virulência que ao encontrar distúrbios no sistema imunológico se tornam patogênicos. Ultimamente, os fungos se tornaram a maior causa de infecções humanas, especialmente dentre os hospedeiros imunocomprometidos, como as pessoas com câncer ou AIDS, sendo um dos principais causadores de mortalidade. Nestes indivíduos os fungos patogênicos oportunistas mais comuns são as leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*, os Hyalohyphomycetos *Aspergillus* spp. assim como os dermatófitos *Microsporum* spp. e *Tricophyton* spp (MATHEW, NATH; 2009; KOUZNETSOV et al., 2012).

Para o tratamento das doenças de origem fúngica existem diversos medicamentos que atuam principalmente no núcleo, parede e membrana da célula do fungo. Na **Figura 2.1, pág. 117** é possível observar os principais modos de ação para os medicamentos antifúngicos (MATHEW, NATH; 2009, FREIESLEBEN, JÄGER; 2014).

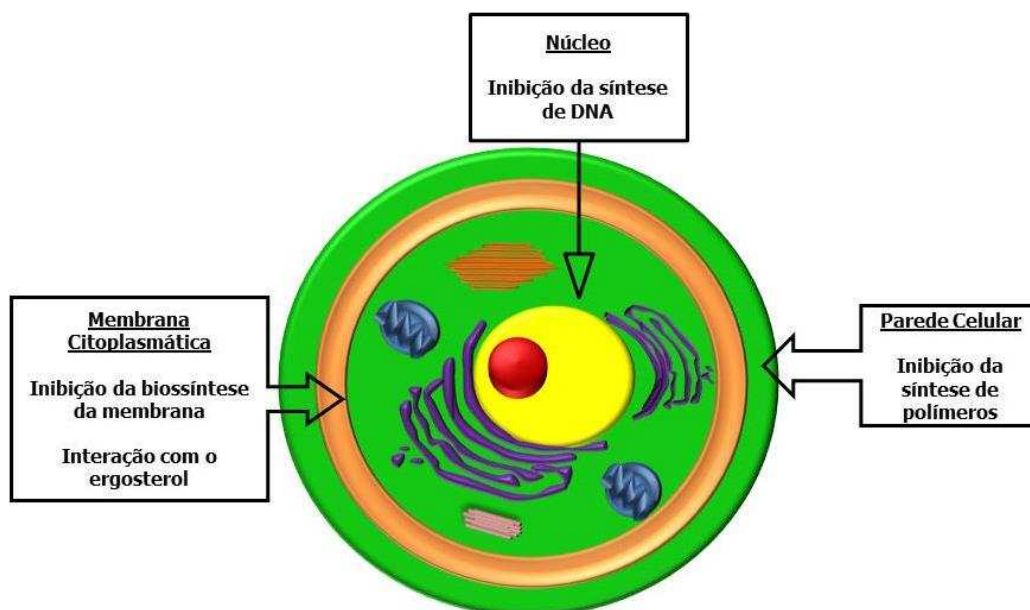


Figura 2.1. Esquema de uma célula de um fungo e seus principais sítios de ação para drogas antifúngicas (adaptado de MATHEW, NATH; 2009).

As substâncias com ação antifúngica que atuam no núcleo, como a 5-fluorocitosina (**Figura 2.2, pág. 118**), agem inibindo o metabolismo das pirimidinas e dessa forma interferindo na síntese dos ácidos nucleicos. A 5-fluorocitosina é utilizada para tratar infecções por *Candida* sp. e *Cryptococcus* sp (PRATS, 2013).

Os medicamentos que atuam na parede celular, como a caspofungina (**Figura 2.2, pág. 118**), inibem a enzima 1,3- β -D-glucano sintetase que é responsável pela síntese dos polímeros de glucano formadores da parede celular da maioria dos fungos. Estes tipos de medicamentos possuem atividade fungicida contra *Candida* sp., fungistática contra *Aspergillus* sp. mas não são ativos contra *Cryptococcus* sp. (PRATS, 2013).

As substâncias que atuam na membrana plasmática podem agir de duas maneiras, a primeira delas é através da reação com o ergosterol, que forma poros na membrana, alterando a sua permeabilidade, levando a perda de metabólitos essenciais e instabilidade osmótica com a consequente morte celular. Com este mecanismo de ação pode-se citar a Anfotericina B (**Figura 2.2, pág. 118**), que é um potente antifúngico, normalmente indicado para a maioria dos fungos leveduriformes, filamentosos e dermatófitos.

O grande problema no uso desta substância reside no fato de que esta é muito tóxica para o organismo, possuindo efeitos nefrotóxicos e por isso a administração tem que ser acompanhada de uma estrita vigilância do sistema renal do paciente (PRATS, 2013).

A outra maneira que agem os medicamentos que atuam na membrana citoplasmática é através do bloqueio da enzima Lanosterol 14 α -desmetilase, que participa da síntese de ergosterol, impedindo a síntese desta molécula. Neste contexto, existem os medicamentos fungistáticos da classe dos azóis, como o fluconazol e itraconazol (**Figura 2.2**), que são menos tóxicos do que a anfotericina B e podem ser utilizados para um largo espectro de infecções fúngicas (PRATS, 2013).

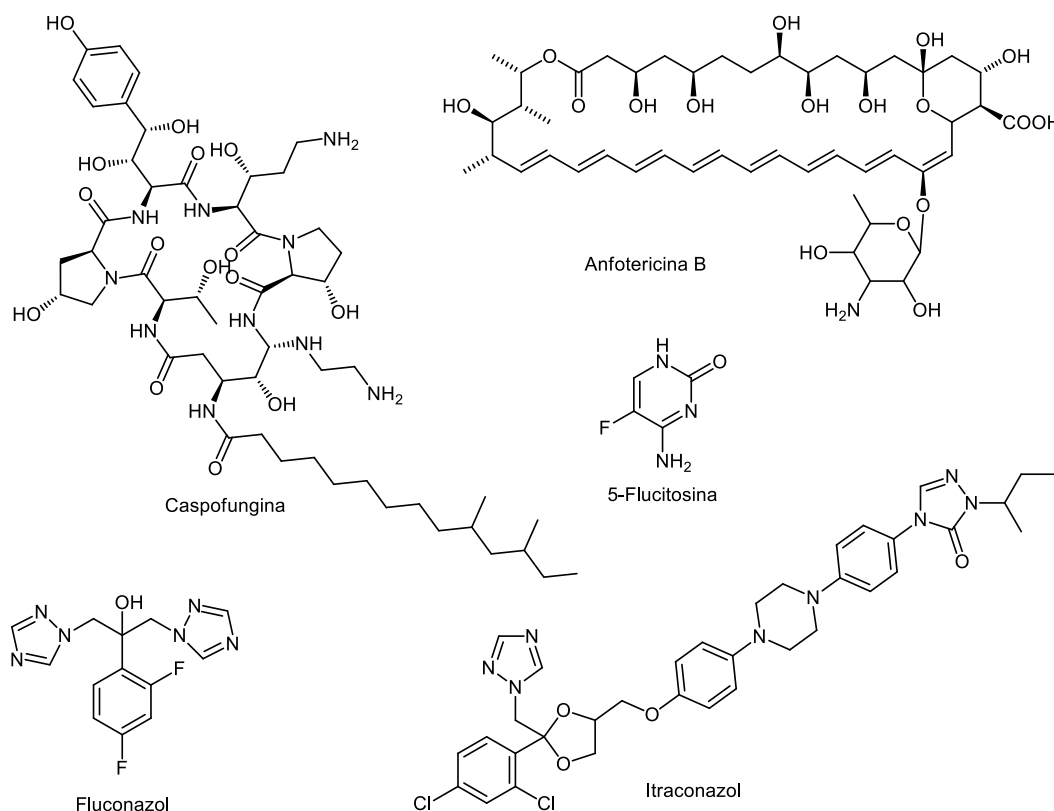


Figura 2.2. Moléculas que atuam nos principais sítios de ação da célula do fungo.

Várias substâncias isoladas de invertebrados marinhos, plantas e outras fontes de produtos naturais têm sido reportadas como inibidores de fungos patogênicos, como os esteróides cinamodiais, os derivados de estilbenóides, as furanonas, os derivados de resorcinóis e os terpenóides (**Figura 2.3**). A propagação de cepas de fungos multirresistentes e o reduzido número de fármacos disponíveis torna necessária a descoberta de novas classes de antifúngicos que inibem estes mecanismos de resistência (VENGURLEKAR et al., 2012).

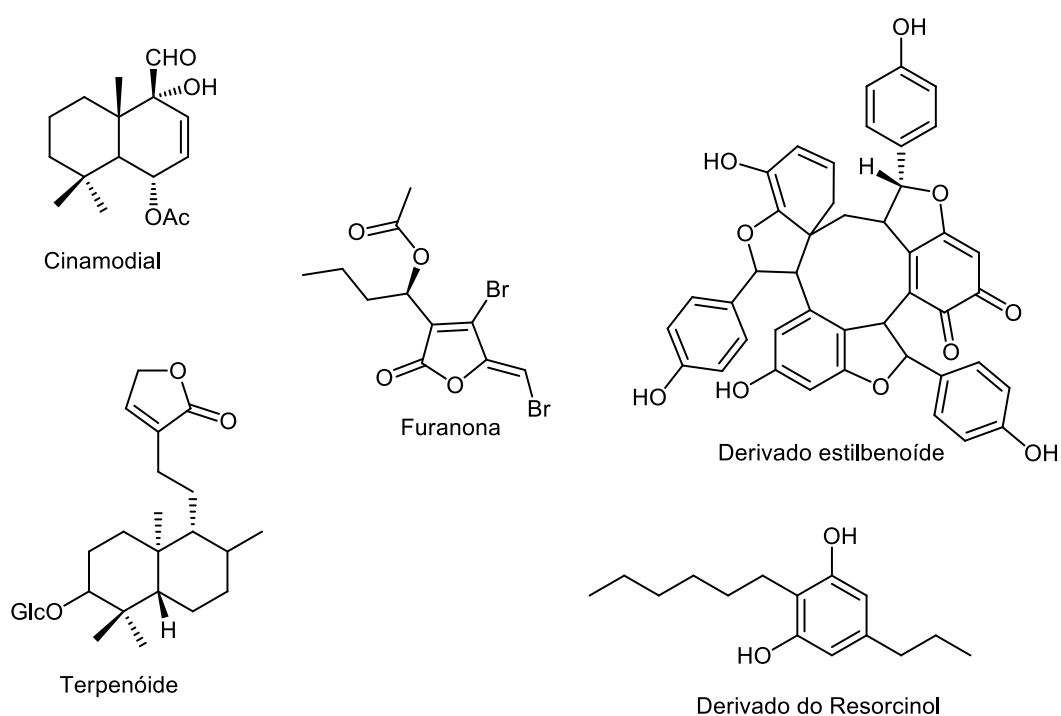


Figura 2.3. Alguns antifúngicos naturais.

Os produtos naturais emergem como uma alternativa aos medicamentos mais utilizados para combater infecções fúngicas. Os metabólitos secundários bioativos de plantas, organismos marinhos e microrganismos possuem não somente uma diversidade estrutural desejada, mas também, em geral, são menos tóxicos quando comparados com os fungicidas sintéticos disponíveis. Além disso, são muitos seletivos e, hipoteticamente, as atividades biológicas dessas substâncias ocorrem sempre por um processo de ligação a um sítio celular específico (CRAGG, NEWMAN; 2013).

Neste contexto, os produtos naturais podem ser utilizados em combinação com os principais produtos disponíveis no mercado para combater microrganismos. Este tipo de estratégia tem como vantagens o aumento da eficiência, a redução de efeitos colaterais, o aumento da estabilidade ou biodisponibilidade das substâncias e a obtenção de efeitos terapêuticos em doses menores (CHANDA, RAKHOLIYA; 2011).

Assim, os testes de atividade antifúngica, contra fungos patogênicos foram realizados com os óleos essenciais, extratos e substâncias isoladas das plantas e líquen coletados no PESB. Além disso, foram realizados ensaios de combinação entre os principais medicamentos utilizados para combater as infecções fúngicas, o extrato de *C. rappii* e o ácido fumarprotocetrárico isolado deste líquen.

1.2. Materiais e Métodos

Os testes de atividade antifúngica para fungos oportunistas foram realizados em um estágio de dois meses no Laboratório de Farmacognosia da Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas da Universidad Nacional de Rosario – Argentina, sob supervisão da Profa. Dra. Susana Zacchino.

Foram aplicadas três metodologias distintas para a avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais, extratos, frações e das substâncias isoladas. A primeira metodologia aplicada foi a Bioautografia, que permitiu realizar uma varredura sobre a atividade do material a ser testado.

Posteriormente, foi utilizada a metodologia de microdiluição em caldo de acordo com os procedimentos padrões da CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M27-A3 para fungos leveduriformes e M38-A2 para fungos filamentosos, de forma a determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais, extratos, frações e substâncias testadas contra os fungos.

A terceira metodologia utilizada foi uma adaptação da microdiluição em caldo para avaliar o efeito de sinergismo, aditivismo ou antagonismo do extrato de *C. rappii* e do ácido fumarprotocetrárico isolado deste líquen, com os antibióticos Itraconazol, Anfotericina e Fluconazol.

1.2.1. Microrganismos utilizados

As cepas fúngicas utilizadas foram obtidas junto ao ATCC (*American Type Culture Collection*) e ao CCC/CEREMIC (Centro de Referência em Micologia) o que assegurou a autenticidade da identificação. Os testes foram realizados frente a 12 fungos sendo: *Candida albicans* ATCC 10231 (**cal**), *Candida tropicalis* CCC131 (**ct**), *Candida krusei* (**ck**), *Candida glabrata* (**cg**), *Candida parapsilosis* (**cp**), *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264 (**cn**), *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934 (**afu**), *Aspergillus flavus* ATCC 9170 (**afl**), *Aspergillus niger* ATCC 9029 (**ani**), *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972 (**tm**), *Microsporum gypseum* CCC 115 (**mg**) e *Trichophyton rubrum* CCC 113 (**tr**).

As cepas foram mantidas em Ágar Sabouraud-Glicose (ASG) e incubadas a 28 °C por um período de 24 a 48 horas para os fungos leveduriformes, para os fungos filamentosos o período de incubação foi de 72 horas para *Aspergillus* sp. e sete dias para os fungos dermatófitos. Após este tempo os fungos foram armazenados em geladeira e as cepas foram repicadas a cada quinze dias para prevenir a ocorrência de pleomorfismo.

1.2.2. Meios de cultura utilizados

1.2.2.1. Ágar Sabouraud glicose (ASG)

Foram utilizados 10,0 g de peptona de carne, 40,0 g de glicose e 15,0 g de ágar, em seguida foram adicionados 900 mL de água destilada e misturou-se até a dissolução completa da solução. Posteriormente o pH foi ajustado em 5,6, utilizando uma solução de HCl, a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Em seguida ajustou-se o volume da solução para um litro. Após o preparo do meio, o mesmo foi aquecido até a completa dissolução das substâncias, distribuído em frascos de 50,0 mL, esterilizado e armazenado em geladeira.

1.2.2.2. Meio semi-sólido

Para preparar o meio de cultura semi-sólido foram empregados 0,6% de ágar, 0,2% de vermelho de fenol, 1% de peptona e 2% de glicose para 200 mL de solução. Foram medidas as massas das substâncias, em seguida adicionou-se água destilada até completar o volume para 200 mL. O material foi aquecido até a dissolução completa de todas as substâncias. Em seguida, fracionou-se a solução em dez partes, em frascos de vidro de 20 mL. O material foi esterilizado e armazenado em geladeira.

1.2.2.3. Meio Sabouraud 2x

Foram utilizados 20,0 g de peptona de carne e 40,0 g de glicose, em seguida foram adicionados 900 mL de água destilada e misturou-se o material até a sua completa dissolução. Posteriormente o pH foi ajustado em 7,0 utilizando uma solução de NaOH a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

Transferiu-se água destilada para a mistura até completar 1L. Após o preparo do meio, o mesmo foi aquecido e posteriormente esterilizado e armazenado em geladeira.

1.2.3. Contagem dos microrganismos

1.2.3.1. Fungos leveduriformes

Com o auxílio de uma alça estéril foram retiradas duas colônias da levedura de interesse e estas foram transferidas para um tubo de ensaio contendo meio de cultura sabouraud 2x, em seguida, a suspensão de leveduras foi incubada em estufa a uma temperatura de 28 °C para *Candida* sp. por 24 horas e por 48 horas para *Cryptococcus neoformans*.

Posteriormente, foi retirada uma alíquota da suspensão e esta transferida para um tubo de ensaio contendo água destilada. O procedimento foi realizado até se obter uma turbidez equivalente a 0,5 na escala Mc Farland, que corresponde a aproximadamente $1-5 \times 10^6$ leveduras por mililitro (ZACCHINO & GUPTA, 2007).

Após este procedimento, foi retirada uma alíquota de 20 µL da suspensão e adicionada a uma câmara de Neubauer para contagem das leveduras. As leveduras foram contadas nos cinco quadrados do centro da câmara de Neubauer conforme pode ser visto na **Figura 2.4, pág. 124**.

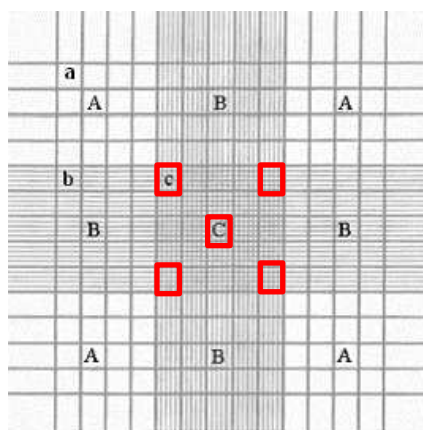


Figura 2.4. Câmara de Neubauer vista do microscópio. Destaque para a região central da placa onde foi realizada a contagem das leveduras.

Depois de contar o número de leveduras presentes em cada quadrado “c”, o valor encontrado foi multiplicado por 50.000 de forma a encontrar o número de leveduras por mililitro. Para executar os testes realizou-se a diluição da suspensão em água destilada estéril ou meio de cultura semi-sólido para a concentração de 5×10^4 leveduras por mL.

1.2.3.2. Fungos filamentosos

De um tubo de ensaio contendo meio de cultura e o fungo de interesse (*Aspergillus* sp., *Trychophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton rubrum*) foi retirado o micélio deste fungo com o auxílio de uma alça estéril. O micélio foi então transferido para um erlenmeyer contendo água destilada estéril e pérolas de vidro. Em seguida, o submeteu-se o material a um processo de agitação por quinze minutos, sendo posteriormente filtrado em gaze estéril e recolhido em um tubo de ensaio. Após esse processo, o filtrado foi centrifugado e o sobrenadante retirado. Este procedimento foi repetido três vezes e ao final os conídios foram ressuspensos com uma pequena quantidade de água destilada estéril.

Os conídios dos fungos foram contados nos quatro quadrados “a” de todas as regiões “A” conforme mostrado na **Figura 2.5**. O valor encontrado foi multiplicado por um fator de 2500 para obter o número de conídios por mililitro. Ao final foi realizada uma diluição em água destilada estéril para obter a concentração de trabalho de 5×10^3 conídios/mL.

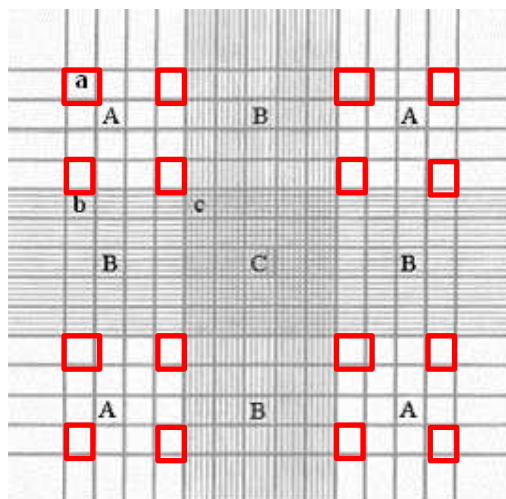


Figura 2.5. Câmara de Neubauer vista do microscópio. Destaque para as regiões “a” onde foi realizada a contagem dos conídios.

1.2.4. Metodologias de testes

1.2.4.1. Bioautografia direta

Os ensaios utilizando o método de bioautografia direta (LÓPEZ et al., 2007; CHOMA & GRZELAK, 2011) foram realizados por duas formas distintas, uma sem a migração da fase móvel pela placa cromatográfica e outra com a migração da fase móvel pela placa cromatográfica.

1.2.4.1.1. Bioautografia direta sem migração da fase móvel

Para este ensaio foram utilizadas placas cromatográficas de sílica-gel (Sigma-Aldrich) em alumínio com indicador fluorescente. Estas placas foram cortadas com dimensões de 8,0 x 5,0 cm e divididas em 28 quadrados de 1 cm² cada, sendo sete na horizontal e quatro na vertical (**Figura 2.6**). Para os extratos, foram aplicadas sobre o centro de cada quadrado, soluções em acetona contendo 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µg do extrato, com o auxílio de uma micropipeta e um capilar. Para as substâncias puras foram aplicadas soluções em acetona do ácido úsnico (**3**) e em etanol para o ácido fumarprotocetrárico (**4**), contendo 5, 10, 15 e 20 µg de cada substância (**Figura 2.6**).

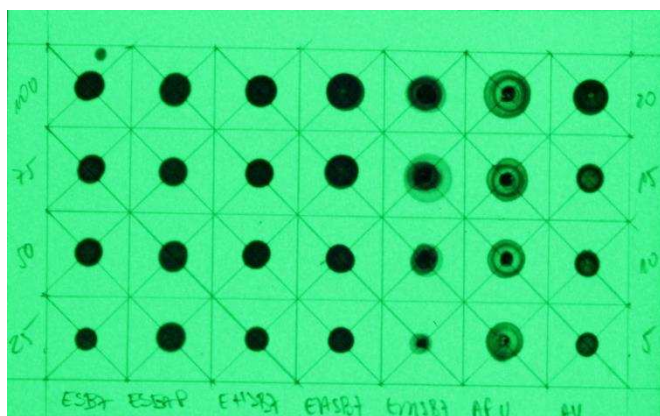


Figura 2.6. Placa de sílica-gel utilizada para Bioautografia sem migração da fase móvel.

Após aplicar o material, a placa foi levada para câmara de luz ultravioleta por vinte minutos. Depois deste período, foram adicionados à placa aproximadamente 20,0 mL de uma suspensão de leveduras em meio semi-sólido de *C. neoformans* ou *C. albicans* na concentração de 5×10^4 leveduras/mL. Após trinta minutos, o material foi levado à estufa de incubação a uma temperatura de 28 °C por um período de 24 horas. Após este tempo, a placa foi retirada da estufa e a ela adicionada uma mistura de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina).

Este material foi novamente incubado, desta vez, por uma hora e o resultado obtido após este período.

1.2.4.1.2. Bioautografia direta com migração da fase móvel

Foi utilizada uma placa para cromatografia em camada delgada de sílica-gel (Sigma-Aldrich) em alumínio com indicador fluorescente. A placa foi cortada nas dimensões 12,0 x 8,0 cm e foi traçada uma linha com um lápis a um centímetro da base. Esta linha foi dividida em quatro partes de um centímetro onde foram aplicados 100,0 µg dos extratos (**ECR**, **ECRF**) e 20,0 µg das substâncias puras (**3** e **4**).

Após este procedimento foi realizada a corrida cromatográfica utilizando clorofórmio puro como eluente. Ao final, visualizou-se todo o procedimento em Câmara UV. Além deste procedimento, após a corrida cromatográfica, na parte superior da placa foi realizada uma co-aplicação com **3** e **4** (10,0 µg de cada) conforme é possível observar na **Figura 2.7 (A)**.

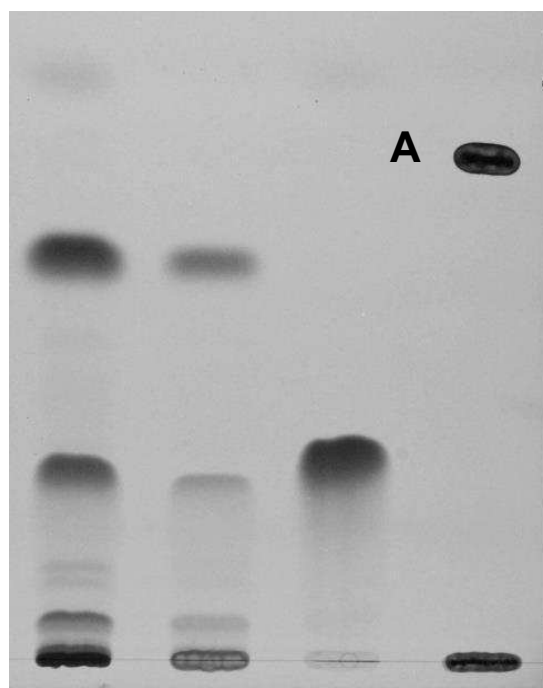


Figura 2.7. Placa cromatográfica com migração da fase móvel. Em “A” detalhe para a co-aplicação entre **3** e **4** (estas substâncias foram aplicadas após o processo de migração da fase móvel).

1.2.5. Microdiluição em Caldo (CIM e CIM₅₀)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima do crescimento fúngico (CIM) e Concentração Inibitória Mínima para impedir o crescimento fúngico em 50% (CIM₅₀) foi realizada através do método de microdiluição em caldo (CLSI, 2008a; CLSI, 2008b). Para a execução deste ensaio, foram preparadas as soluções mãe em DMSO com 50,0 mg/mL para os extratos e 12,5 mg/mL para as substâncias puras. Em seguida foram preparadas as soluções de trabalho com duas vezes a concentração máxima final. Em um eppendorf foram adicionados 960 µL de meio de cultura Sabouraud 2x e 40,0 µL da solução mãe. Assim, para os extratos as soluções de trabalho alcançaram a concentração final de 2000 µg/mL e para as substâncias puras as soluções alcançaram a concentração final de 500 µg/mL.

Em uma placa de 96 poços (**Figura 2.8, pág. 129**) com tampa e fundo planos (Greiner Bio One, Wemmel, Bélgica), foram adicionados 200 µL da solução de trabalho contendo o extrato ou a substância de interesse aos Poços “A”. Em seguida foram adicionados 100 µL de meio de cultura Sabouraud 2x aos demais poços. Dos poços “A” foram retirados 100 µL e transferidos para os poços “B” e assim sucessivamente, realizando uma diluição seriada até os poços “G”. Posteriormente, foram adicionados 100 µL da dispersão de leveduras/conídios do fungo de interesse nos poços A1 e A2 até H1 e H2 (duplicata), A3 e A4 até H3 e H4 para outro fungo e assim sucessivamente até preencher a placa com os outros fungos a serem testados. Os poços “H” foram utilizados como controle de crescimento. Por este processo de diluição seriada, ao final, foi obtida uma faixa de concentração de 1000 – 15,625 µg/mL para os extratos e 250 – 3,90625 µg/mL para as substâncias puras.

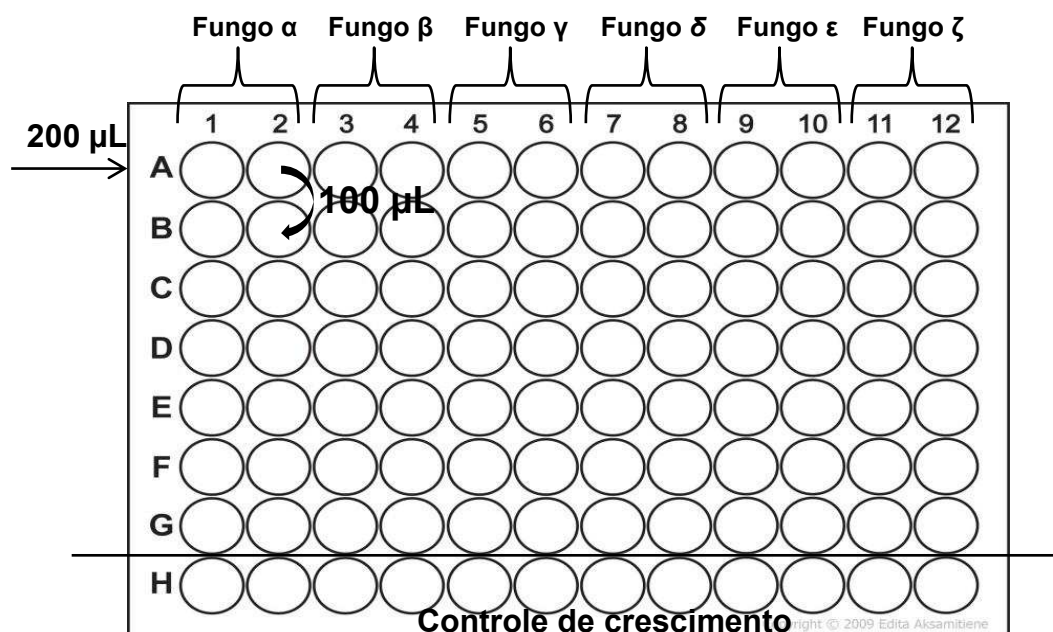


Figura 2.8. Placa de 96 poços utilizada para o ensaio.

As leituras das placas foram realizadas em um leitor de placas VERSA Max (Molecular Devices; Sunnyvale, CA, USA) a 405 nm, depois de 24 horas para *Candida* sp. e 48 horas para *C. neoformans*. Foram obtidos os percentuais de crescimento fúngico do qual foi possível calcular o valor de CIM₅₀ utilizando a curva logística de dose resposta de quatro parâmetros obtida pelo programa SigmaPlot, versão 11 (Systat Software, Inc., San Jose, California, USA), a análise de CIM₅₀ foi realizada somente para as leveduras.

Os valores de CIM foram obtidos por análise visual e posteriormente confirmados retirando-se o material onde supostamente não houve crescimento e analisando o mesmo ao microscópio. Este procedimento foi realizado depois de 24 horas para *Candida* sp., 48 horas para *C. neoformans*, 72 horas para *Aspergillus* sp. e 7 dias para os fungos dermatófitos *T. mentagrophytes*, *M. gypseum* e *T. rubrum*.

1.2.6. Sinergismo e Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF)

Para determinar se ocorreu sinergismo entre os antifúngicos fluconazol, anfotericina e itraconazol com o extrato de *C. rappii* e o ácido fumarprotocetrárico foi adaptado o método de microdiluição em caldo adotado pela CLSI.

Para este método (ZHANG et al., 2007; EID et al., 2012), foram utilizadas as cepas ATCC de *C. albicans* e *C. neoformans*. Para tanto, foram preparadas soluções de trabalho dos antifúngicos, do extrato bruto em etanol (**ECR**) e do ácido fumarprotocetrárico (**5**) de *C. rappii* em concentração quatro vezes maior do que as concentrações máximas finais listadas na **Tabela 2.1** e na **Tabela 2.2**.

Tabela 2.1. Concentração das soluções de trabalho/concentração máxima atingida ao final do teste (µg/mL) dos antifúngicos Itraconazol (**Itra**), Anfotericina (**Anfo**), Fluconazol (**Fluco**) e do ácido fumarprotocetrárico (**4**) utilizados contra as cepas ATCC de *Candida albicans* (**Ca**) e *Cryptococcus neoformans* (**Cn**)

	Itra	Anfo	Fluco	4
Ca	8/2	32/8	512/128	800/200 400/100 100/50
Cn	32/8	32/8	1024/256	800/200 400/100 100/50

Tabela 2.2. Concentração das soluções de trabalho/concentração máxima atingida ao final do teste (µg/mL) dos antifúngicos Itraconazol (**Itra**), Anfotericina (**Anfo**), Fluconazol (**Fluco**) e do extrato bruto em etanol de *Cladonia rappii* (**ECR**) utilizados contra as cepas ATCC de *Candida albicans* (**Ca**) e *Cryptococcus neoformans* (**Cn**)

	Itra	Anfo	Fluco	ECR
Ca	16/4	32/8	512/128	800/200 400/100 100/50
Cn	32/8	32/8	1024/256	800/200 400/100 100/50

Para a montagem do ensaio, a uma placa de 96 poços (**Figura 2.9, pág. 132**) foram adicionados 100 µL de caldo Sabouraud 2x aos poços A12 até H12. Em seguida, foram adicionados aos poços A2->A11 até H2->H11 50,0 µL de meio de cultura Sabouraud 2x.

Adicionaram-se aos poços A1 até H1, 100 µL da solução de trabalho do antifúngico e procedeu-se a diluição seriada, com o auxílio de uma micropipeta multicanal, retirando-se uma alíquota de 50,0 µL de solução dos poços A1->H1 até os poços A11->H11.

Posteriormente, às colunas H, G, F e E foram adicionados 50,0 µL de caldo Sabouraud 2x e às colunas D, C, B e A 50,0 µL da solução do extrato bruto em etanol (**ECR**) ou de ácido fumarprotocetrárico (**4**) na concentração desejada. Às colunas E e A foram adicionados 100 µL de H₂O e em seguida adicionou-se 100 µL do inóculo do fungo de interesse nas colunas H, G, F e D, C, B.

Ao final, a faixa de concentração do antifúngico utilizada (**Tabelas 2.1 e 2.2, pág. 130**), dependendo do ensaio, foi de 2 a $1,95 \times 10^{-3}$ µg/mL ou 4 a $3,9 \times 10^{-3}$ µg/mL ou 8 a $7,8 \times 10^{-3}$ µg/mL ou 128 a 0,0625 µg/mL ou 256 a 0,125 µg/mL.

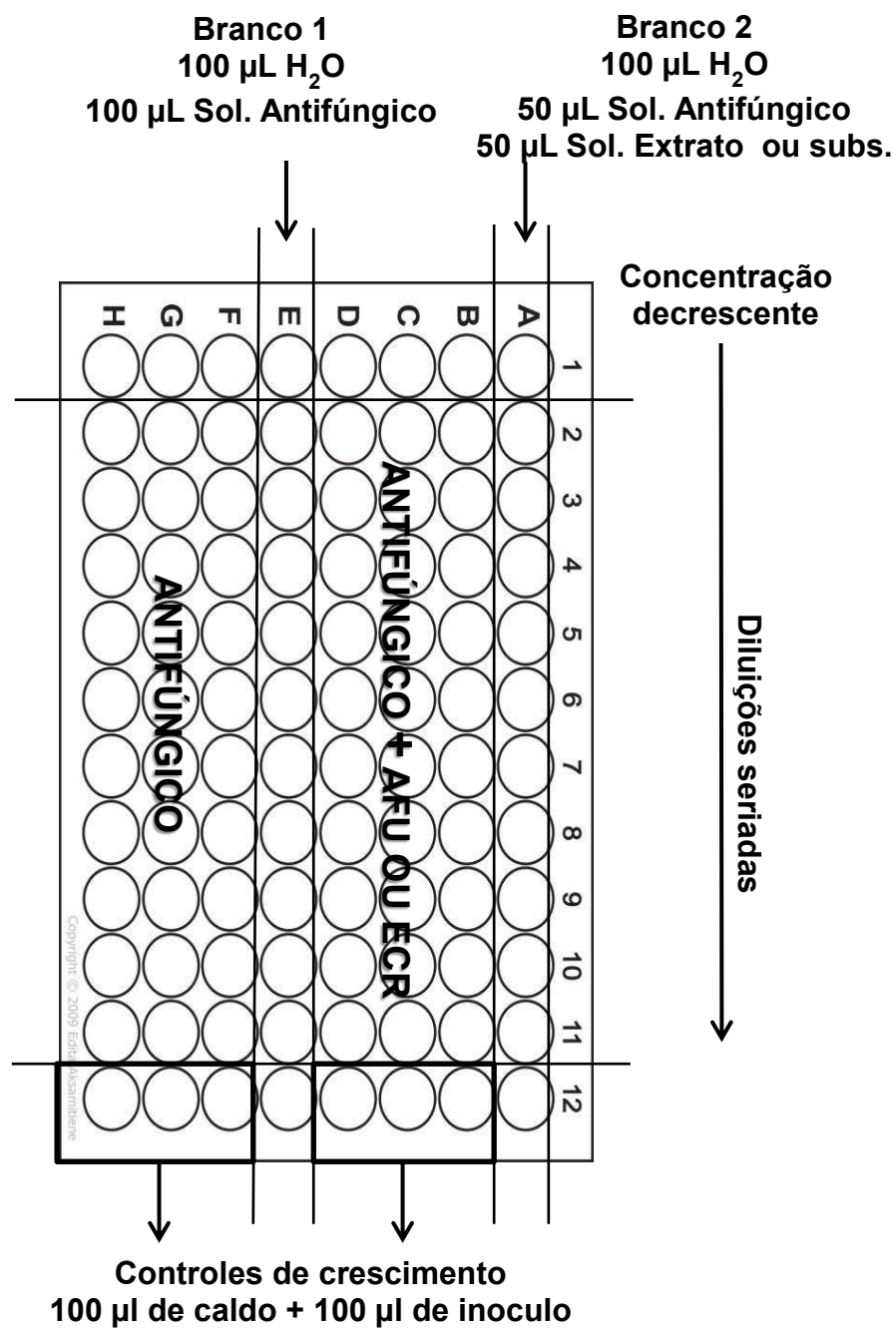


Figura 2.9. Montagem da placa de 96 poços para o ensaio de sinergismo/determinação de ICIF.

O material foi incubado por 24 horas para *C. albicans* e 48 horas para *C. neoformans*. Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram obtidos pela leitura visual das placas. Os valores de CIM₅₀ foram calculados utilizando a curva logística de dose resposta de quatro parâmetros obtida pelo programa SigmaPlot, versão 11 (Systat Software, Inc., San Jose, California, USA), pela leitura das placas em um leitor de placas VERSA Max (Molecular Devices; Sunnyvale, CA, USA) a 405 nm.

O valor do Índice da Concentração Inibitória Fracionária foi obtido pela equação:

$$ICIF = \frac{C_{antifúngico\ 50}}{CIM_{50\ antifúngico}} + \frac{C_{(4)\ ou\ ECR}}{CIM_{50\ (4)\ ou\ ECR}} \quad eq. 2.1.$$

Onde:

$C_{antifúngico50}$ = CIM₅₀ do antifúngico na combinação;

CIM_{50} = CIM₅₀ do antifúngico sozinho;

$C_{(4)\ ou\ ECR}$ = Concentração para **4** e ECR (50, 100 ou 200 µL/mL);

$CIM_{50\ (4)\ ou\ ECR}$ = CIM₅₀ de **4** ou **ECR** sozinhos.

Os valores obtidos pelos cálculos do ICIF foram utilizados para interpretar se ocorreu sinergismo (ICIF ≤ 0,5), aditivismo (ICIF > 0,5-4,0) ou antagonismo (ICIF > 4,0).

1.3. Discussão dos resultados

1.3.1. Método de microdiluição em caldo (CIM e CIM₅₀) e Bioautografia

Um método de referência, como as normas CLSI utilizadas neste trabalho, é um ensaio que foi desenvolvido por meio de processos consensuais entre diversos laboratórios de forma a se obter resultados precisos como no caso da avaliação da sensibilidade de fungos e leveduras aos principais antibióticos. Dessa forma, uma aplicação importante dos métodos de referência é fornecer uma base padrão (um comparativo), a partir da qual outros métodos podem ser desenvolvidos, assim como foi realizado neste trabalho (CLSI, 2008a; CLSI 2008b).

Para os ensaios de microdiluição, são aplicadas duas metodologias distintas, uma com referência à norma M27-A2, para fungos leveduriformes, como *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. e outra, M38-A, para fungos filamentosos como *Aspergillus* spp., *Trichophyton* spp..

A principal diferença entre as metodologias está relacionada à preparação do inóculo. Para os fungos leveduriformes, o inóculo deve ser preparado escolhendo-se colônias de cultura ágar Sabouraud – dextrose de 24 horas para *Candida* spp. ou 48 horas para *C. neoformans*. A suspensão de trabalho para esta metodologia fica na faixa de $5,0 \times 10^2$ – até $2,5 \times 10^3$ células por mL (CLSI, 2008a).

Para os fungos filamentosos deve-se cobrir a colônia com solução salina estéril, para induzir a formação de esporos. Depois de sete dias de incubação, para espécies como *Aspergillus*, se prepara uma suspensão que será filtrada e posteriormente inoculada a uma concentração de trabalho de $0,4 \times 10^5$ a 5×10^4 UFC[†]/mL (CLSI, 2008b).

A diferença no preparo do inóculo para estas metodologias está relacionada à morfologia do fungo. Fungos leveduriformes são unicelulares, de forma arredondada de 4,0-7,0 µm de diâmetro, se reproduzem

[†] Unidade Formadora de Colônia.

assexuadamente por mitose e formação de gemas que dão lugar às células filhas (**Figura 2.10a**). Os fungos filamentosos são pluricelulares, constituídos por estruturas finas e alongadas denominadas hifas, que crescem por alongamento de suas extremidades e a este conjunto de hifas dá-se o nome de micélio (**Figura 2.10b**). A reprodução é assexuada e ocorre pela produção de esporos localizados nas hifas, aos esporos assexuados dá-se o nome de conídios (PRATS, 2013).

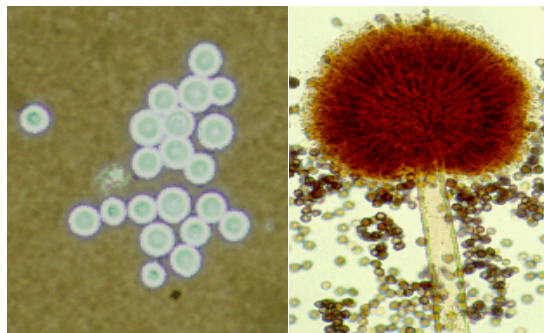


Figura 2.10. a) Células leveduriformes de *C. neoformans* (UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2014a) **b)** Cabeça conidial de *A. niger* na ponta de uma hifa (UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2014b).

Essa diferenciação entre as metodologias é importante, pois devido a estas características, os fungos leveduriformes formam colônias pequenas e lisas, que facilitam a transferência das células para um meio salino e posterior contagem (**Figura 2.11a, pág. 136**).

No caso dos fungos filamentosos, estes formam colônias grandes e possuem um aspecto algodinoso característico e colorido devido à presença dos esporos (**Figura 2.11b, pág. 136**), essa característica reprodutiva (por esporos) dificulta o manuseio e a extração das unidades formadoras de colônia, quando comparada com os fungos leveduriformes.

Além disso, a principal diferença entre estes organismos está na forma de contagem, devido às características morfológicas diferenciadas entre fungos leveduriformes e filamentosos a contagem ocorre em locais distintos em uma câmara de Neubauer, conforme foi visto nas **Figuras 2.4 (pág. 124)** e **2.5 (pág 125)**.

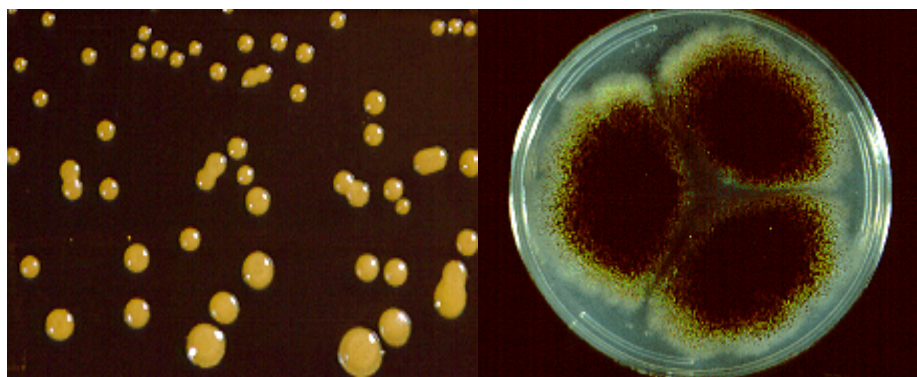


Figura 2.11. a) Cultura de *C. neoformans*, destaque para as colônias pequenas e lisas (UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2014c). **b)** Cultura de *A. niger*, destaque para as colônias algodinosas e com esporos coloridos (UNIVERSITY OF ADELAIDE, 2014d).

Assim, foi realizada uma triagem com os óleos essenciais, extratos, frações e substâncias puras obtidas neste trabalho. Neste primeiro momento foram adquiridos os dados de CIM visual, estes foram suficientes para determinar quais amostras seriam interessantes para dar continuidade aos estudos de atividade antifúngica.

Neste contexto, os organismos utilizados foram as leveduras *Candida albicans* (**cal**), *Candida tropicalis* (**ct**) e *Cryptococcus neoformans* (**cn**), os fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus* (**afu**), *Aspergillus flavus* (**afl**) e *Aspergillus niger* (**ani**) e os dermatófitos *Trychophyton mentragrophytes* (**tm**), *Trychophyton rubrum* (**tr**) e *Microsporum gypseum* (**mg**).

Cada tratamento (extrato, óleo ou substância) foi testado nas concentrações de 15,62; 31,25; 62,5; 125, 250, 500 e 1000 µg/mL. Os tratamentos com MIC's igual ou maiores do que 1000 µg/mL foram considerados inativos e entre 125 e 500 µg/mL, pouco ativos. Extratos e óleos essenciais com MIC's abaixo de 125 µg/mL foram considerados ativos, pois levou-se em consideração o efeito da diluição das substâncias no próprio extrato ou no óleo essencial.

Todos os tratamentos foram inativos para *Aspergillus* spp. e, de uma forma geral, mais ativos para os fungos dermatófitos do que para as leveduras. Os fungos testados foram mais susceptíveis à ação dos óleos essenciais do que dos extratos e das substâncias testadas.

Nas **Tabelas 2.3, 2.4 (pág. 139) e 2.5 (pág. 141)** é possível observar os resultados encontrados nesta triagem.

Para **LTPM** e **LTPG**, os valores de CIM obtidos foram muito similares (**Tabela 2.3**), 250 µg/mL para *C. albicans* e *C. tropicalis* e um resultado interessante de 31,25 µg/mL para os dermatófitos *M. gypseum*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Para *C. neoformans* **LTPM** (62,5 µg/mL) foi um duas vezes mais ativo do que **LTPG** (125 µg/mL).

Tabela 2.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos óleos essenciais, extratos e frações de *Lippia triplinervis* (LT) contra os fungos testados

CÓDIGO	cal	ct	cn	afu	afl	ani	mg	tr	tm
Óleo Essencial									
LTPM	250	250	62.5				31,25	31,25	31,25
LTPG	250	250	125				31,25	31,25	31,25
Extrato bruto em hexano e suas frações									
HLT	250	500	125				62,5	62,5	62,5
HHLT							1000	500	500
HDLT	250	250	250				31,25	31,25	31,25
HALT							1000	1000	1000
HMLT	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Extrato bruto em metanol e suas frações									
MLT							1000	500	500
MHLT	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MDLT	250	500	125				62,5	62,5	62,5
MALT							1000	1000	1000
MMLT							1000	1000	1000
Substâncias									
Timol	125	125	125				15,6	15,6	15,6
Carvacrol	62,5	62,5	125				15,6	15,6	15,6

x = não foi realizado o ensaio. *Candida albicans* (cal), *Candida tropicalis* (ct), *Candida krusei* (ck), *Candida glabrata* (cg), *Candida parapsilosis* (cp), *Cryptococcus neoformans* (cn), *Aspergillus fumigatus* (afu), *Aspergillus flavus* (afl), *Aspergillus niger* (ani), *Trichophyton mentagrophytes* (tm), *Microsporum gypseum* (mg) e *Trichophyton rubrum* (tr).

A inibição do crescimento desses fungos está relacionada com a presença de timol e carvacrol, que são os componentes majoritários em **LTPM** (30,6 e 31,9%) e somente o carvacrol em **LTPG** (46,4%).

Os valores de CIM obtidos para estes dois monoterpenos são bem próximos, aos obtidos nos óleos essenciais. O timol foi um pouco mais ativo para *Candida* spp. (62,5 µg/mL **cal**, 62,5 µg/mL **ct**) do que o carvacrol (125 µg/mL **cal** e **ct**) e ambos foram pouco ativos contra *C. neoformans* (125 µg/mL).

Os extratos e frações de *L. triplinervis*, apresentaram atividade contra as leveduras dermatófitas (**Tabela 2.3, pág. 137**). O extrato bruto em hexano (**HLT**) apresentou CIM de 62,5 µg/mL contra os fungos, *T. mentagrophytes* (**tm**), *M. gypseum* (**mg**) e *T. rubrum* (**tr**), enquanto a fração em diclorometano (**HDLT**) foi mais ativa com valor de CIM=31,25 µg/mL. A fração em diclorometano do extrato metanólico (**MDLT**) também foi considerada ativa com valor de CIM = 62,5 µg/mL para **tm**, **mg** e **tr**.

Como foi possível observar, os valores de CIM para os extratos e frações de *L. triplinervis* são bem próximos aos valores de CIM obtidos para timol e carvacrol e, por isso, a atividade antifúngica está associada à presença destas substâncias. A confirmação da relação entre a atividade antifúngica e a presença de timol e carvacrol ocorreu pela técnica de cromatografia gasosa – espectrometria de massas (**Capítulo 1, págs. 71 a 76**).

A quantificação de timol (**1**) e carvacrol (**2**) nos extratos e frações de **LT** realizada no **Capítulo 1, págs 71 a 76**, por GC-MS confirma a relação entre a maior atividade de **HLT**, **HDLT** e **MDLT** com a maior concentração destas substâncias (timol = 21,6% e carvacrol = 19,0% em **HLT**/ timol = 37,0% e carvacrol = 42,5% em **HDLT** e timol = 28,2% e carvacrol = 28,3% em **MDLT**).

Estes monoterpenos têm sua atividade biológica bem evidenciada, sendo ativos inclusive contra carrapatos (LAGE et al., 2013). O timol já teve sua atividade antifúngica comprovada contra *Candida* spp. (SHRESTHA et al., 2011; FARIAS et al., 2012). Já para *Aspergillus* spp. o timol só apresenta atividade quando utilizada a técnica de avaliação do crescimento radial (*Poison food*) (MAREI et al., 2012; KIM et al., 2010). Para as outras espécies de fungos testadas não foram encontrados trabalhos na literatura que tenham testado a atividade antifúngica do timol.

No caso do carvacrol, a ele foi atribuída a atividade biológica contra *Candida* spp. (FARIAS et al., 2012) e *Aspergillus* spp. (GONÇALVES et al., 2010). Para Gonçalves e colaboradores (2010), a presença de carvacrol no óleo essencial de *Thymus zygis* L. é determinante para a atividade antifúngica contra *C. neoformans*, *Trichophyton* spp. e *Microsporum* spp., no entanto, não foram realizados testes com a substância pura.

Para os terpenos, o mecanismo de ação antifúngica parece envolver mais de um sítio na célula e isso poderia explicar o sucesso desta classe de substâncias como antifúngicos. Monoterpenos como o limoneno podem ocasionar o mau funcionamento mitocondrial, levando a um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), inibição do transporte de elétrons e de ATPases (RAO et al., 2010; HOLM, JÄGER; 2014).

Álcoois terpenóides como o carvacrol, agem rompendo as membranas celulares ou abrindo os canais de transporte de íons e causando um desequilíbrio iônico na célula. Além disto, o carvacrol pode agir também inibindo a regulação da síntese de proteínas e nutrientes (RAO et al., 2010; HOLM, JÄGER; 2014).

Em *Baccharis platypoda* foi possível observar uma diferença significativa na atividade antifúngica entre óleo extraído do Pico do Mamute (BPPM) e o do Pico do Grama (BPPG) (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais, extratos e frações de *Baccharis platypoda* (BP) contra os fungos testados

CÓDIGO	cal	ct	cn	afu	afl	ani	mg	tr	tm
Óleo Essencial									
BP PM			125				1000	500	500
BP PG	250	500	125				31,25	31,25	31,25
Extrato bruto em hexano e suas frações									
HBP							500	500	500
HHBP							1000	500	500
HDBP							1000	1000	1000
HABP							500	500	500
HMBP	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Extrato bruto em metanol e suas frações									
MBP									
MHBP	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MDBP			500				1000	1000	1000

Continuação da **Tabela 2.4**

MABP									
MMBP	x	x	x	x	x	x	x	x	x

x= não foi realizado o ensaio. *Candida albicans* (**cal**), *Candida tropicalis* (**ct**), *Candida krusei* (**ck**), *Candida glabrata* (**cg**), *Candida parapsilosis* (**cp**), *Cryptococcus neoformans* (**cn**), *Aspergillus fumigatus* (**afu**), *Aspergillus flavus* (**afi**), *Aspergillus niger* (**ani**), *Trichophyton mentagrophytes* (**tm**), *Microsporum gypseum* (**mg**) e *Trichophyton rubrum* (**tr**).

Para **cn** ambos os óleos essenciais de *B. platypoda* inibiram a 125 µg/mL, já para os fungos dermatófitos a diferença de inibição é considerável. **BPPM** inibiu em 100% o crescimento das leveduras **mg**, **tr**, **tm** nas concentrações de 100, 500 e 500 µg/mL, respectivamente, enquanto a inibição de **BPPG** para essas leveduras foi muito mais alta, alcançando 31,25 µg/mL para todos.

Uma comparação entre a constituição química dos dois óleos essenciais de *B. platypoda* e a atividade antifúngica de ambos leva a uma discussão interessante. **BPPM** tem como componentes majoritários α -pineno (8,7%), β -felandreno (27,6%) e sabineno (17,6%), enquanto **BPPG** possui α -pineno (12,1%) e sabineno (26,3%) e não há em sua constituição a presença de β -felandreno. Isto indica que a sensibilidade dos fungos testados ao óleo essencial de *B. platypoda* possivelmente se deve à presença de sabineno, que tem ação comprovada contra fungos fitopatogênicos (KOHZAKI et al., 2009).

No entanto, uma pequena concentração de limoneno presente apenas em **BPPG** pode também aumentar a sensibilidade e gerar um efeito sinérgico, já que esse monoterpene é bastante ativo contra fungos (MAREI et al., 2012). Esta é a primeira descrição da atividade antifúngica do óleo essencial de *B. platypoda*. Os extratos e frações obtidos não alcançaram atividade significativa contra os fungos testados.

O óleo de *B. dracunculifolia* (**BD1**) foi ativo somente para *Cryptococcus neoformans* (CIM=62,5 µg/mL) (**Tabela 2.5**). Dentre os constituintes do óleo essencial com potencial atividade antifúngica estão o α -pineno (2,6%), limoneno (6,9%) e o nerolidol (majoritário com 22,3%).

Tabela 2.5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos óleos essenciais, extratos e frações de *Baccharis dracunculifolia* (**BD1**) contra os fungos testados

CÓDIGO	cal	ct	cn	afu	afl	ani	mg	tr	tm
Óleo Essencial									
BD1			62,5				1000	1000	1000
Extrato bruto em etanol e suas frações									
EBD1									
EHBD1									
EDBD1									
EABD1							500	500	500
EMBD1									

Candida albicans (**cal**), *Candida tropicalis* (**ct**), *Candida krusei* (**ck**), *Candida glabrata* (**cg**), *Candida parapsilosis* (**cp**), *Cryptococcus neoformans* (**cn**), *Aspergillus fumigatus* (**afu**), *Aspergillus flavus* (**afl**), *Aspergillus niger* (**ani**), *Trichophyton mentagrophytes* (**tm**), *Microsporum gypseum* (**mg**) e *Trichophyton rubrum* (**tr**).

O α -pineno teve sua atividade comprovada contra *Candida* spp., *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* (AL-JA'FARI et al., 2011). Marei e colaboradores (2012) destacam a sensibilidade de diversos fungos ao limoneno e o consideram como um dos monoterpenos mais ativos, junto com o timol. Park e colaboradores (2009) observaram mudanças morfológicas no fungo *T. mentagrophytes* quando tratado com nerolidol, que inibiu o crescimento hifal deste fungo. Dessa forma, a atividade de **BD1** pode ser atribuída a um efeito sinérgico entre estes três constituintes.

No caso dos líquens, diversos estudos (LAUTERWEIN et al., 1995; INGÓLFSDÓTTIR et al., 1998; HONDA et al., 2010; GUPTA et al., 2012) vem apontando as substâncias derivadas de líquens como promissores agente antimicrobianos. No entanto, o (-)-(S)-ácido úsnico (**3**) e o ácido fumarprotocetrárico (**4**) isolados de *C. rappii* não apresentaram atividade antifúngica pelo screening realizado através do teste de microdiluição em caldo (**Tabela 2.6, pág. 142**).

Tabela 2.6. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos extratos, frações e substâncias de *Cladonia rappii* (CR) contra os fungos testados

CÓDIGO	cal	ct	cn	afu	afl	ani	mg	tr	tm
Extrato bruto em etanol e suas frações									
ECR							1000	1000	1000
EHCR							1000	1000	1000
EDCR	x	x	x	x	x	x	x	x	x
EACR							1000	1000	1000
EMCR									
Substâncias									
4									
5									

x = não foi realizado o ensaio. *Candida albicans* (cal), *Candida tropicalis* (ct), *Candida krusei* (ck), *Candida glabrata* (cg), *Candida parapsilosis* (cp), *Cryptococcus neoformans* (cn), *Aspergillus fumigatus* (afu), *Aspergillus flavus* (afl), *Aspergillus niger* (ani), *Trychophyton mentagrophytes* (tm), *Microsporum gypseum* (mg) e *Trichophyton rubrum* (tr).

A ausência de atividade antifúngica para **3** e **4** foi um tanto inesperada, uma vez que já foram encontrados trabalhos na literatura descrevendo este tipo de atividade para estas substâncias (YILMAZ et al., 2004). Para se certificar que estas substâncias realmente não eram ativas, frente as cepas testadas, foi utilizada outra metodologia para avaliar a atividade antifúngica conhecida como Bioautografia.

A utilização da metodologia de Bioautografia permite avaliar a atividade das substâncias diretamente sobre o fungo, o que conduz a uma rápida avaliação das substâncias ativas em uma mistura complexa como o extrato do líquen (RAMALLO et al., 2006).

Neste método as substâncias são aplicadas em placas de CCD e sobre elas é adicionada uma dispersão de fungos, com concentração conhecida. A placa com os fungos é incubada e ao final, adiciona-se MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) sobre a placa para avaliar a inibição do fungo (LOPEZ et al., 2007).

A viabilidade das células dos fungos é quantificada pela redução do MTT (amarelo) a formazana (roxo) (**Figura 2.12**) pelas atividades de desidrogenases mitocondriais, isto quer dizer que quando ocorre a morte das células do fungo essas atividades cessam e o MTT não é reduzido, indicando que houve atividade contra o organismo testado (MOSMANN, 1983).

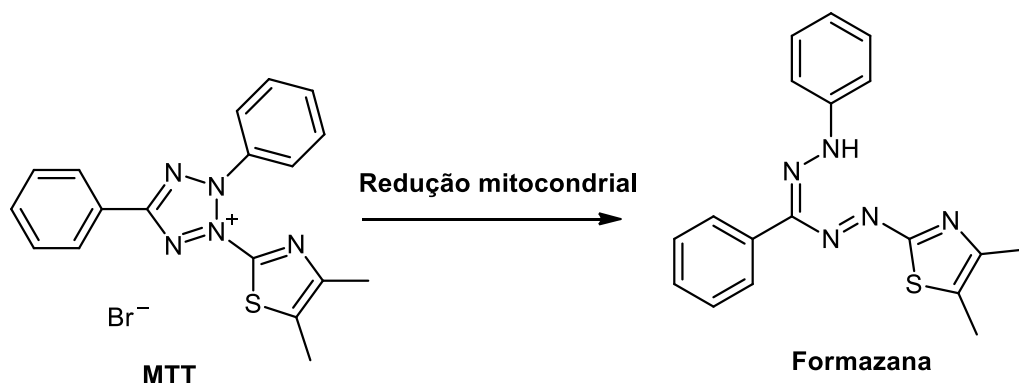


Figura 2.12. Redução de MTT a formazana pelos processos mitocondriais.

Ao utilizar esta metodologia foi possível observar que **3** e **4** eram ativos contra *C. neoformans*, bem como o extrato bruto de **CR**. Nas placas é possível ver que o local onde foram aplicadas as substâncias e o extrato, não ocorre a redução do MTT e, portanto, houve inibição da atividade fúngica (**Figura 2.13, pág. 144**). Esta metodologia tem a vantagem de ser mais sensível do que as demais e permite avaliar qualitativamente se uma substância possui ou não atividade antifúngica (HADACEK, GREGER; 2000).

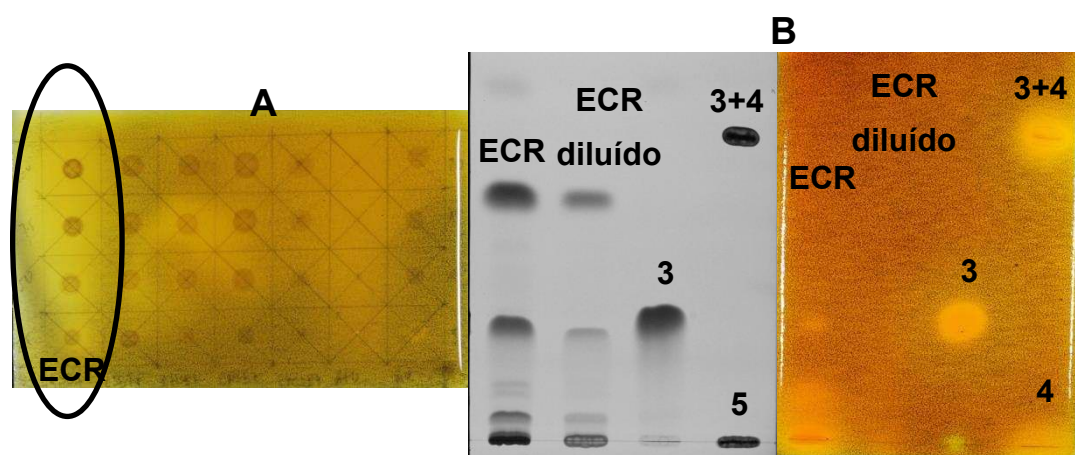


Figura 2.13. A) Bioautografia direta sem desenvolvimento de **ECR** nas concentrações de 25, 50, 75 e 100 µg/mL (de baixo para cima). B) Bioautografia direta com desenvolvimento da placa para o extrato bruto (**ECR**), o extrato bruto diluído, **3**, **4** e após o desenvolvimento cromatográfico foi realizada uma co-aplicação entre **3** e **4**.

Assim, outro *screening* utilizando a metodologia de microdiluição em caldo, foi realizado, desta vez contra as leveduras *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. neoformans*. A inibição do crescimento das leveduras foi lida mais uma vez utilizando o leitor de placas e dos resultados obtidos foram traçadas as curvas de inibição dose-resposta para cada tratamento.

O software SIGMAPLOT, versão 11, foi utilizado para analisar os dados obtidos. Por este programa foi possível traçar as curvas de dose-resposta para a inibição do crescimento das leveduras frente ao extrato etanólico de *C. rappii*, suas respectivas frações, o ácido úsnico (**3**) e o fumarprotocetrárico (**4**). Como exemplo pode-se observar a curva de dose-resposta para **ECR** contra *C. albicans* (**Figura 2.14, pág. 145**). Destas curvas de dose-resposta foram obtidos os valores de CIM₅₀ para todos os extratos e frações testados (**Tabela 2.7, pág. 145**).

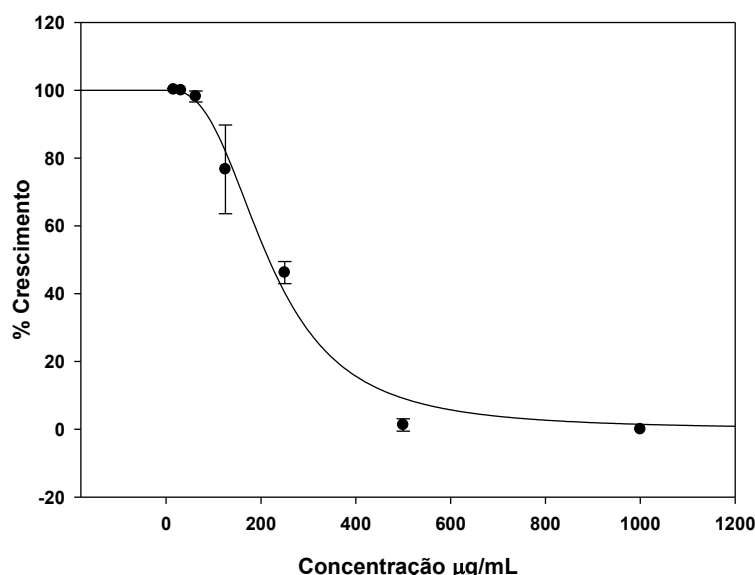


Figura 2.14. Curva de dose-resposta obtida para realizar o cálculo do valor de IC₅₀ para **ECR** contra o fungo *Candida albicans* (**cal**). IC₅₀ = 217 µg/mL.

Tabela 2.7. Valores de CIM₅₀ (µg/mL) dos extratos, frações e substâncias de *Cladonia rappii* (**CR**) contra as leveduras testadas

CÓDIGO	ck	ct	cg	cal	cn
Extrato e frações					
ECR	509	382	627	217	72
EHCR	679	664	806	596	328
EACR	555	513	338	285	x
EMCR	707	726	906	285	x
Substâncias					
3	580	675	865	578	610
4	321	488	433	427	466

x = não foi possível calcular o valor de CIM₅₀. *Candida krusei* (**ck**), *Candida tropicalis* (**ct**), *Candida glabrata* (**cg**), *Candida albicans* (**cal**), *Cryptococcus neoformans* (**cn**).

Por esta metodologia avaliou-se com maior precisão a atividade do extrato, frações e das substâncias isoladas de **CR**. Observou-se que o extrato bruto foi mais ativo contra *C. neoformans* (CIM₅₀ = 72) e *C. albicans* (CIM₅₀ = 217 µg/mL). O composto **4** foi mais ativo (com valores de CIM₅₀ entre 321 e 488 µg/mL) do que o composto **3**, (com valores de CIM₅₀ entre 578 e 865 µg/mL).

A baixa atividade de **3**, observada nos testes de microdiluição em caldo, está relacionada com a sua baixa solubilidade no solvente utilizado para a realização do teste (DMSO). De fato, constatou-se a precipitação de grande parte de **3** e assim, outros solventes foram testados, mas infelizmente não foi possível utilizá-los devido a alta toxicidade dos mesmos contra as leveduras.

1.3.2. Sinergismo e Índice da Concentração Inibitória Fracionária (ICIF)

Para realizar os testes de sinergismo foram utilizados as leveduras *C. neoformans* e *C. albicans*, os antifúngicos anfotericina (**anfo**), fluconazol (**fluco**) e itraconazol (**itra**) o extrato bruto de *C. rappii* (**ECR**) e o ácido fumarprotocetrárico (**4**).

Os dados de CIM e CIM₅₀ obtidos permitiram calcular os valores da Concentração Inibitória Fracionaria (ICIFI) e assim avaliar o efeito de combinação entre estes antibióticos e **ECR** e **4**. Os valores de CIM foram obtidos pela análise visual da placa (**Figura 2.15**), enquanto os valores para CIM₅₀ foram obtidos das curvas de dose-resposta.

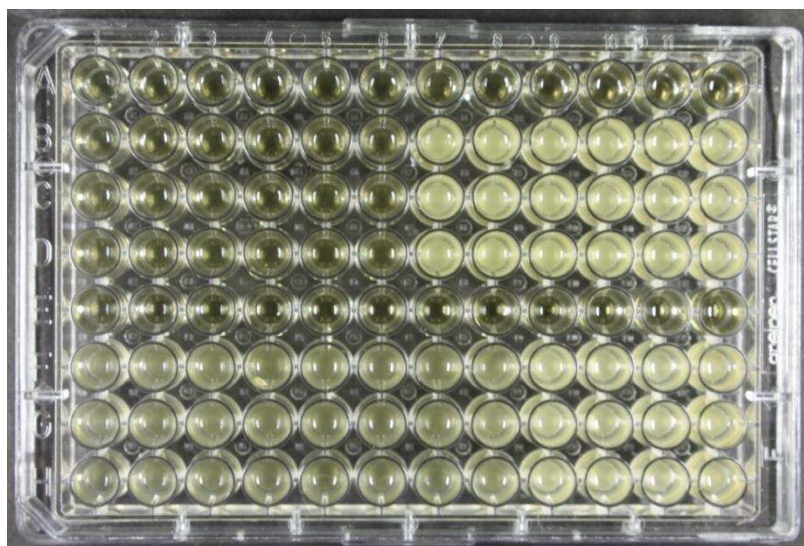


Figura 2.15. Placa de 96 poços utilizada para análise dos efeitos de combinação entre os antifúngicos e **4** e **ECR**. Placa de *C. albicans* x fluco + ECR100.

Os valores de ICIF encontrados através da equação 2.1. foram utilizados para interpretar se ocorreu sinergismo ($ICIF \leq 0,5$), aditivismo (sem interação) ($ICIF > 0,5-4,0$) ou antagonismo ($ICIF > 4,0$) (ODDS, 2003).

$$ICIF = \frac{C_{antifúngico\ 50}}{CIM_{50\ antifúngico}} + \frac{C_{(4)\ ou\ ECR}}{CIM_{50\ (4)\ ou\ ECR}} \quad eq. 2.1.$$

Primeiramente foram realizados ensaios para *C. neoformans* e os antifúngicos em combinação com **ECR** em três concentrações (50,0; 100 e 200 µg/mL).

Os valores de CIM foram, mais altos para as combinações (1,0 µg/mL – **anfo+ECR50** e 4,0 µg/mL – **anfo + ECR100** e **anfo+ECR200**) do que para anfotericina pura (0,25 µg/mL). O mesmo foi observado para os valores de CIM₅₀, sendo **Anfo+ECR50** aditivos e **anfo+ECR100** antagonistas.

A combinação entre **anfo+ECR200** não alcançou um valor de CIM₅₀ e dessa forma não foi possível calcular o valor de ICIF e obter a inibição fracionária. Os testes realizados com fluconazol não puderam ser analisados devido à contaminação das placas, mas foi possível realizar a análise de CIM, que é determinada visualmente, e por ela pôde-se concluir que os efeitos de aditivismo e antagonismo apresentados pela combinação de **ECR** e dos demais antifúngicos também poderia ser observado para o fluconazol (**Tabela 2.8, pág. 148**).

Tabela 2.8. Valores de CIM₅₀ da curva de dose-resposta obtida para cada tratamento. Valores de ICIF calculados com base nos dados adquiridos no ensaio de combinação entre os antifúngicos e **ECR** contra *C. neoformans*

Tratamento	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	ICIF
ECR	72	250	
Anfo	0,12	0,25	
Anfo + ECR50	0,13	1,0	1,77
Anfo + ECR100	0,42	4,0	>4,0
Anfo + ECR200	-	4,0	>4,0
Itra	0,26	1,0	
Itra + ECR50	1,47	4,0	>4,0
Itra + ECR100	Na	8,0	-
Itra + ECR200	Na	8,0	-
Fluco	*	16,0	*
Fluco + ECR50	*	16,0	*
Fluco + ECR100	*	8,0	*
Fluco + ECR200	*	4,0	*

Na = Não alcançou o valor de CIM₅₀

* = Contaminado

O ácido fumarprotocetrárico (**4**) também não apresentou efeito sinérgico com os antifúngicos nas combinações testadas. Embora os valores de ICIF sejam menores do que os alcançados pela combinação do extrato bruto **ECR** com os antifúngicos, todas as combinações testadas foram aditivas, com exceção da combinação entre **anfo+ (4) 200** que foi antagônica (**Tabela 2.9, pág. 149**).

Tabela 2.9. Valores de CIM₅₀ da curva de dose-resposta obtida para cada tratamento. Valores de ICIF calculados com base nos dados adquiridos no ensaio de combinação entre os antifúngicos e 4 contra *C. neoformans*

Tratamento	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	ICIF
(4)	466	1000	
Anfo	0,05	0,25	
Anfo + (4) 50	0,19	0,50	3,6
Anfo + (4) 100	0,16	0,50	3,1
Anfo + (4) 200	0,24	1,00	4,9
Itra	0,22	0,50	
Itra + (4) 50	0,25	0,50	1,24
Itra + (4) 100	0,24	0,5	1,32
Itra + (4) 200	0,23	0,50	1,48
Fluco	*	16,0	
Fluco + (4) 50	*	16,0	*
Fluco + (4) 100	*	32,0	*
Fluco + (4) 200	*	32,0	*

* = Contaminado

Para *C. albicans* os efeitos de combinação não foram avaliados para anfotericina e itraconazol, pois não inibiram o crescimento da levedura, bem como suas combinações. Isto ocorreu provavelmente por um problema durante a diluição dos padrões dos antifúngicos para a realização deste teste. Estes testes serão repetidos posteriormente.

No entanto, a combinação de fluconazol com **ECR** gerou um resultado interessante. Os valores de CIM das combinações (4,0 µg/mL) foram muito mais baixos do que o valor de CIM encontrado para fluconazol (128 µg/mL), sendo a combinação muito mais ativa do que o antifúngico sozinho.

No entanto, os valores de ICIF obtidos da interação do fluconazol com **ECR** nas concentrações de 50,0; 100 e 200 µg/mL (2,78; 3,42 e 3,36 µg/mL; respectivamente) indicaram que ocorria apenas aditivismo (**Tabela 2.10, pág. 150**).

Tabela 2.10. Valores de CIM₅₀ da curva de dose-resposta obtida para cada tratamento. Valores de ICIF calculados com base nos dados adquiridos no ensaio de combinação entre os antifúngicos e **ECR** contra *C. albicans*

Tratamento	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	ICIF
ECR	217		
Anfo	Na	Ni	Ni
Anfo + ECR50	Na	Ni	Ni
Anfo + ECR100	Na	Ni	Ni
Anfo + ECR200	Na	Ni	Ni
Itra	Na	Ni	Ni
Itra + ECR50	Na	Ni	Ni
Itra + ECR100	Na	Ni	Ni
Itra + ECR200	Na	Ni	Ni
Fluco	0,97	128	
Fluco + ECR50	2,47	4	2,78
Fluco + ECR100	2,87	4	3,42
Fluco + ECR200	2,36	4	3,36

Ni = Não inibiu o crescimento do fungo.

Os resultados pareciam contraditórios até o momento em que foram analisadas as curvas de dose-resposta (**Figura 2.16, pág. 151**). Nelas foi possível observar que embora mais ativas, as combinações só inibiam o crescimento do fungo nas concentrações mais altas, enquanto o antifúngico, diferentemente das combinações, inibia também nas concentrações mais baixas. Isto faz com que o valor de CIM₅₀ para fluconazol seja menor do que os valores encontrados para as combinações, como visto na **Tabela 2.10**.

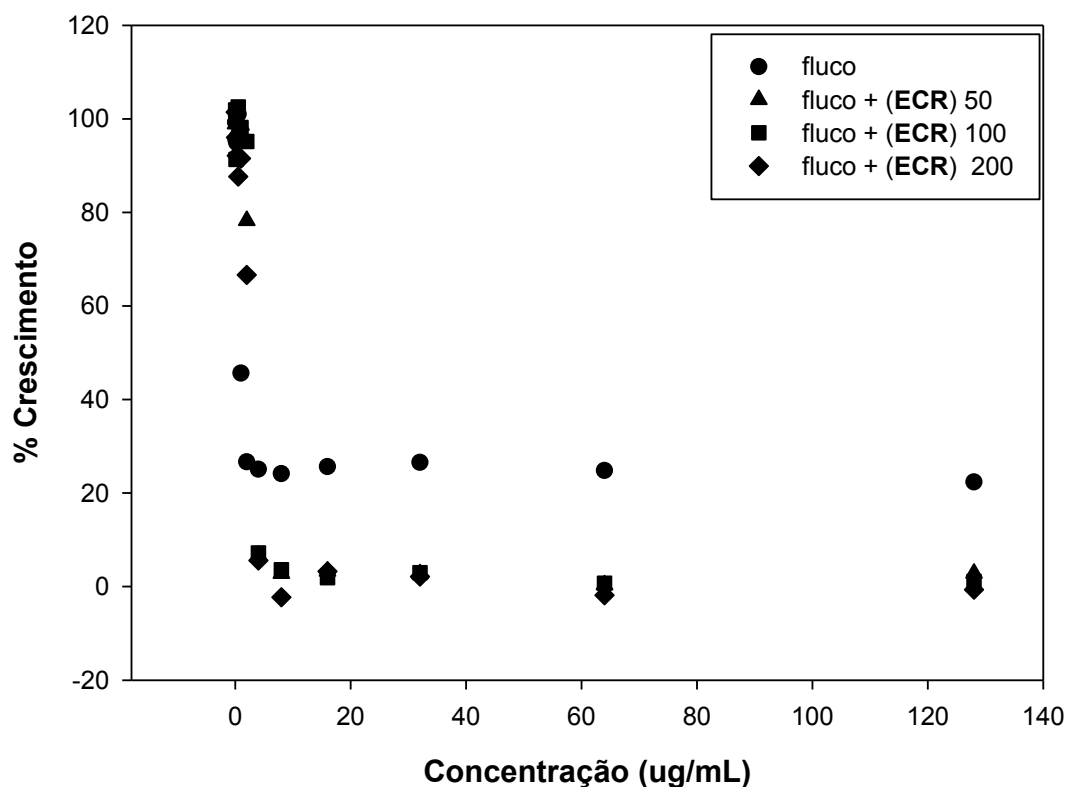


Figura 2.16. Curvas de dose-resposta para o ensaio de combinação entre fluconazol e **ECR** contra *C. albicans*.

As combinações entre os antifúngicos e **4** foram todas aditivas, sendo observado que os valores de CIM entre itraconazol e as combinações foram iguais ao valor do antifúngico. O fluconazol é um fungicida fungistático e por isso não inibe completamente o crescimento do fungo e assim muitas vezes os valores de CIM obtidos para esta droga se referem a CIM₈₀ (JOHNSON, KAUFFMAN; 2003). De toda forma isto não impede de se calcular os valores de CIM₅₀ (**Tabela 2.11, pág. 152**).

Tabela 2.11. Valores de CIM₅₀ da curva de dose-resposta obtida para cada tratamento. Valores de ICIF calculados com base nos dados adquiridos no ensaio de combinação entre os antifúngicos e 4 contra *C. albicans*

Tratamento	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM (µg/mL)	ICIF
(4)	427	1000	
Anfo	0,12	0,25	
Anfo + (4) 50	0,17	0,50	1,54
Anfo + (4) 100	0,26	0,50	2,44
Anfo + (4) 200	0,38	1,00	3,63
Itra	0,52	1,00	
Itra + (4) 50	0,70	1,00	1,45
Itra + (4) 100	0,47	1,00	1,14
Itra + (4) 200	0,89	1,00	2,17
Fluco	0,93	Ni	
Fluco + (4) 50	0,84	Ni	1,01
Fluco + (4) 100	1,04	Ni	1,34
Fluco + (4) 200	0,85	Ni	1,37

Ni = Não inibiu o crescimento do fungo (CIM₈₀).

Embora os resultados tenham mostrado que o efeito da combinação entre o extrato bruto em etanol de *C. rappii*, o ácido fumarprotocetrárico e os antifúngicos comerciais tenham sido antagonistas ou aditivistas, foi possível observar que o valor de CIM para o antifúngico fluconazol foi reduzido drasticamente quando utilizado em combinação com o extrato bruto em etanol de *C. rappii* (de 128,0 µg/mL para 4,0 µg/mL) em todas as concentrações testadas.

Este resultado é importante, pois, embora o fluconazol seja um antifúngico recente (foi descoberto nos anos 1990), já foi observado o efeito de resistência em pacientes que recebem tratamento com este medicamento por um período prolongado de tempo (JOHNSON, KAUFFMAN; 2003). Neste contexto, a redução do valor da Concentração Inibitória Mínima do fluconazol utilizando o extrato de *C. rappii* indica que a toxicidade da combinação foi maior do que a droga pura e assim o efeito de resistência poderia ser atenuado.

2. Avaliação da Atividade Antifúngica contra Fungos Fitopatogênicos

2.1. Introdução

O sucesso das civilizações sempre esteve associado ao desenvolvimento da agricultura. No entanto, as doenças de plantas, principalmente as causadas por fungos, sempre foram um problema para a humanidade desde que os primeiros seres humanos deixaram de ser nômades e se fixaram em um único local, passando a cultivar seu próprio alimento (DEISING et al., 2008).

Os fungos são organismos eucariontes que pertencem ao reino Fungi. Eles se alimentam secretando enzimas decompositoras sobre a fonte de alimento e então absorvem as pequenas moléculas que são produzidas pela quebra enzimática. Por esta característica são classificados como organismos heterotróficos, sendo um dos principais decompositores da biosfera, decompondo a matéria orgânica, reciclando o carbono, nitrogênio e outros componentes (CARLILE, 2006).

Como são organismos decompositores, a maioria dos fungos vive sobre a matéria orgânica, ou seja, é uma espécie sapróbia. Por esse motivo entram em conflito direto com os interesses do homem, atacando a produção de alimentos e sendo o principal agente causador de doenças em plantas. Estima-se que mais de 5.000 espécies atacam culturas de alto valor econômico, bem como plantas ornamentais e nativas (RAVEN et al., 2001).

Na América do Sul, os patógenos de plantas são a principal causa de perdas econômicas das lavouras, superando os insetos e as plantas daninhas (KIMATI et al., 1995). Doenças causadas por fungos são de ocorrência mundial, a antracnose e o mofo cinzento estão entre as principais, e causam sérias perdas em diversas culturas de importância econômica, podendo ser consideradas as infecções fúngicas mais abrangentes, que atacam as mais diversas culturas (PERES et al., 2005; WILLIAMSON et al., 2007; ADONGO et al., 2012; DAMM et al., 2012).

Na **Tabela 2.12, (pág. 155)** estão sumarizados dados que mostram a importância e o impacto que fungos patógenos de plantas têm sobre os diversos cultivares brasileiros.

Tabela 2.12. Principais fitopatógenos encontrados no Brasil, doenças que causam, sintomas e perdas nos diversos cultivares brasileiros. (BAIBI-PENIA et al., 2006; OLIVEIRA, 2007; POZZA et al., 2001; KIMATI et al., 2005; GRIFFITHS et al., 1971; MARIN et al., 2003; COSTA, 2002; ALVES; DEL PONTE, 2009; FUGUEIRA et al., 2003; TATAGIBA et al., 2002; ZAMBOLIM et al., 2007; ROBERTSON, 2005; KRCMERY et al., 1997; WILLIAMSON et al., 2007).

Fungo	Doença	Cultura	Sintomas	Perdas
<i>Alternaria solani</i>	Pinta preta	Tomate e batata	Redução da área foliar, queda do vigor, depreciação dos frutos ou tubérculos. Incide sobre folhas, hastes, pecíolos e frutos.	Até 50%
<i>Cercospora coffeicola</i>	Cercosporiose	Café	Intensa desfolha da planta.	Até 30%
<i>Colletotrichum kawahae</i>	Antracnose	Café	Nas flores: mancha marrom escura sobre o tecido branco da pétala. Nos frutos, manchas necróticas, escuras. Nas folhas manchas necróticas cinzas.	Até 75%
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	Antracnose	Feijão	Lesões nos tecidos dos Cotilédones.	Até 100%
<i>Fusarium moniliforme</i>	Podridão rosada	Milho	Uma massa cotonosa avermelhada recobre os grãos infectados ou a palha atingida. Pode haver o aparecimento de estrias brancas no pericarpo dos grãos. É possível observar a presença de um micélio branco em estágios avançados da doença. Muitos grãos, aparentemente sadios, podem conter o patógeno em seu interior.	*
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Colletotrichum acutatum</i>	Antracnose	Mamão, banana, melancia, uva e manga	Lesões nos frutos e manchas escuras nas folhas	Até 91%
<i>Hemileia vastatrix</i>	Ferrugem	Café	Manchas na face inferior das folhas de coloração amarela, formação de pústulas com posterior desfolha.	Até 35%
<i>Fusarium solani</i>	Morte súbita	Batata, soja	Clorose e necrose das folhas afetadas	*
<i>Aspergillus flavus</i>	Podridão	Milho, amendoim, algodão	Apodrecimento e formação de massa cotonosa verde sobre os grãos	*
<i>Botrytis cinerea</i>	Mofo cinzento	Mais de 200 culturas	Apodrecimento completo e formação de uma massa cotonosa cinza.	#

*Não determinado. A infecção nas plantas produz efeitos danosos à saúde humana. # Devido a grande variedade de alvos, não pôde ser determinado.

Fungos do gênero *Colletotrichum* são considerados os maiores patógenos de plantas em todo o mundo. Eles causam significativas perdas econômicas a culturas tropicais, subtropicais e em regiões temperadas (BAILEY; JEGER, 1992; PERES et al., 2005). No mamoeiro, por exemplo, a antracnose, em épocas chuvosas, pode reduzir a produção em até 80% (ZAMBOLIM et al., 2008).

A antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds (**Figura 2.17**) é capaz de infectar diversos órgãos da planta. Originalmente foi descrita como uma doença dos tecidos de frutas como o mamão e a pimenta na Austrália, além disso, já foram relatados também casos de infecções por este patógeno a tartarugas marinhas e insetos (DAMM et al., 2012).

No Brasil este fungo é considerado um dos principais fitopatógenos devido à ampla gama de hospedeiros e a extensão das perdas causadas (PERES et al., 2005; KIMATI et al., 2005; NAKAUNE; NAKANO, 2007).

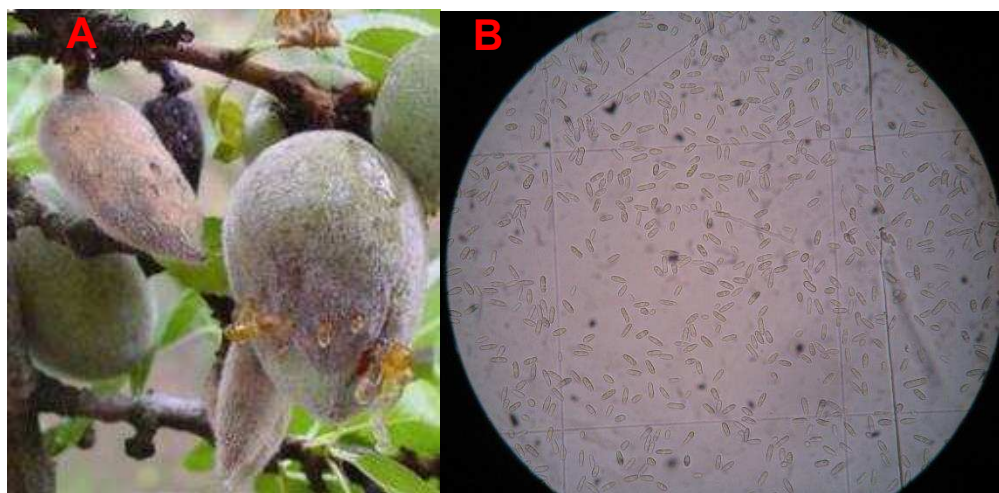


Foto: (B) LAGE, 2011a

Figura 2.17. (A) Sintomas típicos de antracnose em amêndoas, onde é possível observar um fruto menor coberto por esporos do fungo e uma lesão circular na parte superior do fruto maior (PERES et al., 2005). (B) Conídios de *C. acutatum*.

O mofo cinzento é causado pelo fungo *Botrytis cinerea* Pers: Fr. (**Figura 2.18**) que gera perdas em diversas culturas de frutas, hortaliças, plantas ornamentais, além de perdas pós-colheita, atacando mais de 200 tipos de plantações ao redor do mundo (BOUCHRA et al., 2003; DAFERERA et al., 2003; COMBRICK et al., 2011; ELAD, 1997). Além disso, a infecção causada por *B. cinerea* é extremamente difícil de controlar, devido a grande quantidade de hospedeiros disponíveis. Outra característica que dificulta o seu controle é a sua capacidade de sobrevivência como escleródios, conídios ou mesmo micélio em restos da plantação (WILLIAMSON et al., 2007).

Os sintomas causados pelo mofo cinzento são o amolecimento das raízes, acompanhado do colapso e imersão em água dos tecidos do parênquima, sendo o aparecimento de massa cotonosa cinzenta sobre a planta o sintoma mais típico da infecção por *B. cinerea* (**Figura 2.18**). Devido ao grande impacto que este fungo causa às lavouras de todo o mundo, esta espécie se tornou o patógeno necrotrófico mais extensivamente estudado (WILLIAMSON et al., 2007).

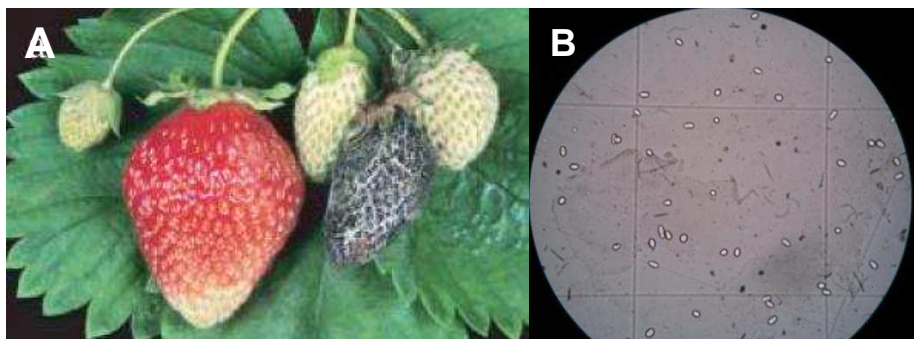


Foto: (B) LAGE, 2011b

Figura 2.18. (A) Morango infectado por *B. cinerea* sobre morangos, principal sintoma da doença conhecida como mofo cinzento (WILLIAMSON et al., 2007). (B) Conídios de *B. cinerea*.

O controle de doenças fúngicas em plantas tem sido uma preocupação constante na agricultura e um desafio a produtores e pesquisadores. Para controlar estas doenças são necessárias diversas aplicações de fungicidas ao longo do ciclo da cultura, o que pode levar a contaminação ambiental, de aplicadores e consumidores.

Além disso, nas últimas décadas têm ocorrido inúmeros casos de desenvolvimento de resistências dos patógenos de plantas aos fungicidas (**Tabela 2.13**) e novos olhares têm sido lançados sobre a busca por antifúngicos naturais (DEISING et al., 2008; DAYAN et al., 2009).

Tabela 2.13. Ocorrência de resistência contra fungicidas (DEISING et al., 2008)

Classe	Núm. de sítios alvo	Ano de resistência	Anos até resistência	Patógeno
Organomercuriais	Muitos	1964	40	<i>P. avenae</i>
Benzimidazois	1	1970	2	<i>V. inaequalis</i>
Fenilamidas	1	1980	2	<i>P. infestans</i>
Dicarboximidas	1	1982	5	<i>B. cinerea</i>
DIMs	1	1982	4	<i>B. graminis</i>
Carboxanilideos	1	1986	14	<i>U. nuda</i>
Morfolinos	2	1994	34	<i>B. cinerea</i>
Estrobilurinas	1	1998	2	<i>B. cinerea</i>

De toda forma, o uso de agroquímicos para a proteção das lavouras é fundamental, eles desempenham um papel importante na agricultura moderna aumentando a qualidade dos cultivares e o rendimento por hectare, além de reduzir os custos de produção (GUAN et al., 2014). No mercado existem diversos tipos de fungicidas, sendo os mais utilizados: enxofre inorgânico, ditiocarbamatos, azois, organofosforados, compostos de cobre, estrobilurinas, morfolidinas, amidas e compostos aromáticos (**Figura 2.19, pág. 159**) (EUROSTAT, 2007; NASIR et al., 2014).

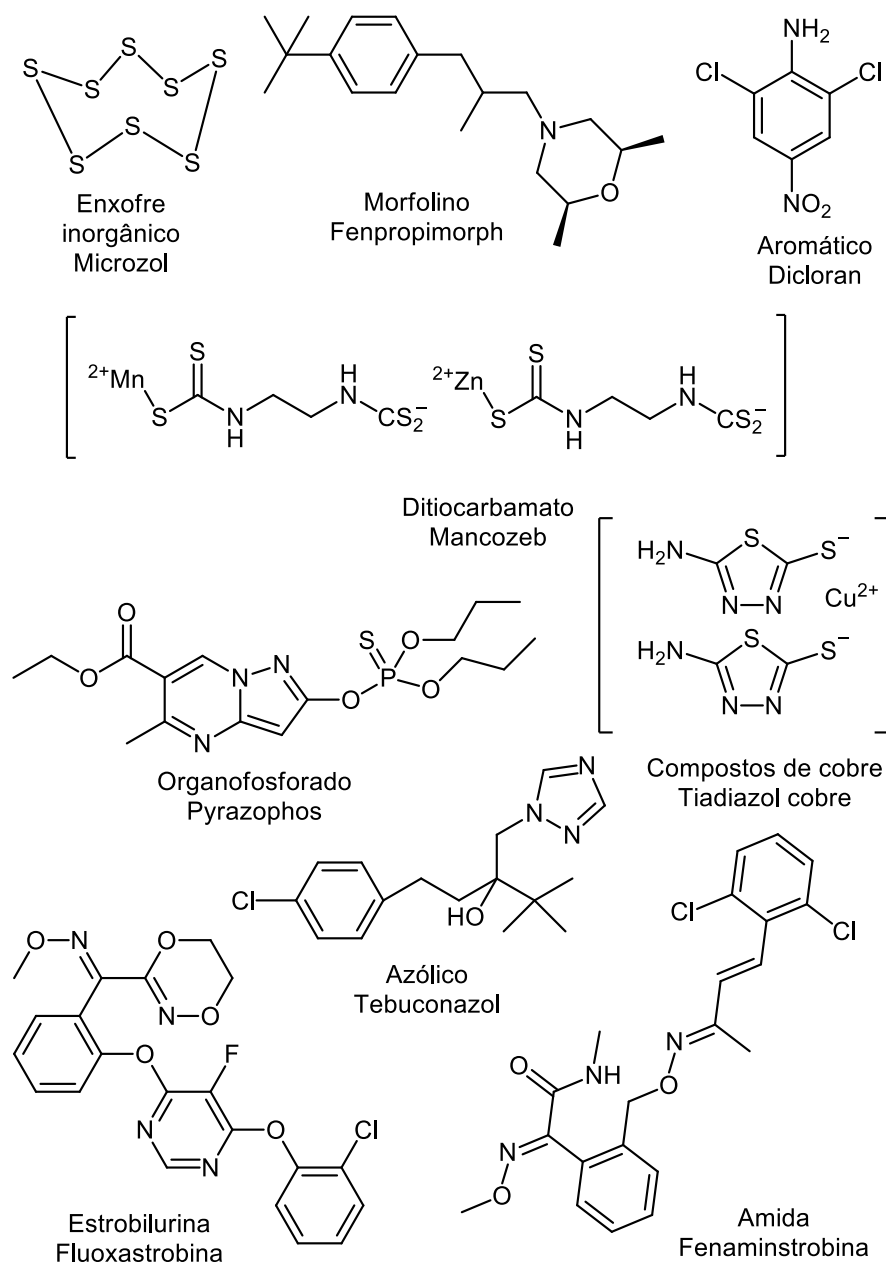


Figura 2.19. Principais classes de fungicidas.

Neste contexto, é extremamente importante buscar novas substâncias antifúngicas com novos modos de ação e que sejam menos tóxicas ao homem e ao meio ambiente, dessa forma é possível reduzir a incidência de resistência. Assim, a pesquisa por antifúngicos naturais ou derivados de produtos naturais se mostra uma das alternativas mais viáveis (DAYAN et al., 2009; GUAN et al., 2014).

2.2. Materiais e Métodos

Os testes de atividade antifúngica contra os fungos fitopatogênicos foram realizados no Laboratório de Proteção de Plantas – UFV, sob supervisão do Professor Dr. Laercio Zambolim.

2.2.1. Fungos avaliados

Isolados de *B. cinerea* e *C. acutatum* foram obtidos a partir de frutos de morango (*Fragaria* x *Ananassa*) infectados e identificados pelo grupo do Professor Dr. Laercio Zambolim.

2.2.2. Preparo do meio de cultura para repicagem dos fungos

Em um erlenmeyer de 250,0 mL foram medidos 2,93 g de BDA (Batata-dextrose-ágar). Em seguida foram adicionados 75,0 mL de água destilada. O erlenmeyer foi vedado com uma rolha de algodão e levado para esterilização em autoclave. Após este procedimento o material foi armazenado em um armário até o momento de sua utilização.

2.2.3. Preparo do meio de cultura para o teste de atividade antifúngica

Em um erlenmeyer de 150,0 mL foram medidos 0,975 g de BDA (Batata-dextrose-ágar). Em seguida foram adicionados 25,0 mL de água destilada. O erlenmeyer foi vedado com uma rolha de algodão e levado para esterilização em autoclave. Após este procedimento o material foi armazenado em um armário até o momento de sua utilização.

2.2.4. Repicagem dos fungos

De um fruto contaminado foram retiradas amostras do fungo e levadas para identificação. Após serem identificadas, com o auxílio de uma alça estéril, foi raspada parte da colônia do fungo de interesse e inoculada em uma placa de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura BDA preparado previamente. Foram inoculadas cinco placas para *C. acutatum* e cinco placas para *B. cinerea*.

Posteriormente as placas foram levadas para incubação a 25 °C por dez dias para *C. acutatum* e a 20 °C por três dias para *B. cinerea*. Após este período, as placas foram retiradas da câmara de incubação e, da parte mais externa do micélio do fungo foram cortados discos de 6,0 mm de diâmetro e transferidos para o centro de outras 10 placas de Petri contendo meio de cultura BDA já solidificado. Em seguida as placas foram levadas para incubação novamente pelo mesmo período.

2.2.5. Preparo das soluções de trabalho – Óleos essenciais, timol e carvacrol

Para realização dos testes foram preparadas soluções estoque de 100 mg/mL de cada óleo essencial, timol, carvacrol, ou controle positivo, utilizando como solvente e emulsificante a solução de etanol/Tween 80[®] 1:1 para testes realizados com *C. acutatum* ou a solução de DMSO/Tween 80[®] 1:1 para testes contra *B. cinerea*.

As diluições foram realizadas utilizando meio de cultura BDA fundido, alcançando as concentrações de 0, 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL. Como controle positivo foram utilizados os fungicidas comerciais Folicur[®] para os testes com *C. acutatum* e Rovral[®] para *B. cinerea*.

O experimento foi conduzido seguindo o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo descartada a mais discrepante.

2.2.6. Preparo das soluções de trabalho – extratos, ácido úsnico e ácido fumarprotocetrárico

Para cada extrato foi preparada uma solução contendo 25,0 mg em 1,0 mL da solução de etanol/Tween 80[®] - 1:1. Esta solução foi transferida para 24,0 mL do meio de cultura fundido, alcançando a concentração final de 1000 µg/mL.

Para as substâncias ácido úsnico (3) e ácido fumarprotocetrárico (4), foram medidas as massas de 17,22 mg e 23,62 mg, respectivamente, a elas foi adicionado 1,0 mL da solução de etanol/Tween 80[®] - 1:1 e posteriormente 24,0 mL do meio de cultura BDA fundido, alcançando a concentração final de 2,0 mmol.L⁻¹.

O experimento foi conduzido seguindo o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições, sendo descartada a mais discrepante. Como controle positivo foi utilizado o fungicida comercial Folicur[®] para o teste com *C. acutatum*.

2.2.7. Metodologia *Poisoned Food*

A metodologia conhecida como “*Poisoned Food*” foi utilizada somente para os testes contra *B. cinerea* (CHUTIA et al., 2009).

2.2.7.1. Preparo do teste *Poisoned Food*

2.2.7.1.1. Preparo das placas de Petri contendo meio de cultura BDA com os óleos essenciais, extratos ou substâncias puras a serem testados.

Em um erlenmeyer contendo meio de cultura BDA fundido foram adicionadas cinco gotas de cloranfenicol, em seguida adicionou-se a solução do óleo essencial, timol ou carvacrol para alcançar a concentração de 10, 50, 100, 500 ou 1000 µg/mL em um volume de 60,0 mL. O erlenmeyer foi agitado e o seu conteúdo transferido para quatro placas de Petri de 90 x 15 mm. As placas foram identificadas e reservadas.

2.2.7.2. Teste *Poisoned Food*

Posteriormente, as placas de Petri contendo *B. cinerea* foram levadas para a câmara de fluxo laminar. Da parte mais externa do micélio do fungo foram cortados discos de 6,0 mm de diâmetro conforme pode ser visto na **Figura 2.20, pág. 164.**

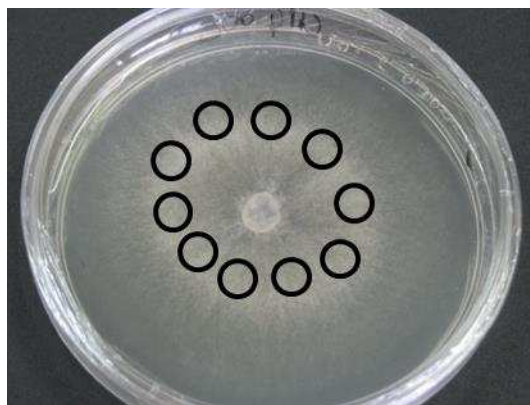


Figura 2.20. Placa de Petri contendo o fungo *B. cinerea*. No detalhe, ilustração de como seriam cortados os discos de 6,0 mm de diâmetro do micélio do fungo.

Os discos de micélio foram retirados com o auxílio de uma alça de platina e transferidos para o centro das placas de Petri (**Figura 2.21**) contendo o meio de cultura com o óleo essencial, timol ou carvacrol preparado no **tópico 2.2.7.1.1., pág. 163**. Como foram preparadas quatro placas para cada concentração, o teste foi realizado em quadruplicata, sendo descartada a repetição mais discrepante ao final.

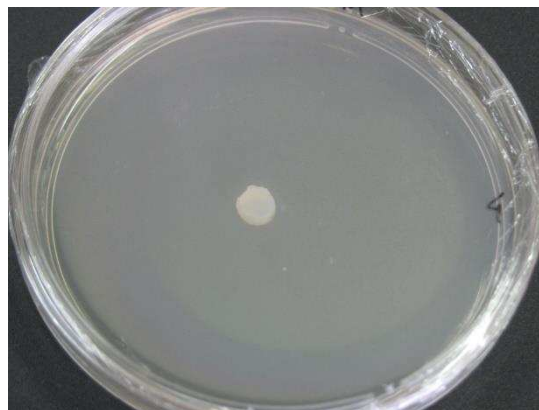


Figura 2.21. Placa de Petri contendo, ao centro, o disco de micélio de 6,0 mm cortado da extremidade do fungo *B. cinerea*.

Após a transferência dos discos de micélio para o centro das placas, elas foram vedadas com filme plástico e levadas para incubação a 20 °C por um período de três dias.

Após 24 horas as placas foram retiradas da incubadora e medido o crescimento micelial do fungo em quatro direções (**Figura 2.22**). As medidas foram realizadas de 24 em 24 horas por um período de quatro dias para *B. cinerea* (96 horas).

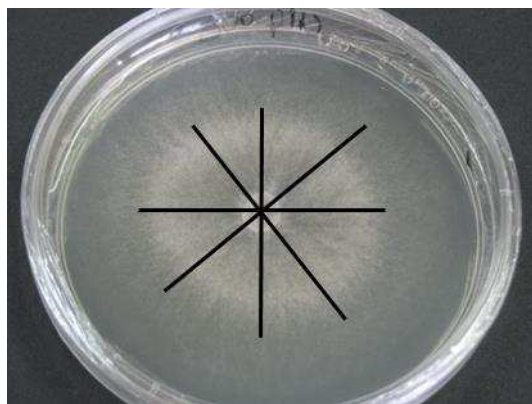


Figura 2.22. Placa de Petri contendo o fungo *B. cinerea*. No detalhe, ilustração de como são realizadas as medidas do diâmetro da colônia durante o teste.

Com os dados de diâmetro da colônia calculou-se a porcentagem de inibição de cada dose em relação ao crescimento normal do controle negativo utilizando-se a equação 2.2.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(Cb - Ct)}{Cb} \times 100 \quad eq. 2.2.$$

Onde:

Cb = Média de crescimento fúngico do controle negativo;

Ct = Média de crescimento do fungo em contato com os óleos essenciais e as substâncias testadas.

2.2.8. Metodologia *Poisoned Food* adaptada

2.2.8.1. Preparo do teste *Poisoned Food* adaptado

2.2.8.1.1. Preparo das placas de Petri contendo meio de cultura BDA com os óleos essenciais, extratos ou substâncias puras a serem testados.

Em um erlenmeyer contendo meio de cultura BDA fundido foram adicionadas três gotas de cloranfenicol, em seguida foram adicionadas as soluções dos óleos essenciais, extratos, ácido úsnico, ácido fumarprotocetrárico, timol ou carvacrol, alcançando 25,0 mL de solução. O erlenmeyer foi agitado e o seu conteúdo transferido para quatro placas de Petri de 60 x 15 mm. Após esta etapa, as placas foram reservadas até que o meio de cultura se solidificasse.

2.2.8.1.2. Preparo da dispersão de esporos

As placas contendo os isolados de *C. acutatum* em estágio de esporulação, preparadas no **tópico 2.2.4., pág. 161**, (anterior a etapa onde os discos de micélio foram cortados, transferidos para outra placa e incubados novamente) foram levadas à câmara de fluxo laminar e a cada uma delas adicionados 8,0 mL de água destilada estéril.

A superfície do meio de cultura contendo os isolados de *C. acutatum* foi raspada com o auxílio de um bastão de vidro e o material filtrado para um béquer utilizando gaze estéril como filtro.

Uma alíquota do filtrado foi retirada e levada para contagem de esporos em uma câmara de Neubauer (**Figura 2.23, pág. 167**). Foram contados os esporos encontrados em cada um dos quatro cantos “a” de cada região “A” da câmara de Neubauer (**Figura 2.23, pág. 167**).

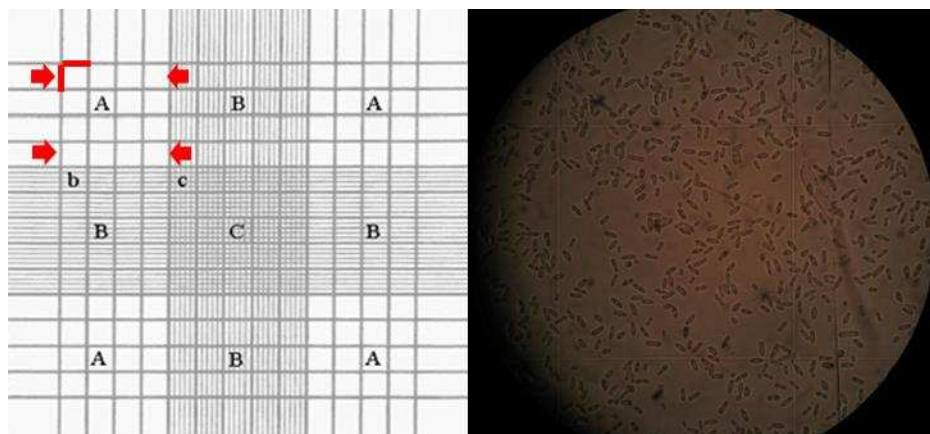


Figura 2.23. A esquerda, a estrutura de uma câmara de Neubauer vista ao microscópio. Em destaque (setas vermelhas), o local onde foram contados os esporos dos fungos para realizar o teste *Poisoned Food* adaptado. A direita, esporos de *C. acutatum* vistos na câmara de Neubauer (LAGE, 2011e).

Após a contagem, foi somado o número de esporos encontrados e calculada a média do número de esporos presentes na alíquota. O valor obtido foi multiplicado por $1,6 \times 10^6$, sendo determinado então o número de esporos por mililitro (E/mL) (KIMATI et al., 1995).

Assim, preparou-se uma solução de 60,0 mL de meio de cultura BDA contendo $1,0 \times 10^7$ E/mL de *C. acutatum*. Cada solução foi distribuída em quatro placas de Petri que foram levadas para incubação a 25 °C por três dias.

2.2.8.2. Teste *Poisoned Food* adaptado

As placas de Petri preparadas no **tópico 2.2.8.1.2., pág. 166** foram levadas para a câmara de fluxo laminar e delas cortados os discos de micélio de 6,0 mm de diâmetro por toda a placa (**Figura 2.24, pág. 168**). Os discos de micélio foram então transferidos para o centro das placas de Petri contendo o meio de cultura BDA com os óleos essenciais, extratos, ou substâncias puras nas concentrações desejadas. Como foram preparadas quatro placas para cada concentração, o teste foi realizado em quadruplicata, sendo descartada a repetição mais discrepante ao final.

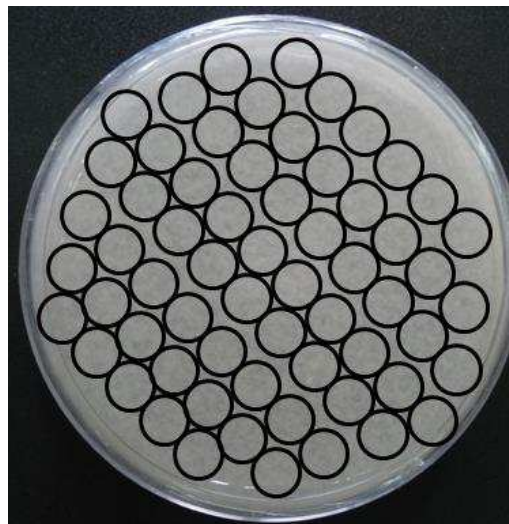


Figura 2.24. Ilustração de como foram realizados os cortes dos discos de micélio de 6,0 mm na placa de *C. acutatum*.

As placas foram vedadas com filme plástico e levadas para incubação a 20 °C. Após 24 horas foram retiradas da incubadora e medido o crescimento micelial do fungo em quatro direções (**Figura 2.25**).

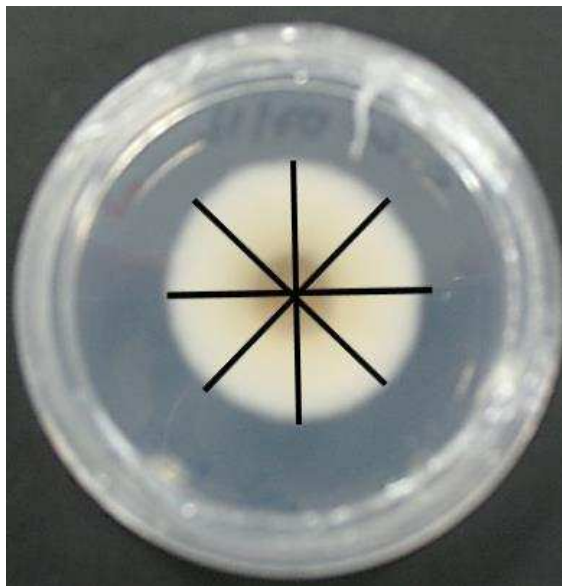


Figura 2.25. Ilustração de como foram realizadas as medidas do halo de crescimento em *C. acutatum* a cada 24 horas por um período de 96 horas.

As medidas foram realizadas de 24 em 24 horas por um período de quatro dias.

Com os dados de diâmetro da colônia calculou-se a porcentagem de inibição de cada dose em relação ao crescimento normal do controle negativo utilizando-se a equação 2.2.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(Cb - Ct)}{Cb} \times 100 \quad \text{eq. 2.2.}$$

Onde:

Cb = Média de crescimento fúngico do controle negativo;

Ct = Média de crescimento do fungo em contato com os óleos essenciais e as substâncias testadas.

2.3. Resultados e Discussões

2.3.1. Método *Poisoned Food* e *Poisoned Food* adaptado

Existem algumas metodologias de referência que estão descritas na literatura para avaliar o efeito tóxico de substâncias contra fungos filamentosos (CLSI 2008b; CLSI 2010).

A análise pela metodologia M38-A (CLSI, 2008b) disponibilizada para testar fungos filamentosos dermatófitos permite a visualização da Concentração Inibitória Mínima – CIM e da Concentração Fungicida Mínima – CFM pelo método de microdiluição em caldo.

Embora esses parâmetros sejam muito importantes, não é possível obter resultados dela se a substância de interesse não inibe completamente o crescimento do fungo, sendo esta metodologia pouco sensível.

Já a análise utilizando a metodologia M51-A (CLSI, 2010) para fungos filamentosos não dermatófitos utiliza o método de disco-difusão, onde a substância a ser testada está incorporada em um disco de papel que vai ao centro da placa de Petri contendo o fungo. A atividade antifúngica é determinada através da análise das zonas de inibição do crescimento do fungo ao redor do disco de papel. Embora seja uma técnica rápida e de baixo custo, tem a limitação de depender da boa difusão das substâncias no meio de cultura.

Estas metodologias são descritas para fungos patógenos de humanos e podem ser perfeitamente adaptadas para fungos fitopatogênicos. No entanto, devido aos problemas expostos, a metodologia utilizada por Chutia e colaboradores (2009), conhecida como “*Poisoned Food*” é mais adequada para a análise fungos fitopatogênicos. Esta metodologia oferece uma triagem rápida, de baixo custo e boa sensibilidade para avaliação de substâncias com potencial atividade antifúngica.

Neste método, o microrganismo de interesse é cultivado em um meio de cultura BDA (Batata-dextrose-ágar) e ao alcançar o tamanho desejado são cortados discos de micélio da parte mais externa do fungo que são transferidos para o centro de outra placa de Petri contendo o meio de cultura estéril e as substâncias de interesse.

Embora seja uma metodologia relativamente fácil, alguns ajustes foram necessários, principalmente porque o preparo das placas para a utilização nesta técnica acarreta alguns problemas:

- 1) Para realizar os cortes dos discos de micélio é necessário aguardar o crescimento do fungo até quase tomar toda a placa. E o tempo desde o isolamento até a obtenção de placas de qualidade é de vinte dias em média;
- 2) Os cortes dos discos de micélio são realizados na parte mais externa da colônia e a quantidade de discos gerados por placa é pequena, cerca de trinta, e se faz necessária a produção de uma grande quantidade de placas para realizar o teste (**Figura 2.20, pág. 164**);
- 3) Nem sempre o micélio cresce de forma homogênea e isso acarreta em discos disformes, que ao crescerem dessa forma podem produzir erros de medidas que ao fim reduzem a precisão do método;
- 4) Durante a realização dos testes já foi observado pelo nosso grupo que discos de micélio de placas diferentes geram um desvio padrão alto que dificulta a análise estatística, como são necessárias muitas placas com fungos para se realizar o teste o mesmo está susceptível a altos valores de desvio padrão;
- 5) Devido a uma falta de padronização da quantidade de fungo utilizada a reprodutibilidade do teste não é muito alta.

Para contornar estes problemas a metodologia foi adaptada:

- 1) Na adaptação para esta metodologia, do inóculo preparado a partir dos frutos, são retirados os esporos e uma nova placa é preparada com o inóculo em uma concentração conhecida no meio de cultura BDA. Isto permite a redução do tempo de 20 para 10 dias;
- 2) Os cortes dos discos de micélio são realizados por toda a placa e assim é possível cortar cerca de 140 discos por placa, reduzindo a quantidade de placas a serem usadas (**Figura 2.24, pág. 168**);
- 3) Como o fungo agora cresce em toda a placa e a quantidade de fungo dispersa por ela é homogênea, o crescimento ocorre de forma mais uniforme e assim os erros de medidas são reduzidos;
- 4) Como são produzidos até cinco vezes mais discos por placa, a quantidade de placas necessárias para a realização dos testes cai bastante e dessa forma ocorre uma redução dos valores de desvio padrão;
- 5) Ocorre maior reprodutibilidade do teste devido à padronização da concentração de fungos utilizados.

2.3.2. Avaliação da toxicidade dos solventes aos fungos

Neste trabalho, a metodologia *Poisoned food* foi utilizada apenas para realizar os testes para *B. cinerea*. Devido à baixa produção de esporos não foi possível obter quantidade suficiente para inocular no meio de cultura de forma a obter uma dispersão homogênea e dessa forma utilizar a metodologia adaptada. Para *C. acutatum* foi utilizada a metodologia adaptada.

Assim, para realizar os testes, a princípio optou-se pelo uso de DMSO ou etanol como solvente, devido à necessidade de solubilizar também os compostos majoritários de **LTPM**, timol e carvacrol. No trabalho de Daferera e colaboradores (2003) observou-se que o etanol já havia sido utilizado como solvente para testes contra *B. cinerea*.

No entanto, em um teste prévio para avaliar a toxicidade do etanol e do DMSO contra *B. cinerea* e *C. acutatum*, na concentração de 1% (v/v), constatou-se uma elevada taxa de inibição do crescimento micelial para *B. cinerea* por ambos solventes, 53,6% e 44,4%, respectivamente.

Para *C. acutatum* a inibição do crescimento fúngico, causada pelo etanol foi baixa, 5,6%, enquanto a inibição causada pelo DMSO foi mais alta, 29,4%, sendo o DMSO mais tóxico para este fungo (**Figura 2.26**).

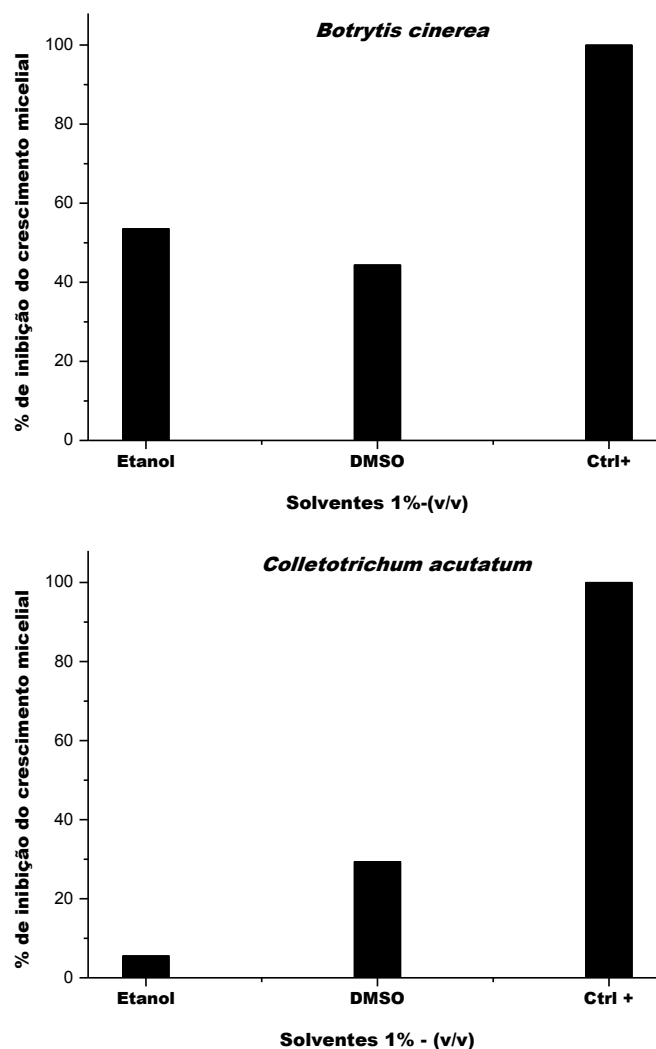


Figura 2.26. Gráficos de inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* por etanol e dimetilsulfóxido após dois dias e de *C. acutatum* após cinco dias. O controle positivo (Ctrl +) foi preparado utilizando uma solução do antifúngico Rovral® em DMSO, na concentração de 1000 ppm para *B. cinerea* e de Folicur® nas mesmas condições para *C. acutatum*.

Para reduzir a quantidade de solvente utilizada e assim reduzir o efeito tóxico gerado nos fungos foi utilizado uma mistura entre o surfactante Tween 80® e os solventes etanol e DMSO (SARRAZIN et al., 2012). Dessa forma, optou-se por testar duas soluções, uma de Tween 80/etanol 1:1 e outra de Tween80/DMSO 1:1 ambas a 1% do volume total do meio de cultura. Para este teste foram preparadas oito repetições, sendo eliminada a que possuía o valor mais discrepante.

Os resultados indicaram que para *B. cinerea* a solução menos tóxica foi a de Tween 80 + DMSO, com inibição do crescimento micelial de 1,3% contra 8,1% de Tween 80 + etanol. Para *C. acutatum* a solução com menor toxicidade foi de Tween 80 + etanol, com 5,1% contra 13,7% de Tween 80 + DMSO (**Figura 2.27, pág. 175**).

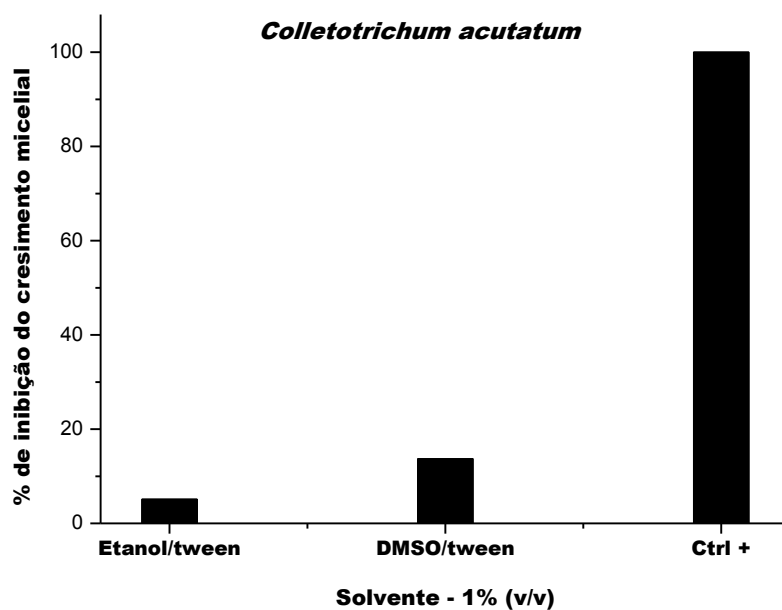
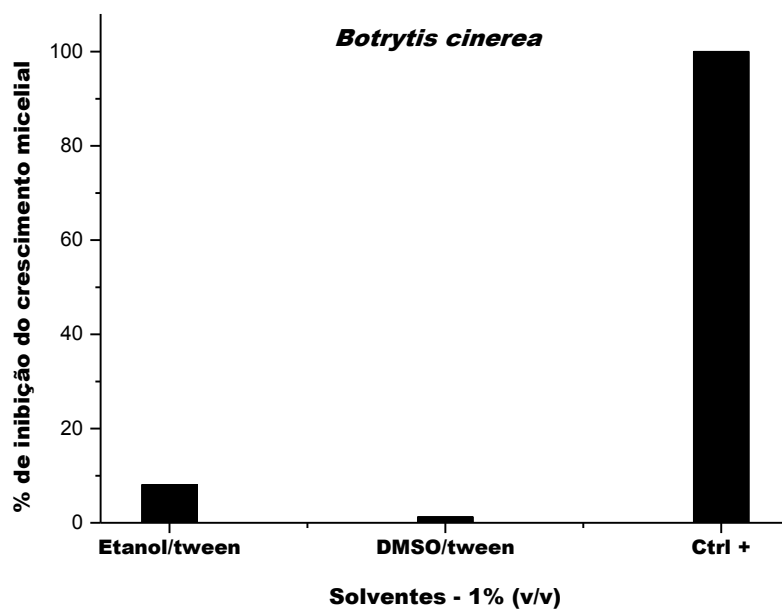


Figura 2.27. Gráficos de inibição de crescimento micelial (toxicidade) das soluções de Tween 80® + etanol – 1:1 e Tween 80® + DMSO – 1:1 contra *B. cinerea* e *C. acutatum*. O controle positivo (Ctrl +) foi preparado utilizando uma solução do antifúngico Rovral® em DMSO, na concentração de 1000 ppm para *B. cinerea* e de Folicur® nas mesmas condições para *C. acutatum*.

2.3.3. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais, timol e carvacrol contra o fungo *Botrytis cinerea* utilizando a metodologia *Poisoned Food*

Utilizando a metodologia *Poisoned Food*, para *B. cinerea* o óleo essencial de *L. triplinervis* (**LTPM**) foi muito ativo e inibiu completamente o crescimento do fungo em 500 e 1000 mg/mL, mesmo na concentração de 100 mg/mL a inibição do crescimento fúngico foi alta (77,5%) (**Tabela 2.14, pág. 177 e Figura 2.28, pág. 177**).

Assim, podemos afirmar que a atividade do óleo essencial de **LTPM** está diretamente relacionada com a presença de timol e carvacrol em sua constituição, visto que a atividade antifúngica destas substâncias puras foi maior individualmente do que a atividade do óleo até a concentração de 100 mg/mL.

Acima desta concentração a inibição do crescimento foi de 100% para o óleo, timol e carvacrol, indicando que o valor mínimo ideal para a inibição completa do crescimento fúngico está compreendido entre as concentrações de 100 e 500 mg/mL (**Tabela 2.14, pág. 177**).

Um dado relevante é que na concentração mais baixa, de 10,0 mg/mL, o timol foi bastante ativo (76,8%), sendo inclusive mais ativo do que o Rovral[®] (67,1%), que é o fungicida comercial utilizado para o combate deste fungo.

BPPM e **BD** foram pouco ativos em concentrações abaixo de 500 mg/mL. Os melhores resultados de inibição do crescimento micelial ocorreram somente na concentração de 1000 mg/mL, onde foram obtidos 61,3% e 70,9%, respectivamente (**Tabela 2.14, pág. 177**).

Tabela 2.14. Inibição do crescimento micelial (%) de *B. cinerea* após quatro dias

	Concentração (mg/mL)				
	10	50	100	500	1000
LTPM	4,0 ^{dC} ±0,3	48,71 ^{bB} ±5,0	77,5 ^{cC} ±2,7	100	100
TIM	76,8 ^{aC} ±2,0	86,49 ^{aB} ±1,6	89,6 ^{bB} ±0,9	100	100
CAR	16,1 ^{cD} ±1,1	77,0 ^{aC} ±1,1	88,2 ^{bB} ±1,0	100	100
BPPM	1,0 ^{dC} ±1,7	-1,0 ^{cC} ±1,5	1,6 ^{eC} ±1,8	27,9 ^{cB} ±4,0	61,3 ^A ±5,0
BD1	-10,2 ^{eD} ±0,0	0,18 ^{cDC} ±0,8	10,5 ^{dC} ±1,5	49,3 ^{bB} ±5,5	70,9 ^{bA} ±4,9
ROVRAL®	67,1 ^{bB} ±0,9	100	100	100	100

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas na mesma linha diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

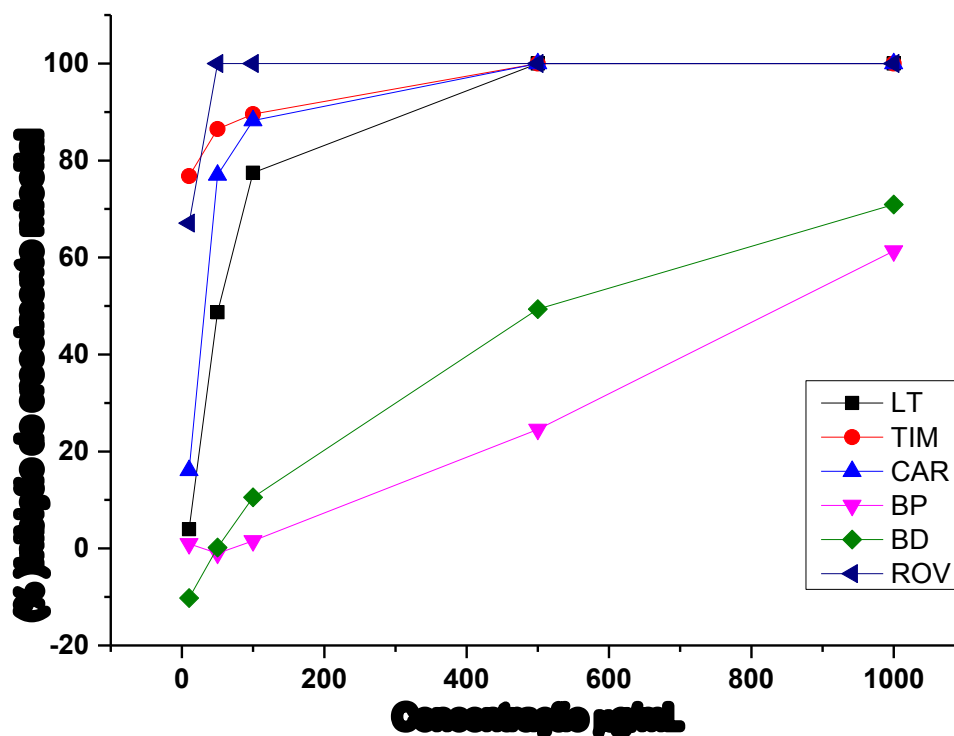


Figura 2.28. Gráfico da inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* pelos óleos essenciais das plantas utilizadas neste trabalho, timol e carvacrol. LT = *Lippia triplinervis*, TIM = timol (1), CAR = carvacrol (2), BP = *Baccharis platypoda*, BD = *Baccharis dracunculifolia*, ROV = Rovral®.

2.3.4. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais, timol e carvacrol contra o fungo *Colletotrichum acutatum* utilizando a metodologia *Poisoned Food* adaptada

Para *C. acutatum*, o óleo de **LTPM** e os seus compostos majoritários foram mais ativos do que **BPPM** e **BD**. Em 10,0 mg/mL não é possível diferenciar a atividade entre **LTPM**, timol, carvacrol, e BD, sendo BPPM o menos ativo. Em 50,0 mg/mL nota-se que o carvacrol foi o mais ativo (30,3%), seguido do timol (21,6%) e do óleo de **LTPM** (11,6%) (**Tabela 2.15**).

Em 100 mg/mL, timol e carvacrol foram os mais ativos e inibiram o crescimento micelial do fungo em 63,5% e 70,5%, respectivamente, sendo estatisticamente iguais. Nesta concentração **LTPM**, **BD** e **BPPM**, foram menos ativos e inibiram o crescimento micelial de *C. acutatum* em 27,0%, 14,7% e 10,7%, respectivamente (**Tabela 2.15**).

Em 500 e 1000 mg/mL **LTPM**, timol e carvacrol inibiram completamente o crescimento do fungo *C. acutatum*, sendo os óleos essenciais de **BPPM** e **BD** pouco ativos, com inibição do crescimento micelial em 27,5% e 42,5%, respectivamente. Na **Tabela 2.15** e na **Figura 2.29**, **pág. 179** estão sumarizados os dados do teste dos óleos essenciais e dos constituintes majoritários de **LTPM**, timol e carvacrol contra *C. acutatum*.

Tabela 2.15. Inibição do crescimento micelial (%) de *C. acutatum* após seis dias

	Concentração (mg/mL)				
	10	50	100	500	1000
LTPM	12,7 ^{bc} ± 2,5	11,6 ^{dc} ± 0,02	27,0 ^{cb} ± 2,2	100 ^{aA}	100 ^{aA}
TIM	6,9 ^{bc} ± 0,6	21,6 ^{cC} ± 2,8	63,5 ^{bB} ± 2,0	100 ^{aA}	100 ^{aA}
CAR	14,7 ^{bd} ± 0,6	30,3 ^{bc} ± 0,6	70,5 ^{bB} ± 0,7	100 ^{aA}	100 ^{aA}
BPPM	2,8 ^{cd} ± 0,2	9,3 ^{dc} ± 0,1	10,7 ^{dc} ± 0,4	19,8 ^{cb} ± 0,9	27,5 ^{ca} ± 1,8
BD	12,0 ^{bDC} ± 1,2	6,9 ^{dD} ± 0,5	14,7 ^{dc} ± 0,4	28,2 ^{bB} ± 1,4	42,5 ^{ba} ± 0,2
FOLICUR[®]	100 ^{aA}	100 ^{aA}	100 ^{aA}	100 ^{aA}	100 ^{aA}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas na mesma linha diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

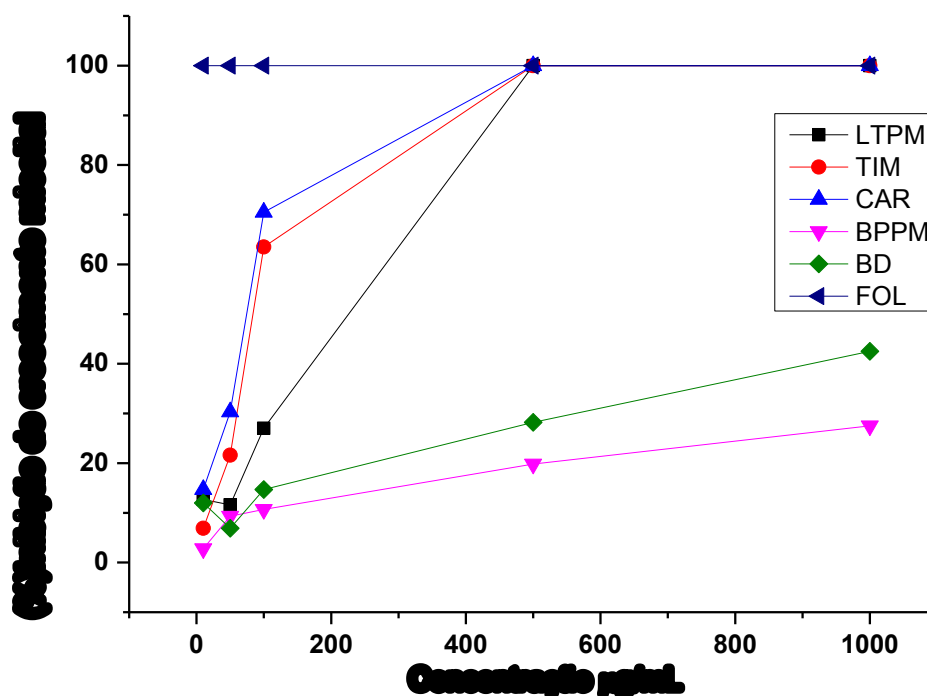


Figura 2.29. Gráfico da inibição do crescimento micelial de *C. acutatum* pelos óleos essenciais das plantas utilizadas neste trabalho, timol e carvacrol. LT = *Lippia triplinervis*, TIM = timol (1), CAR = carvacrol (2), BP = *Baccharis platypoda*, BD = *Baccharis dracunculifolia*, FOL = Folicur®.

Com os dados de inibição do crescimento micelial dos fungos *C. acutatum* e *B. cinerea* pelo óleo essencial de *L. triplinervis* e seus compostos majoritários, timol e carvacrol, foi calculada a Área Abaixo da Curva (AAC) (**Figura 2.30, pág. 180**). Por este parâmetro foi possível comparar a atividade antifúngica do óleo essencial de *L. triplinervis*, timol e carvacrol entre os fungos *B. cinerea* e *C. acutatum* (SANTOS et al., 2007).

Neste contexto, foi possível observar que o óleo essencial de *L. triplinervis*, timol e carvacrol foram mais ativos para *B. cinerea* (AAC = 89.701,22; 95.581,81 e 93.636,94, respectivamente) do que para *C. acutatum* (AAC = 76.863,68; 85.404,00 e 93.636,94, respectivamente) (**Figura 2.30, pág. 180**). Para *C. acutatum* o timol foi mais ativo (AAC = 95.581,81) do que o carvacrol (AAC = 93.636,94) e o contrário foi observado para *B. cinerea*, onde o carvacrol foi mais ativo (87.525,78) do que o timol (85.404,00) (**Figura 2.30, pág. 180**).

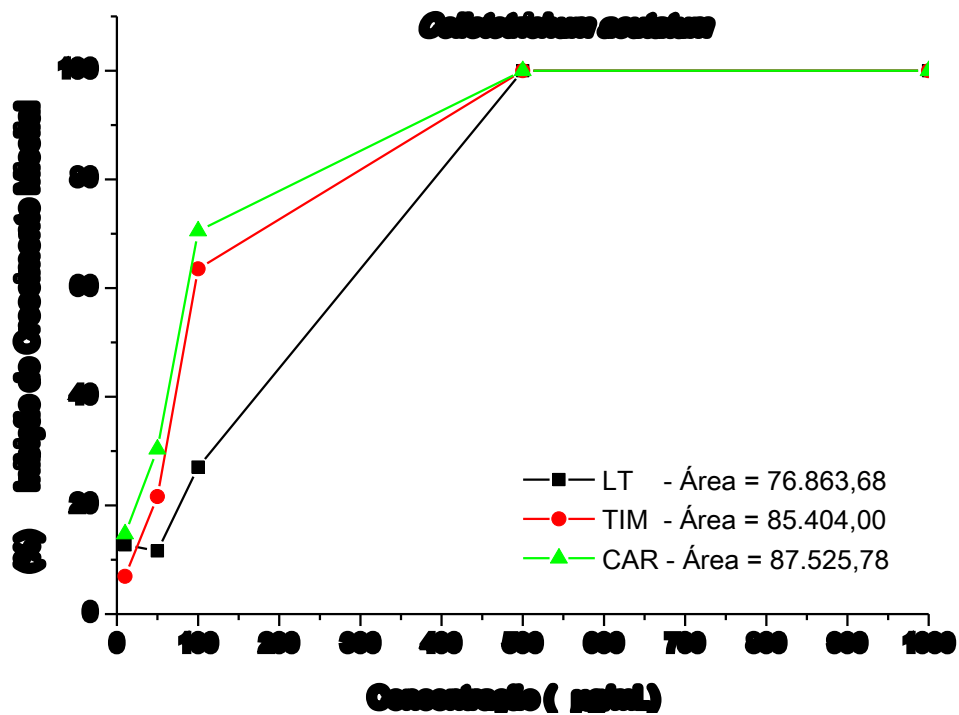
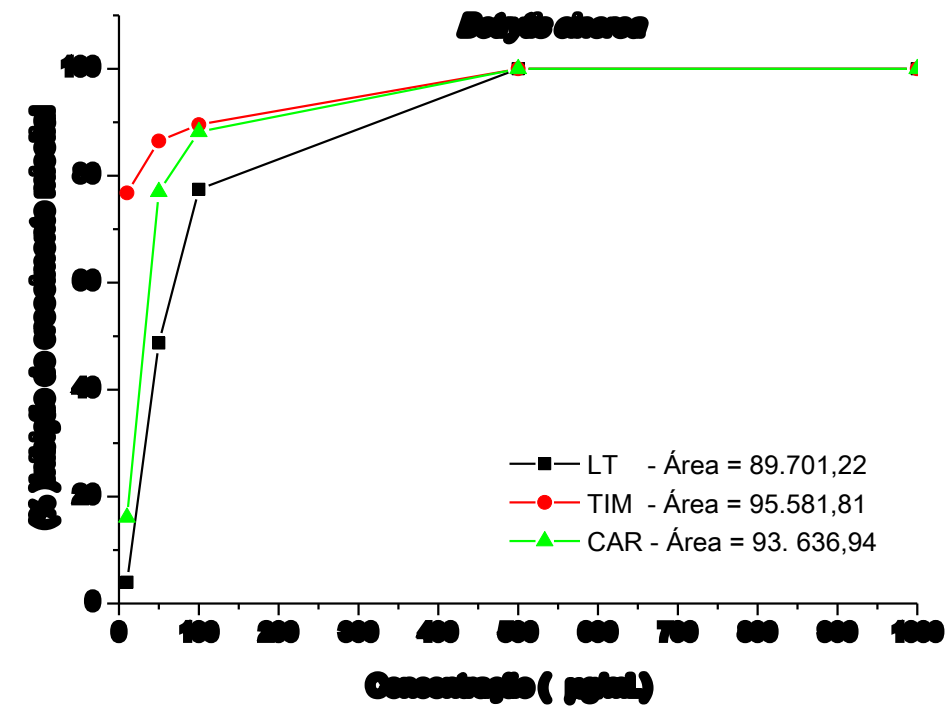


Figura 2.30. Áreas abaixo da curva de inibição do crescimento micelial de *B. cinerea* e *C. acutatum* para o óleo essencial de *L. triplinervis* (LT) e seus constituintes majoritários, timol (TIM) e carvacrol (CAR).

2.3.5. Avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos das plantas e do líquen, do ácido úsnico e ácido fumarprotocetrárico contra o fungo *Colletotrichum acutatum* utilizando a metodologia *Poisoned food* adaptada

Dos extratos testados, somente os extratos em hexano de *L. triplinervis* (**HLT**) e *B. platypoda* (**HBP**) foram ativos, inibindo em 100% e 21,7%, respectivamente o crescimento do fungo *C. acutatum* (**Figura 2.31, pág. 182**). A atividade antifúngica do extrato de **HLT** está relacionada com a presença de timol e carvacrol, conforme já foi discutido no **Capítulo 1 (tópico 3.2.1, págs. 71 a 76)** e no **Capítulo 2 (pág. 137 a 139)**.

Os extratos em metanol de *B. platypoda* (**MBP**) e *M. squarrosa* (**MMS**), em hexano de *M. squarrosa* (**HMS**) e em etanol de *B. dracunculifolia* (**EBD**) promoveram o crescimento do fungo além do crescimento promovido pelo controle. Isto pode ser explicado devido a falta de compostos ativos ou a sua presença em baixa concentração nestes extratos. Dessa forma estes extratos são utilizados pelo fungo como uma fonte extra de matéria orgânica para a sua alimentação (**Figura 2.31, pág. 182**).

O extrato etanólico de *Cladonia rappii* (**ECR**) foi pouco ativo (11,0%), sendo os compostos ativos o ácido úsnico (**3**) (19,0%) e o ácido fumarprotocetrárico (**4**) (14,6%), isolados deste líquen.

A atividade de ácido úsnico pode ter sido subestimada devido a sua baixa solubilidade nos solventes utilizados e no meio de cultura, onde foi observada a formação de cristais desta substância. Como foi discutido no **tópico 1.3.1, págs. 142 a 144**, o ácido úsnico apresentou atividade antifúngica apenas quando testado pela metodologia de bioautografia (que não depende da solubilidade da substância no solvente ou no meio de cultura), e foi pouco ativo quando testado pela metodologia de microdiluição em caldo. Resultados similares foram observados para o (+)-(*R*)-ácido úsnico por Tay e colaboradores (2004).

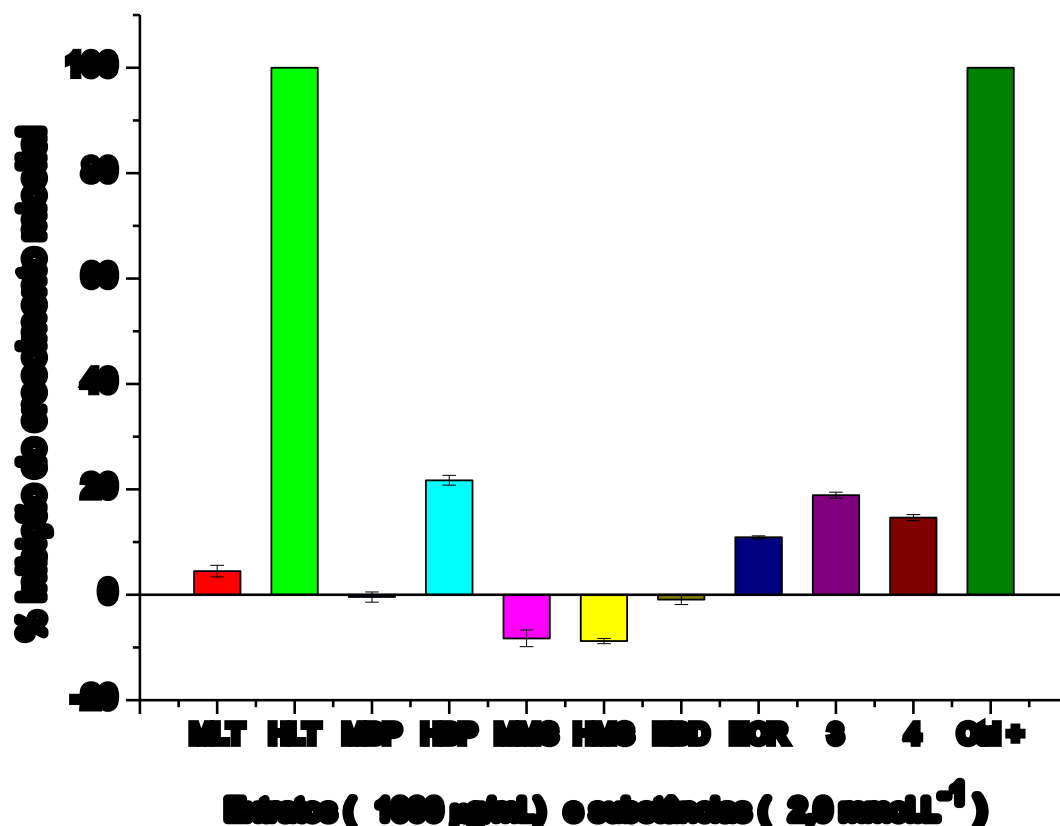


Figura 2.31. Gráfico da atividade antifúngica dos extratos e substâncias testados contra *C. acutatum*. As substâncias isoladas 3 e 4 foram testadas na concentração de 2,0 mmol.L⁻¹. Os extratos e o controle positivo foram testados na concentração de 1000 µg/mL.

Através da metodologia *Poisoned Food* e *Poisoned Food* adaptada foi possível determinar a atividade antifúngica para os óleos essenciais, extratos e substâncias puras presentes nas plantas e líquen utilizados neste trabalho. A adaptação da metodologia foi importante, porque possibilitou a avaliação mais rápida e criteriosa da atividade antifúngica dos óleos essenciais, extratos e substâncias puras testadas. A perspectiva para um próximo trabalho é fazer um comparativo quantitativo entre estas metodologias e assim fazer desta um novo método de referência.

O óleo essencial de *L. triplinervis* foi o mais ativo contra os fungos *B. cinerea* e *C. acutatum* dentre os óleos essenciais testados e a atividade antifúngica ocorreu devido a presença de timol e carvacrol em alta concentração em sua constituição, sendo *B. cinerea* mais susceptível ao óleo essencial e seus componentes majoritários do que *C. acutatum*.

Dos extratos testados, apenas o extrato hexânico de *L. triplinervis* foi ativo. A sua atividade antifúngica foi atribuída à presença de timol e carvacrol em sua constituição, este resultados corroboram com aqueles encontrados nas **págs. 137 a 139**, onde a atividade antifúngica contra fungos patogênicos também foi atribuída à presença destes monoterpenóides.

A baixa atividade antifúngica para o ácido úsnico (**3**), relacionada com a baixa solubilidade desta molécula no meio de cultura BDA será investigada posteriormente, e os esforços serão direcionados para a determinação de um sistema de solventes para que seja avaliada corretamente a atividade antifúngica desta molécula por métodos de microdiluição em caldo.

3. Avaliação da Atividade Acaricida

3.1. Introdução

Carrapatos são ectoparasitas que pertencem ao filo Arthropoda, ordem Acari e subordem Ixodida que possui três famílias: Argasidae, Nuttallielidae e Ixodidae. No Brasil existem cerca de 60 espécies, sendo que algumas delas como o *Rhipicephalus microplus* são responsáveis por parasitar animais de grande porte como o boi e o cavalo enquanto outras como o *Rhipicephalus sanguineus* infestam pequenos animais como o cão (MATHIAS et al., 2013).

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae) (**Figura 2.32**) é o carrapato de maior importância econômica da região neotropical. A presença deste ectoparasito pode ocasionar redução do ganho de peso, queda na produção de leite, danos causados ao couro e gastos com produtos químicos para seu controle, totalizando um prejuízo de 3,2 bilhões de dólares por ano em criação de bovinos (GRISI et al., 2014).



Foto: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2014

Figura 2.32. Fêmea ingurgitada do carrapato *R. microplus* (Canestrini, 1888) (Acari: Ixodidae). No detalhe um macho desta espécie.

Como são ectoparasitas de vertebrados, os carrapatos necessitam de sangue para se alimentar e assim completar seu desenvolvimento. Em geral, os carrapatos possuem um ciclo de vida complexo onde ocorre um estágio inativo (ovos) e três estágios móveis e hematófagos (larva, ninfa e adulto).

As larvas são imaturas sexualmente, não possuem estigmas respiratórios e tem aspecto semelhante ao de um adulto com três pares de pernas. Após a alimentação, sofrem ecdise, e passam para o estágio de ninfas, ainda imaturas sexualmente, com quatro pares de pernas e já com a presença dos estigmas respiratórios. Da mesma forma que as larvas, as ninfas após se alimentarem sofrem uma nova ecdise e dão origem aos adultos machos e fêmeas. Cada estágio requer vários dias de fixação no hospedeiro e longos períodos de repasto (**Figura 2.33**) (BRITTO et al., 2006).

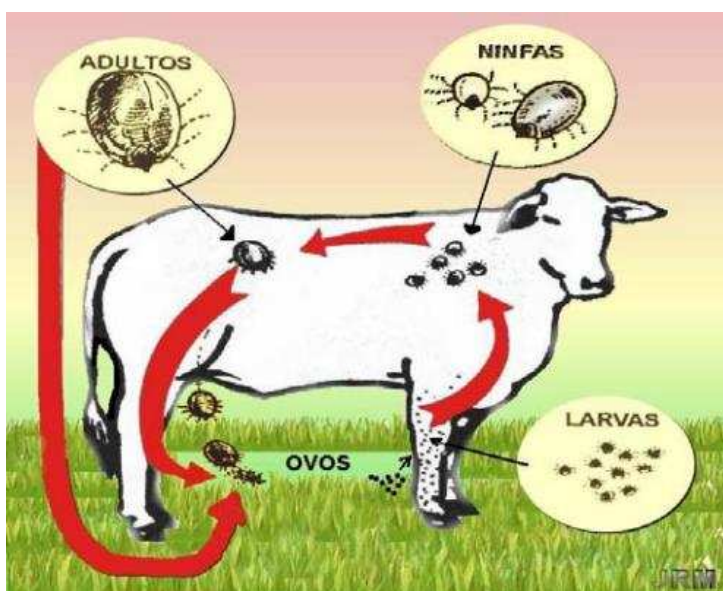


Figura 2.33. Ciclo biológico dos carrapatos *R. microplus* (BRITTO et al., 2006).

O controle de infecções causadas por ectoparasitas de importância veterinária ainda é feito através do uso de produtos químicos sintéticos como o Amitraz®, Diazinon® e o Cypermethrin® (**Figura 2.34, pág. 186**) que atuam no sistema nervoso desses artrópodes. Esses compostos têm apresentado muitos inconvenientes, como o desenvolvimento de resistência e toxicidade para o homem e para o meio ambiente (TAYLOR, 2001).

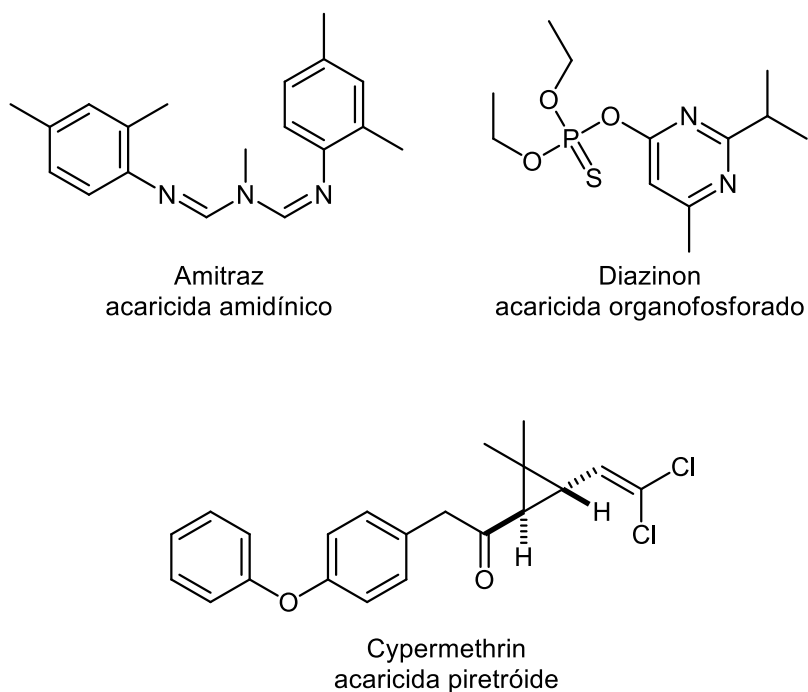


Figura 2.34. Principais acaricidas sintéticos encontrados no mercado.

Neste contexto, os produtos naturais são uma alternativa menos tóxica e que podem ser utilizados diretamente como pesticidas ou como moléculas líderes para a síntese de novos compostos. A variedade de produtos naturais candidatos a possíveis acaricidas é grande. Os óleos essenciais de plantas, por exemplo, são misturas complexas de metabólitos secundários voláteis. Quimicamente, são constituídos, em sua maioria, por terpenóides e são produzidos em órgãos especializados como ductos e cavidades secretoras e tricomas glandulares (KUTCHAN, 2005; MAFFEI, 2010; BENCHAAR et al., 2011).

O *blend* de substâncias presente nos óleos essenciais pode gerar um efeito sinérgico com múltiplos modos de ação e dessa forma reduzir a incidência de resistência (DAYAN et al., 2009; ISMAN, 2000; DUKE et al., 2010; NTALLI et al., 2011).

Assim, neste capítulo, foram testadas as atividades acaricidas dos extratos, óleos essenciais e alguns dos seus compostos majoritários contra o carrapato *R. microplus*.

3.2. Materiais e Métodos

Neste estudo foram utilizados carrapatos da cepa sensível Porto Alegre (POA) que é mantida através de infestações artificiais em bovinos na Fazenda Experimental da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais. No teste de pacote foram utilizadas larvas de *R. microplus* com idade entre 15 e 21 dias após a eclosão. No teste de imersão, foram utilizadas fêmeas recém-desprendidas do hospedeiro .

Os testes foram conduzidos no Laboratório de Artrópodes Parasitos – UFJF, sob supervisão do Professor Dr. Erik Daemon.

3.2.1. Teste do pacote de larvas

Para o experimento de pacotes de larvas, aproximadamente 100 larvas foram colocadas no centro de um papel de filtro com dimensões de 6 x 6 cm e na sequência esses papéis foram dobrados ao meio e as bordas foram vedadas por cliques. Posteriormente, a cada lado do papel filtro foram aplicados homogeneamente 90,0 µL das soluções a serem testadas (**Figura 2.35, pág. 188**).

Foram testadas as concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg/mL para o óleo essencial e de 100 mg/mL para os extratos brutos, sendo que para cada concentração foram realizadas 10 repetições. Também foi formado um grupo controle com Tween 80® a 2% ou etanol absoluto para os óleos essenciais e os terpenos utilizados. Para os testes com os extratos brutos o grupo controle foi formado por Tween 80® a 5% (MONTEIRO et al., 2012).

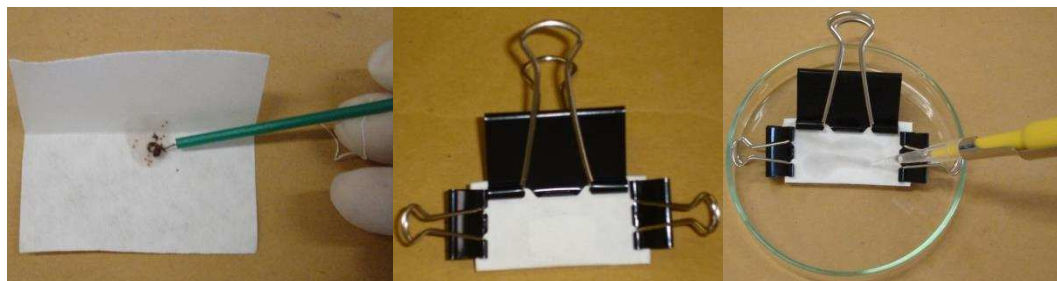


Foto: LAP, 2011a

Figura 2.35. Etapas da confecção dos pacotes de larvas.

Os grupos experimentais foram mantidos em câmara climatizada ($27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR} > 80 \pm 10\%$) e após 24 horas foi realizada a avaliação da mortalidade utilizando uma bomba de vácuo com uma ponteira adaptada na extremidade de uma mangueira de borracha, para a quantificação das larvas vivas e mortas³ e assim determinar a taxa de mortalidade (**Figura 2.36**).



Foto: LAP, 2011b

Figura 2.36. Contagem das larvas utilizando uma ponteira de micropipeta adaptada a uma bomba de vácuo.

Para calcular a mortalidade média das larvas foi utilizada a seguinte equação:

$$\%M = \frac{\text{Total de larvas mortas}}{\text{Total de larvas}} \times 100$$

³ Foram consideradas mortas as larvas que permaneciam imóveis após serem submetidas a um leve fluxo de CO_2 . As larvas mortas foram aspiradas pela bomba de vácuo e assim realizava-se a contagem.

3.2.2. Teste de imersão de fêmeas

Neste procedimento foi utilizado o teste de imersão de fêmeas de *R. microplus* adultas proposto por Drummond e colaboradores (1973) onde as fêmeas ingurgitadas foram divididas em cinco grupos com pesos previamente homogeneizados, tendo cada grupo 10 fêmeas. Na sequência, cada grupo foi imerso por cinco minutos nas concentrações de 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 mg/mL da solução do óleo essencial a ser analisado. No grupo controle, os carrapatos foram imersos por cinco minutos em Tween 80® (2%).

Após a imersão dos grupos, cada fêmea teve sua massa medida individualmente e colada em decúbito dorsal em placa de “Petri” para acompanhamento da postura (cada carrapato = unidade experimental). Os grupos experimentais foram mantidos em câmara climatizada ($27\pm1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm10\%$) e a coleta de postura realizada diariamente até a morte da última fêmea.

A massa de ovos coletada foi acondicionada em seringa com extremidade distal cortada, vedada com algodão hidrófilo e mantidas nas mesmas condições de temperatura e umidade mencionadas anteriormente (**Figura 2.37**).

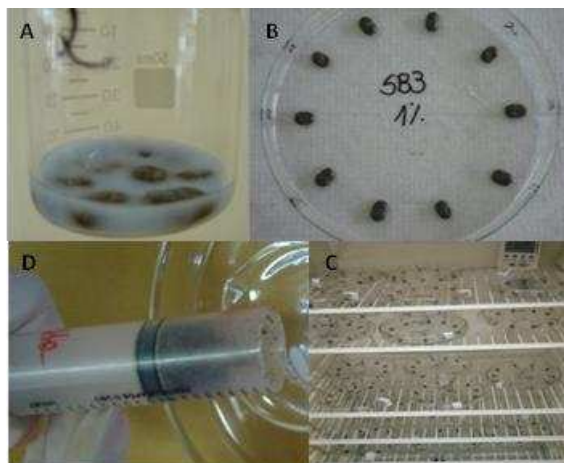


Foto: LAGE, 2011d

Figura 2.37. Etapas do teste de imersão de fêmeas ingurgitadas. No sentido horário: A) Imersão das fêmeas na solução do óleo essencial; B) fêmeas em decúbito dorsal para acompanhamento da postura; C) armazenamento em câmara climatizada; D) coleta dos ovos e armazenamento em uma seringa.

Foram medidos os seguintes parâmetros biológicos: peso da fêmea antes da postura (**PFA**), peso da massa de ovos (**PMO**) e percentual de eclosão (**PE**). Os valores obtidos foram utilizados para calcular o índice de produção de ovos (**%IPO**) e o percentual de controle (**%C**). Estes parâmetros foram obtidos das equações abaixo:

Índice de produção de ovos (%IPO) (BENNETT, 1974):

$$\%IPO = \frac{PMO \times 100}{PFA}$$

Percentual de controle (%C) (DRUMMOND et al.,1973):

Primeiro foi calculado o índice estimado de reprodução:

$$IER = \frac{PMO}{PFA} \times \frac{PE}{100} \times 20.000$$

Em seguida o percentual de controle:

$$\%C = \frac{IER_{controle} - IER_{tratamento}}{IER_{controle}} \times 100$$

Para análise estatística foi utilizado o software Biostat 5.0. As médias dos tratamentos foram comparadas por teste de Anova seguido por teste de Tukey.

3.3. Resultados e Discussões

Foi realizada uma triagem com os extratos brutos de **LT**, **BP**, **MS**, **BD** e **CR**. Somente o extrato bruto **HLT** foi ativo, alcançando 100% da mortalidade das larvas após um período de 24 horas. Conforme foi discutido no **Capítulo 2**, a presença de timol (**1**) e carvacrol (**2**) em grande quantidade neste extrato produzem resultados de atividade biológica similares aos do óleo essencial de **LT**. A atividade acaricida de **1** e **2** está bem estabelecida na literatura e devido a esse fator, optou-se por não seguir com este extrato para os testes contra as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* (MONTEIRO et al., 2009; MONTEIRO et al, 2010; SENRA et al., 2013).

Para o teste com as larvas, na **Tabela 2.16**, pode-se observar que o percentual de mortalidade de *R. microplus* tratadas com o óleo essencial das partes aéreas de **LTPM** foi de 95,7% na concentração de 2,5 mg/mL e de 100% nas demais concentrações (5,0; 10,0; 15,0 e 20,0%). O óleo essencial de **BPPM** não foi ativo em nenhuma das concentrações avaliadas. O óleo de **BD** foi ativo nas concentrações acima de 2,5 mg/mL, alcançando praticamente 99,6% de mortalidade das larvas na concentração de 15,0 mg/mL e 100% na em 20,0 mg/mL. Após a triagem, os óleos essenciais de **LTPM** e **BD** foram relacionados para seguir com os testes contra as fêmeas de *R. microplus*.

Tabela 2.16. Mortalidade média de larvas não ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com diferentes concentrações dos diversos óleos essenciais

Concentração	LTPM	BPPM	BD
Tween 80 (2%)	0,00 ^a ±0,0	0,0 ^a ±0,0	0,0 ^a ±0,0
2,50mg/mL	95,7 ^b ±3,2	0,0 ^a ±0,0	0,0 ^a ±0,0
5,00mg/mL	100,0 ^b ±0,0	0,0 ^a ±0,0	37,9 ^b ±19,3
10,0mg/mL	100,0 ^b ±0,0	0,0 ^a ±0,0	73,5 ^{bc} ±12,1
15,0mg/mL	100,0 ^b ±0,0	0,0 ^a ±0,0	99,6 ^{cd} ±1,3
20,0mg/mL	100,0 ^b ±0,0	0,0 ^a ±0,0	100,0 ^d ±0,0

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

Contra as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* o óleo essencial de *L. triplinervis* (LTPM) a partir da concentração de 30,0 mg/mL causou redução significativa no peso da massa de ovos. Para o índice de produção de ovos o mesmo foi observado a partir de 40,0 mg/mL. A imersão das fêmeas nas soluções do óleo essencial também levou a produção de ovos inférteis, uma vez que o percentual de eclosão foi significativamente afetado a partir da concentração de 20,0 mg/mL (**Tabela 2.17**).

Tabela 2.17. Parâmetros obtidos dos testes do óleo essencial de *L. triplinervis* (LTPM) x fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

Tratamentos	Peso inicial (mg)	Peso (mg) da massa de ovos	Índice de produção de ovos (%)	Percentual de eclosão de larvas (%)
Tween 2 %	260,7 ^a ±41,4	135,4 ^a ±52,9	51,1 ^a ±18,1	93,1 ^a ±4,3
10mg/mL	260,7 ^a ±37,4	136,5 ^a ±59,0	51,1 ^a ±19,8	77,1 ^{ab} ±12,0
20mg/mL	261,3 ^a ±36,2	129,1 ^a ±35,4	49,2 ^a ±10,2	69,5 ^b ±21,6
30mg/mL	260,0 ^a ±42,2	87,8 ^b ±53,6	33,8 ^{ab} ±21,8	69,4 ^b ±32,7
40mg/mL	260,4 ^a ±30,8	58,1 ^{bc} ±47,6	21,9 ^{bc} ±17,8	16,2 ^c ±26,0
50mg/mL	260,4 ^a ±25,7	21,6 ^c ±22,2	8,8 ^c ±9,6	6,2 ^c ±17,6

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

Os percentuais de controle obtidos com a utilização do óleo essencial de *L. triplinervis* nas concentrações de 10,0 e 20,0 mg/mL foram de 16,5% e 29,0%, respectivamente, alcançando 51,5% em 30,0 mg/mL. Nas duas maiores concentrações (40,0 e 50,0 mg/mL) o percentual de controle foi superior a 90,0%, alcançando 92,5% e 100%, respectivamente.

A atividade acaricida do óleo de *L. triplinervis* está provavelmente relacionada ao alto teor de timol (30,6%). Esse monoterpene já teve sua atividade evidenciada para fungos (PASTER et al., 1995), protozoários (TASDEMIR et al., 2006), bactérias (LAMBERT et al., 2001, BOTELHO et al., 2007; NOSTRO et al., 2007), helmintos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2007), insetos (CARVALHO et al., 2003) e ácaros (IMDORF et al., 1995; CAVALCANTI et al., 2010).

Em carrapatos, estudos demonstraram que diferentes estágios de *Rhipicephalus microplus*, *R. sanguineus*, *Amblyomma cajennense* e *D. nitens* foram sensíveis ao timol (DAEMON et al., 2009; MONTEIRO et al., 2009; MONTEIRO et al., 2010; MENDES et al., 2011; DAEMON et al., 2012a).

De forma a aprimorar a atividade acaricida do timol contra larvas de *R. microplus*, Scoralik e colaboradores (2012) testaram diversas formulações e observaram um aumento significativo em sua atividade quando o mesmo era preparado em uma solução 1:1 de água e etanol, sendo estes resultados corroborados por Daemon e colaboradores (2012b). Nas formulações preparadas por Scoralik e colaboradores (2012) as concentrações de timol utilizadas foram de 2,5, 5,0 e 10,0 mg/mL que causaram mortalidades de 94,0%, 96,6% e 99,9%, respectivamente. Para o óleo de *L. triplinervis* (**LTPM**), as soluções nestas mesmas concentrações, apresentaram, taxa de mortalidade de 95,0%, 100% e 100%, ou seja, o óleo desta planta, coletada no PESB, apresentou atividade semelhante às formulações preparadas por estes autores (SCORALIK et al., 2012).

A alta taxa de mortalidade causada por **LTPM** pode ser atribuída também à presença de carvacrol (31,9%). Gomes et al. (2012) observaram que óleo de *L. sidoides* era mais ativo do que o timol puro contra larvas de *D. nitens*. Estes autores relataram que este resultado pode ser associado ao efeito sinérgico entre timol e carvacrol, presentes em grande quantidade no óleo essencial de *L. sidoides*. A ocorrência de um efeito sinérgico entre timol e carvacrol também já foi observado em testes contra o nematóide *Meloidogyne incognita* (NTALLI et al., 2011).

Para *B. dracunculifolia* (**BD**), o teste contras as fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* indicou que nos grupos tratados com as concentrações de 10,0 20,0 e 40,0 mg/mL o peso da massa de ovos e o índice de produção de ovos variaram entre 158,9 e 152,1 mg e 48,9 e 46,7%, respectivamente, sendo estatisticamente semelhante ao observado para o controle (168,5 mg e 51,9%) (**Tabela 2.18**).

Tabela 2.18. Parâmetros obtidos dos testes do óleo essencial de *B. dracunculifolia* (**BD**) x fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*

Tratamentos		Peso inicial (mg)	Peso (mg) da massa de ovos	Índice de produção de ovos (%)	Percentual de eclosão de larvas (%)
BD	Tween 2 %	327,1 ^a ±36,8	168,5 ^a ±47,5	51,9 ^a ±12,9	92,0 ^a ±7,6
	10,0 mg/mL	324,6 ^a ±26,1	158,9 ^a ±24,6	48,9 ^a ±6,7	77,1 ^{ab} ±11,7
	20,0 mg/mL	324,6 ^a ±20,6	158,5 ^a ±32,7	48,7 ^a ±9,1	67,5 ^{ab} ±22,8
	30,0 mg/mL	324,4 ^a ±25,0	152,1 ^a ±25,3	46,73 ^a ±6,2	50,5 ^b ±22,8
	40,0 mg/mL	324,3 ^a ±44,6	75,8 ^b ±58,3	23,5 ^b ±17,5	7,8 ^c ±7,0
	50,0 mg/mL	325,3 ^a ±33,1	52,3 ^b ±59,7	15,6 ^b ±17,	11,7 ^c ±10,3

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

A viabilidade dos ovos foi afetada significativamente a partir da concentração de 40,0 mg/mL (50,5%; 7,8% e 11,7%), não sendo observado o mesmo nos grupos tratados com as três menores concentrações do óleo. O percentual de controle foi de 20,4%, 30,9% e 50,5% nos grupos imersos nas concentrações de 10,0; 20,0 e 30,0 mg/mL, alcançando 96,1% nas duas maiores concentrações.

Após a confirmação da atividade acaricida para o óleo essencial de *B. dracunculifolia* **BD**, o próximo passo foi investigar se os componentes majoritários do óleo essencial, nerolidol (22,3%) e limoneno (6,9%) também eram ativos contra as larvas de *R. microplus*. Para o limoneno, não foi observada atividade acaricida (**Tabela 2.19, pág. 195**).

Para o nerolidol, pôde-se observar uma intensa atividade acaricida (**Tabela 2.19**) a partir da concentração de 5,0 mg/mL com taxa de mortalidade das larvas em 87,4%, 97,7% a 10,0 mg/mL e 100% nas demais concentrações.

Estes resultados indicam que a atividade do óleo essencial de **BD** está relacionada com a presença do nerolidol, uma vez que estes resultados são melhores do que aqueles obtidos com o óleo essencial (37,9; 73,5; 99,6 e 100% a 5, 10, 15 e 20mg/mL, respectivamente). Os testes com os padrões foram realizados com etanol absoluto devido à baixa solubilidade do nerolidol na solução de Tween 80® a 2%.

Tabela 2.19. Mortalidade média de larvas não ingurgitadas de *R. microplus* tratadas com diferentes concentrações dos componentes de majoritários e do óleo essencial de **BD** (Teste realizado em duplicata)

Concentração	Limoneno	Nerolidol	BD
Etanol absoluto	0,0 ^a ±0,0	0,0 ^a ±0,0	0,0 ^a ±0,0
2,5 mg/mL	0,0 ^a ±0,0	0,0 ^a ±0,0	0,0 ^a ±0,0
5,0 mg/mL	0,0 ^a ±0,0	87,4 ^b ±28,1	37,9 ^b ±19,3
10,0 mg/mL	0,0 ^a ±0,0	97,7 ^b ±0,0	73,5 ^{bc} ±12,1
15,0 mg/mL	0,0 ^a ±0,0	100,0 ^b ±0,0	99,6 ^{cd} ±1,3
20,0 mg/mL	0,0 ^a ±0,0	100,0 ^b ±0,0	100,0 ^d ±0,0

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

A atividade acaricida de compostos terpênicos além do timol e carvacrol (CETIM et al., 2010; LAGE et al., 2013) tem sido demonstrada por vários autores, majoritariamente para terpenos oxigenados, como os álcoois nerolidol, que teve sua atividade acaricida reportada recentemente (VALENTE et al., 2014), e o linalol (SENRA et al., 2013), cetonas como a fenchona (SANCHÉZ-RAMOS et al., 2001), pulegona (RIBEIRO et al., 2010), cadina-4,10(15)-dien-3-one (PORTER et al., 1995) e nootkatona (PANELLA et al., 2005) e oxabíccicos como o 1,8-cineol (PRATES et al., 1998) (**Figura 2.38, pág. 196**).

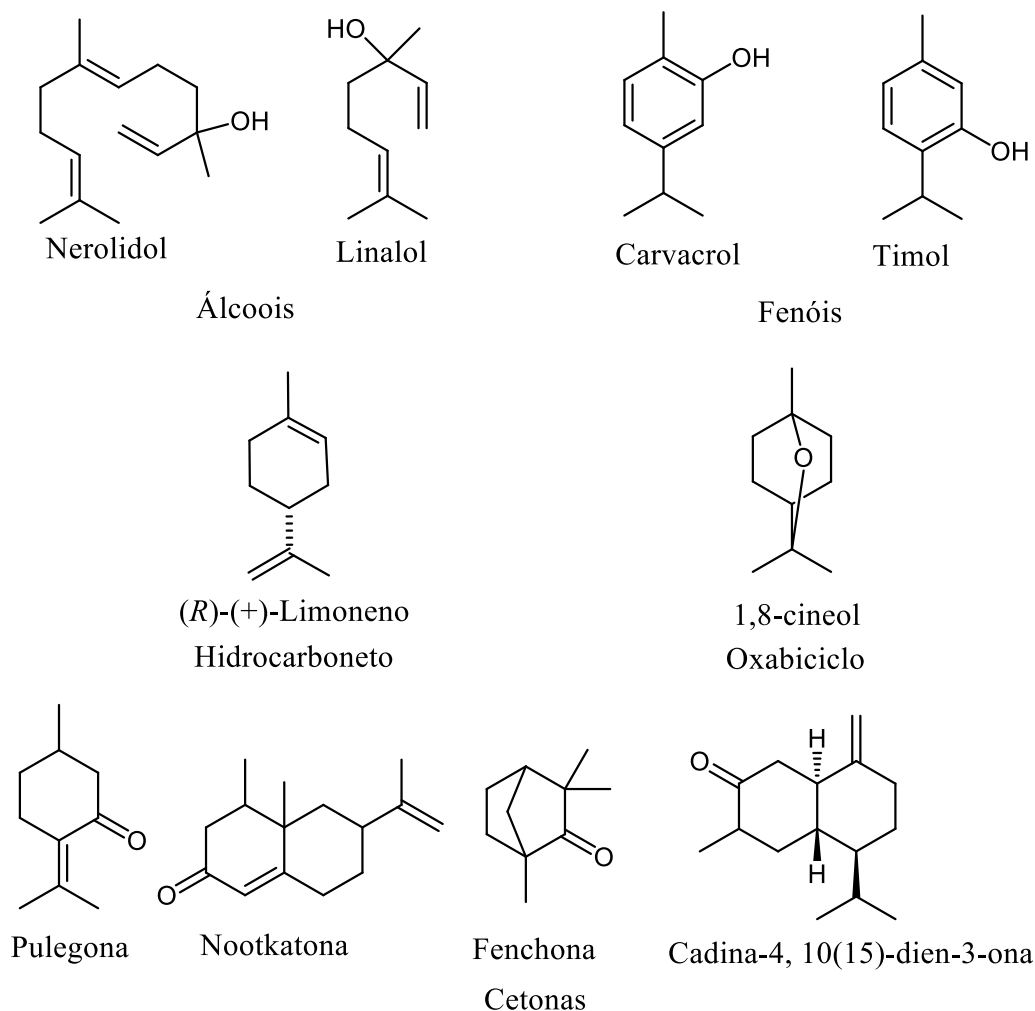


Figura 2.38. Terpenos que possuem atividade acaricida.

Interessantemente o (*R*)-(+)-limoneno (**Figura 2.38**) utilizado neste trabalho não foi ativo contra as larvas de *R. microplus*, ao contrário do que foi reportado no trabalho de Ferrarini e colaboradores (2008). A diferença entre os estudos realizados neste trabalho e os de Ferrarini e colaboradores (2008) pode estar relacionada aos tipos de metodologias utilizadas.

No presente estudo foi utilizado o método descrito por Stone e Haydoc (1962), o qual é recomendado pela FAO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação) e pelo Ministério da Agricultura e Pecuária do Brasil para testes com carrapatos (KLAFKE, 2008), com pequenas modificações propostas por Monteiro e colaboradores (2012).

Neste teste, ao papel de filtro contendo os carrapatos, foi adicionada a solução de limoneno e o resultado avaliado após 24 horas.

Em contraste, no teste realizado por Ferrarini e colaboradores (2008) as larvas foram acondicionadas em sacos de tecido do tipo TNT e então submersos na solução da substância por dez minutos, sendo a mortalidade determinada após 48 horas.

Assim, a diferença entre as duas metodologias pode ter sido crucial para as disparidades encontradas entre os dois trabalhos. O maior tempo de exposição dos carrapatos a uma quantidade superior de substância e a avaliação da mortalidade depois de um período maior de tempo podem ter sido decisivos para a atividade acaricida observada por Ferrarini e colaboradores (2008).

O mecanismo de ação para os terpenóides ainda não está bem esclarecido. Estas substâncias podem agir em vários alvos nos insetos especialmente no sistema nervoso, onde podem atuar nos canais de cloreto mediados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) (**Figura 2.39**), em receptores de otopamina, receptores de tiramina, receptores de acetilcolina nicotínica, canais de sódio dentre outros (TONG, 2010).

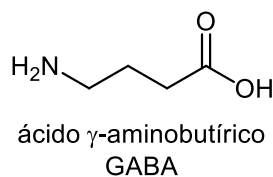


Figura 2.39. Estrutura do GABA.

O GABA é o agente inibidor mais importante de neurotransmissão do sistema nervoso dos insetos. Esta molécula age ligando-se a receptores transmembrana específicos dos neurônios, abrindo os canais de Cl^- permitindo o fluxo deste íon para dentro do neurônio (**Figura 2.40, pág. 198**).

Esta ação resulta na formação de uma carga negativa no potencial transmembrana causando uma hiperpolarização e consequentemente a inibição neuronal. Os receptores de GABA dos insetos acoplados a proteínas transmembrana que regulam a passagem de íons cloreto são um alvo importante para vários inseticidas como dieldrin e fipronil (**Figura 2.40**). Estes inseticidas se ligam a esses receptores de GABA e aumentam ou diminuem o fluxo dos íons cloreto para os neurônios e assim matam os insetos por super excitação ou por inibição do sistema nervoso (TONG; COATS, 2010).

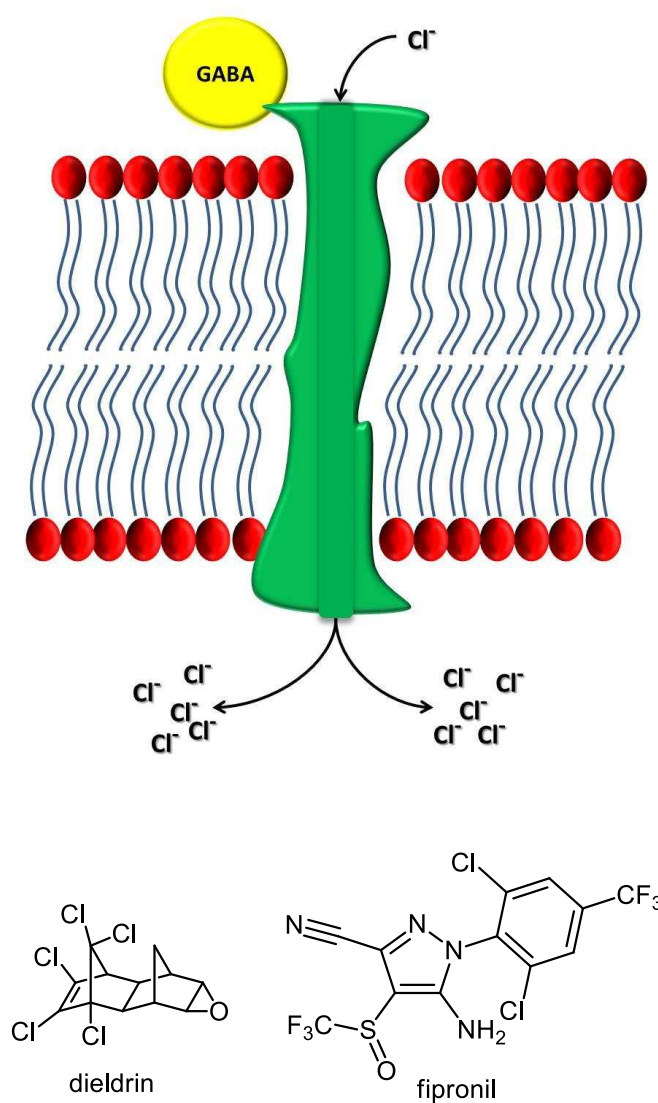


Figura 2.40. GABA ligado à proteína transmembrana regulando os canais de Cl^- . Estruturas do dieldrin e fipronil.

No caso dos monoterpenóides como timol e o carvacrol, Tong e Coats (2010) demonstraram que estas moléculas agem aumentando a captação do íon cloreto no receptor GABA dos insetos, o que indica que ocorre um efeito alostérico positivo na modulação dos receptores GABA, ou seja, super-inibem o sistema nervoso central.

Estas substâncias são agonistas do GABA, se ligam ao seu receptor específico na membrana pós-sináptica e aumentam o fluxo de Cl^- para o interior da célula nervosa, desta forma mimetizando o efeito relaxante do GABA. Os sintomas da intoxicação dos insetos por este modo de ação são a ataxia e paralisia. A alimentação e oviposição cessam pouco tempo após a exposição, mas a morte propriamente dita pode ocorrer só depois de alguns dias.

De fato, os sintomas de intoxicação observados para as larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* é semelhante ao descrito por Hannig e colaboradores (2009). Não foi observado nenhum efeito “*Knock down*”, pois a mortalidade das larvas ocorreu durante um período de 24 horas. Para as fêmeas ingurgitadas observou-se que oviposição foi reduzida significativamente e as mortes ocorreram depois de vários dias.

Assim, observou-se que os óleos essenciais de *L. triplinervis* e *B. platypoda* foram ativos contra o carrapato *R. microplus*, atuando em duas fases importantes (larvas e fêmeas adultas) do ciclo de vida deste parasita, sendo os produtos naturais promissores para serem utilizados diretamente como acaricidas no combate a estas pragas agropecuárias.

4. Avaliação da Atividade Formicida

4.1. Introdução

Um dos maiores problemas enfrentados por sistemas florestais e agrícolas nas regiões tropicais é a herbivoria voraz das formigas cortadeiras (HÖLLDOBLER; WILSON, 1990). Elas utilizam as plantas para alimentar as trabalhadoras com a seiva e para cultivar o fungo mutualístico *Leucoagaricus gongylophorus* (Fungi: Basidiomycota) para alimentar a rainha e suas larvas (MURAKAMI; HIGASHI, 1997; SILVA et al., 2003).

Neste caso, as formigas do gênero *Atta* são os principais herbívoros no Novo Mundo, elas cortam aproximadamente 19% das florestas que estão localizadas ao redor de suas colônias causando diversos danos à área predada gerando perdas econômicas (URBAS et al., 2007).

O primeiro relato reconhecendo as formigas cortadeiras como pestes ocorreu pelo naturalista Francês Auguste de Saint-Hilaire quando estava de visita no Brasil no século XIX e disse:

Ou o Brasil aniquila as formigas cortadeiras ou as formigas cortadeiras aniquilarão o Brasil (DELLA LUCIA et al., 2014).

Dentre as espécies de *Atta*, pode-se destacar *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (**Figura 2.41, pág. 201**) também conhecida como saúva-limão, que mantém uma relação simbiote com o fungo *Leucocoprinus gongylophorus*. Esta formiga ataca todo tipo de espécie florestal, principalmente *Gmelina arborea* (Gmelina) e *Caesalpinia ferrea* (Pau-ferro) (FILHO et al., 2002).



Foto: LAGE, 2012b

Figura 2.41. *Atta sexdens rubropilosa* (saúva-limão ou formiga cortadeira).

Formigas como *Atta sexdens* são seres eussociais e possuem uma organização social considerada das mais complexas. Isso se refere naturalmente ao polimorfismo existente nas operárias e parece ser essencialmente de origem fenotípica e faz com que as colônias sejam organizadas por grupos de indivíduos morfologicamente diferentes (DELLA LUCIA et al., 2011).

As colônias de *A. sexdens* são mantidas por um processo de simbiose onde o fungo *L. gongylophorus* utiliza como substrato as folhas frescas trazidas pelas operárias (Figura 2.42, pág. 202) e as formigas utilizam o fungo como alimento. Interessantemente a simbiose não ocorre somente com o fungo, existem bactérias como as *Pseudonocardia* sp. que se encontram aderidas ao exoesqueleto das formigas-cortadeiras, estas bactérias são responsáveis por produzir substâncias que protegem o jardim de fungo contra infecções causadas por *Escovopsis* sp., que são fungos parasitas de *L. gongylophorus* (DELLA LUCIA et al., 2011).



Foto: LAGE, 2012c

Figura 2.42. Fungo *L. gongylophorus* em uma colônia de *A. sexdens*. No detalhe uma folha sendo trazida para ser utilizada como substrato pelo fungo.

Esta complexa organização social se sustenta em um eficiente sistema de comunicação que pode ocorrer por sinais táteis e sonoros, mas que ocorre principalmente por sinais químicos. A comunicação química é a base da integração da sociedade desses insetos e essas substâncias são conhecidas como semioquímicos, que podem ser classificadas como feromônios ou aleloquímicos. Os principais feromônios encontrados em formigas cortadeiras são os de alarme, territorialidade, marcação de trilha e reconhecimento de companheiras de ninho (**Figura 2.43, pág. 203**) (DELLA LUCIA et al., 2011).

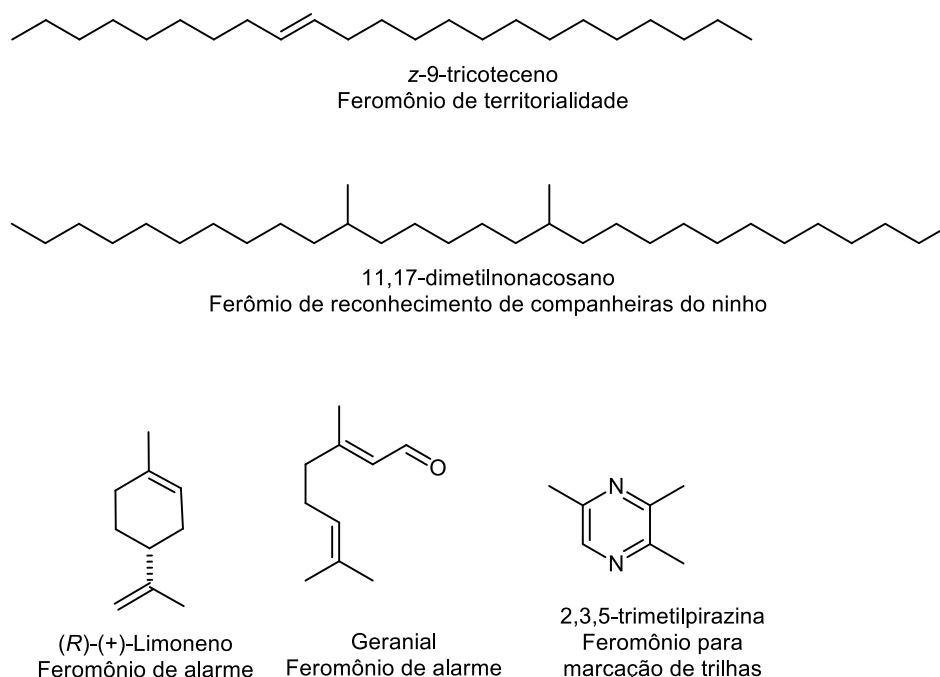


Figura 2.43. Feromônios de formigas cortadeiras. Destaque para (R)-(+)-limoneno e geranial que são os responsáveis pelo cheiro característico de limão liberado em formigas da espécie *A. sexdens* quando estas são esmagadas.

A organização social, as distintas formas de adaptação para o forrageamento e a complexidade dos ninhos fazem com que o manejo dessas formigas seja difícil. As técnicas para o controle desses insetos são diferentes daquelas geralmente utilizadas para combater pragas agrícolas sendo o manejo químico o mais utilizado. As iscas granuladas contendo sulfluramida e fipronil (**Figura 2.44**) são as mais utilizadas. Contudo, o controle químico traz muitos danos ao homem e ao meio ambiente e neste caso os produtos naturais parecem ser uma alternativa aos compostos sintéticos (DELLA LUCIA et al., 2014).

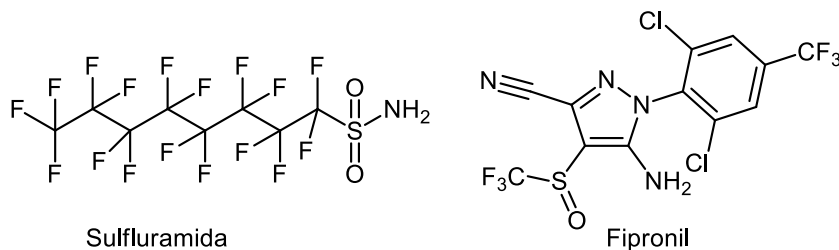


Figura 2.44. Formicidas disponíveis no mercado na forma de iscas granuladas.

4.2. Materiais e Métodos

A colônia de *A. sexdens*, com três anos (9,0-10L de jardim de fungo) foi mantida em laboratório a temperatura de 25 ± 5 °C e umidade relativa de $75 \pm 5\%$, sendo fornecido diariamente aos espécimes folhas de *Akalypha wilkesiana* e água (DELLA LUCIA et al., 1993).

Para a avaliação da atividade formicida dos extratos e dos óleos essenciais, foram preparadas soluções em acetona de 5,0; 50,0 e 100 mg/L. Para o teste foi reservado um grupo de formigas, onde os indivíduos possuíam tamanho aproximados.

Às formigas foi aplicado 1,0 µL da solução sobre o seu pronoto utilizando uma microseringa (Hamilton) de 10,0 µL. Para tanto, cada formiga foi imobilizada utilizando uma pinça. Em seguida, as formigas foram acondicionadas em uma placa de Petri perfurada, onde foram introduzidos dois tubos preenchidos com algodão, por onde era fornecida a alimentação (mel + água) e a hidratação (**Figura 2.45**).



Foto: LAGE, 2012d

Figura 2.45. Foto do momento da aplicação de uma das soluções de trabalho ao pronoto de *A. sexdens* (esquerda). À direita, placa de Petri perfurada por tubos contendo algodão para o fornecimento de água e alimento.

Para cada concentração foram realizadas cinco repetições, cada uma contendo dez formigas além do grupo controle tratado somente com acetona. Os tratamentos foram mantidos em uma sala com temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $75 \pm 5\%$ (**Figura 2.46**). Para os testes de toxicidade, as formigas foram consideradas mortas quando encontradas totalmente imóveis.

As contagens foram realizadas em intervalos de 24 horas, começando 24 horas após o início do teste com duração de sete dias (GANDRA et al., 2011).

Os testes foram realizados no Insetário/BIOAGRO – UFV sob supervisão da Professora Dra. Terezinha Maria de Castro Della Lucia.

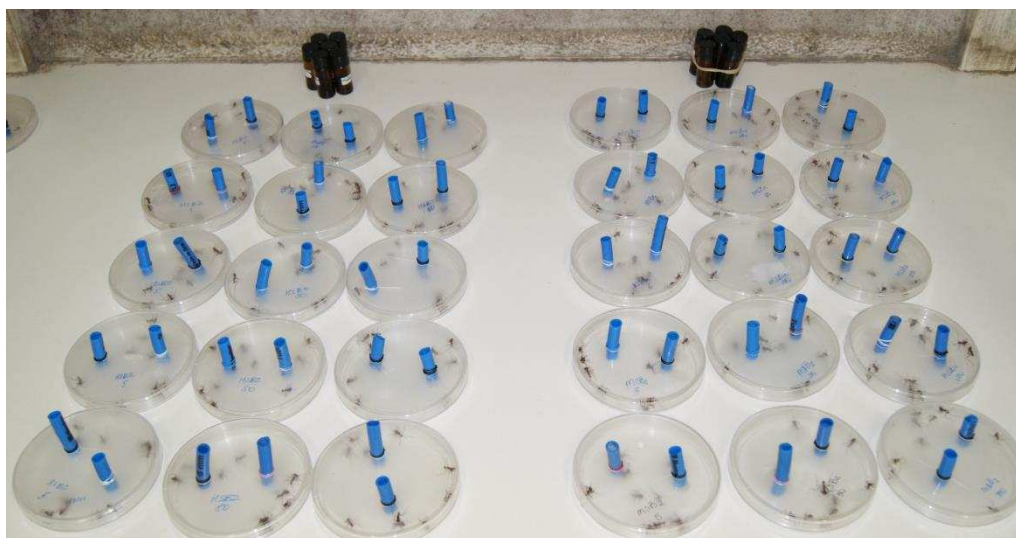


Foto: LAGE, 2012e

Figura 2.46. Visão geral da montagem dos testes de atividade formicida.

4.3. Resultados e Discussões

Neste teste foi observada a atividade formicida dos óleos essenciais e dos extratos ao longo de sete dias. Os resultados colhidos foram analisados através do teste de sobrevida de Kaplan-Meier.

Por esta metodologia de análise dos dados, a variável de interesse é o tempo que decorre até que um acontecimento (morte) se verifique e assim obtendo-se a probabilidade de um indivíduo (formiga) permanecer vivo. Esses resultados são importantes, pois é possível avaliar, para um óleo ou extrato ativo, qual será a melhor forma do seu uso para combater as formigas, em iscas ou por fumigação (GANDRA et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2002).

O óleo essencial de *B. platypoda* não foi tóxico para *A. sexdens*. Já o óleo essencial de *L. triplinervis* foi muito ativo nas concentrações mais altas. Em 50,0 mg/mL a probabilidade de sobrevivência igual a 0,1 no sétimo dia e em 100 mg/mL igual a 0,0 no sexto dia. Isto quer dizer que a taxa de mortalidade foi de aproximadamente 90,0% para as formigas tratadas na concentração de 50,0 mg/mL e de 100% usando 100 mg/mL (**Figura 2.47, pág. 207**).

A toxicidade da solução a 5,0 mg/mL foi baixa, o que corresponde a uma taxa de mortalidade de 40,0% após um período de seis dias (**Figura 2.47, pág. 207**).

A taxa de mortalidade do controle foi baixa, cerca de 20,0%. Isto já era esperado, pois formigas isoladas das suas colônias sendo suplementadas com alimentação artificial sobrevivem em média 20 dias (CASTAÑO-QUINTANA et al., 2013).

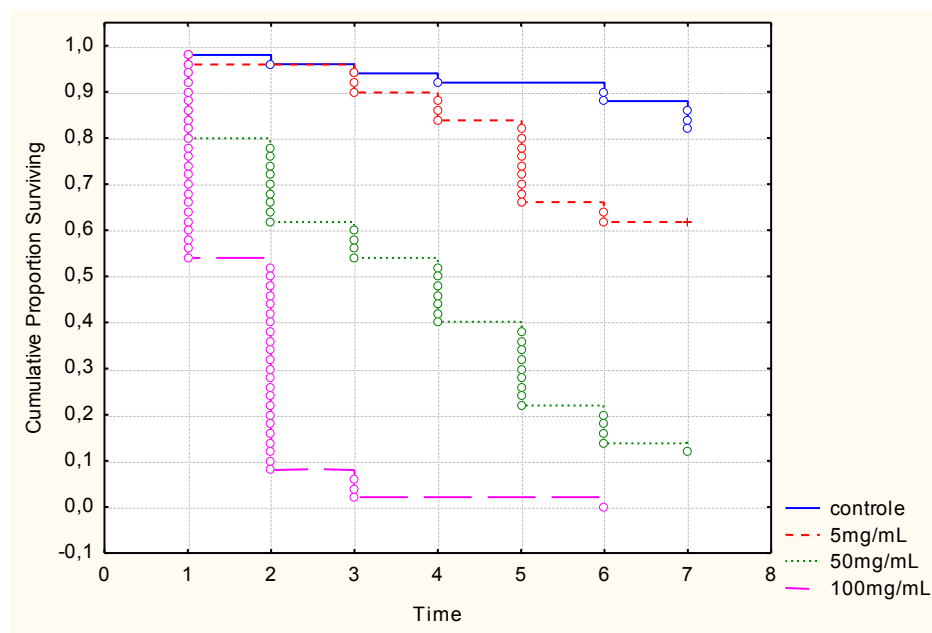


Figura 2.47. Probabilidade de sobrevivência das formigas tratadas com as soluções em acetona de **LTPM** nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL. Os valores mais próximos de 1,0 indicam maior probabilidade de sobrevivência, enquanto os valores mais próximos de 0,0 (zero) indicam maior probabilidade de mortalidade.

Devido ao largo espectro de atividades biológicas atribuídas ao timol e ao carvacrol, estes compostos majoritários do óleo essencial de *L. triplinervis* também foram testados. Além disso, os testes foram realizados de forma a determinar se o timol e o carvacrol eram as substâncias ativas presentes neste óleo essencial.

Os resultados confirmaram as expectativas iniciais. O timol foi muito ativo, alcançando uma taxa de 100% de mortalidade após quatro dias na concentração de 100 mg/mL. Na concentração de 50,0 mg/mL a taxa de mortalidade chegou a 100% ao final de sete dias. Na concentração mais baixa a taxa de mortalidade foi menor, aproximadamente 80% após seis dias, no entanto foi muito próxima à mortalidade do controle, cerca de 60% no mesmo período (**Figura 2.48, pág. 208**).

Não há uma explicação racional para a alta taxa de mortalidade do controle observada neste experimento, estes testes foram repetidos e observou-se novamente uma alta taxa mortalidade para o controle.

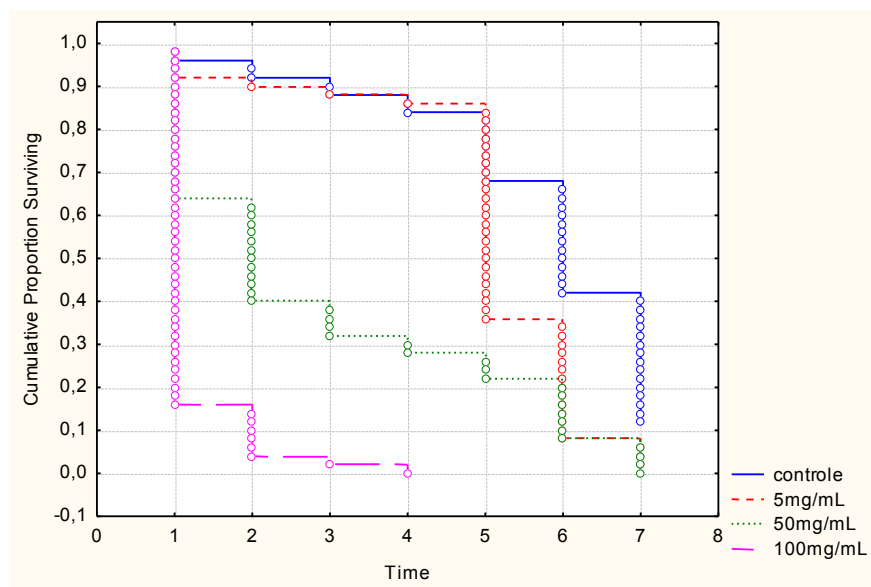


Figura 2.48. Probabilidade de sobrevivência das formigas tratadas com as soluções de timolol (1) em acetona nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL.

Para o carvacrol os resultados foram semelhantes aos encontrados para o timolol, houve alta taxa de mortalidade nas maiores concentrações, 90% ao fim de cinco dias a 100 mg/mL e ao fim de sete dias na concentração de 50,0 mg/mL. O controle para este experimento também apresentou alta taxa de mortalidade, cerca de 75% ao fim de sete dias (**Figura 2.49**).

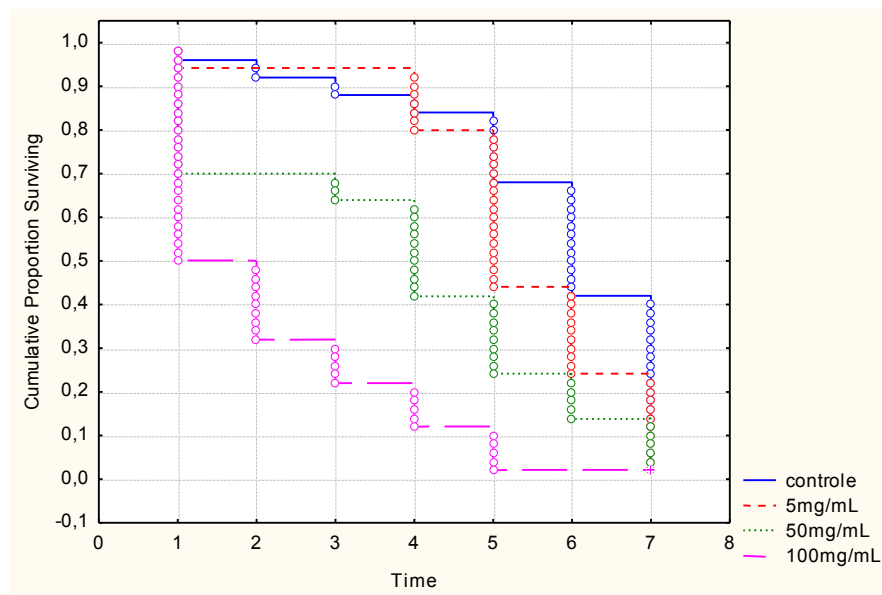


Figura 2.49. Probabilidade de sobrevivência para as formigas tratadas com as soluções de carvacrol (2) em acetona nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL.

O óleo essencial de *B. dracunculifolia* foi tóxico somente na concentração de 100 mg/mL, alcançando uma taxa de mortalidade de 80% ao fim de seis dias. Esta atividade pôde ser atribuída ao seu constituinte majoritário nerolidol, que foi tóxico em todas as concentrações, com taxas de mortalidade de aproximadamente 100% para as concentrações de 50,0 e 100 mg/mL e 90% para 5,0 mg/mL ao fim de sete dias (**Figura 2.50, pág. 210**).

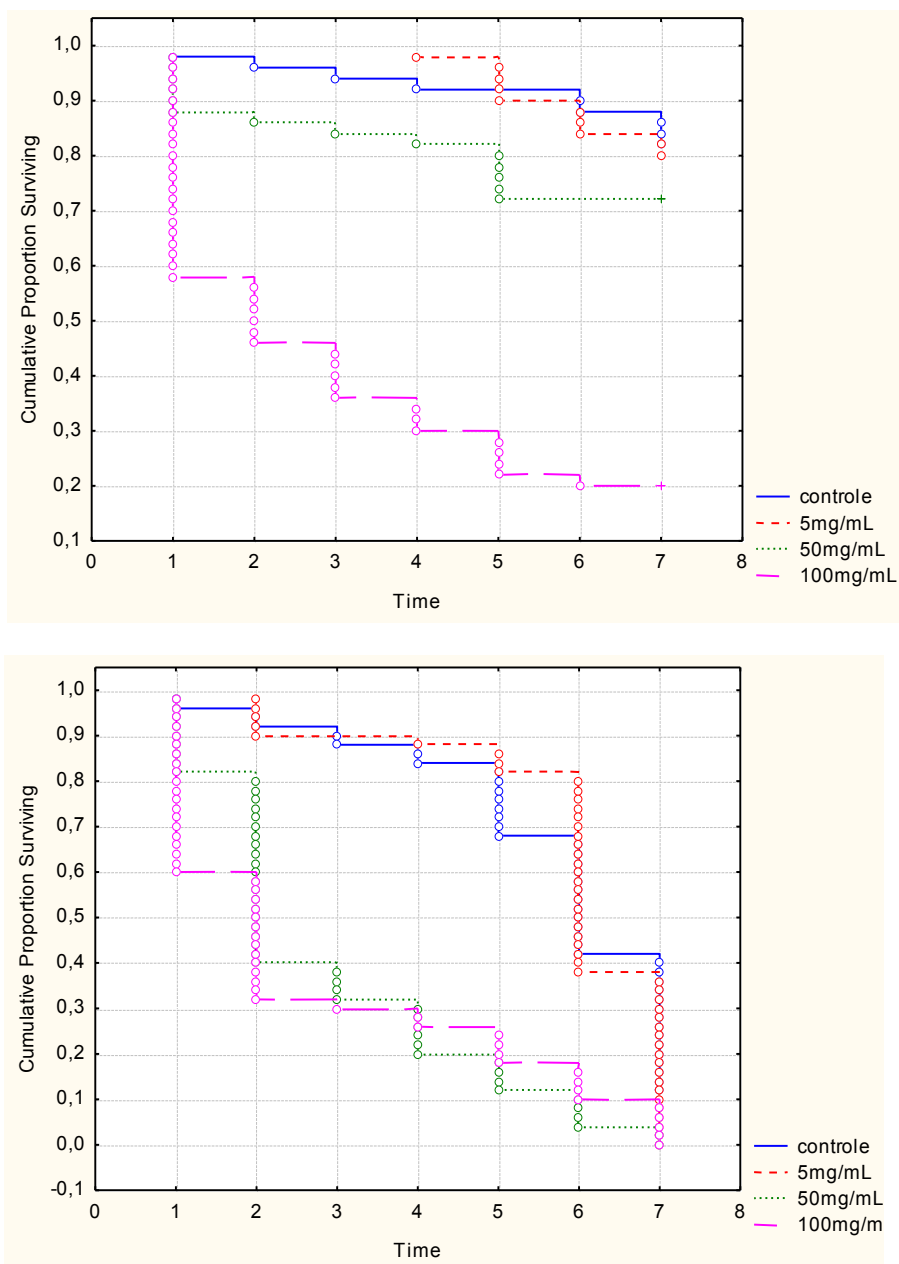


Figura 2.50. Probabilidade de sobrevivência das formigas tratadas com as soluções do óleo essencial de *B. dracunculifolia* (superior) e de nerolidol (inferior) nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL.

Muitas plantas já foram descritas como tendo atividade inseticida contra formigas cortadeiras do gênero *Atta*. *A. conyzoides*, já apresentou atividade para *Atta bisphaerica* (GANDRA et al., 2011), o óleo do fruto da mamoneira (*Ricinus communis* L.) e o óleo de pinhão manso (*Jathropha curcas* L.) foram ativos contra *A. sexdens* (ALONSO; SANTOS, 2013) assim como os extratos de *Mentha piperita* L. (RIBEIRO et al., 2008), os extratos das folhas de *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray já foram descritos como sendo tóxicos para *Atta cephalotes* (CASTAÑO-QUINTANA et al., 2013).

Para *L. triplinervis* não foram encontrados trabalhos que caracterizassem atividades biológicas relacionadas aos seus extratos e ou sobre a atividade inseticida do seu óleo essencial. *B. dracunculifolia* é uma planta extremamente estudada, tanto o óleo essencial como os seus extratos. Isto ocorre devido a grande quantidade de atividades biológicas atribuídas a esta planta e por ser origem da própolis verde (PARK et al., 2004). Apesar da grande quantidade de estudos sobre esta planta, surpreendentemente não foi encontrado na literatura trabalhos sobre sua atividade formicida, sendo esta a primeira descrição de atividades contra formigas para *B. dracunculifolia* e também para *L. triplinervis*.

Diversas substâncias isoladas de plantas já foram identificadas como sendo tóxicas para formigas cortadeiras ou para o seu fungo simbiótico, entre elas a metoxicantin-6-ona isolada de *Simarouba versicolor* (PEÑAFLORES et al., 2009), a xantiletina encontrada em espécies de *Citrus* (CAZAL et al., 2009), o ácido limonexico encontrado em *Spiranthera odoratissima* (TEREZAN et al., 2010) e a sesamina isolada de *Virola sebifera* (BICALHO et al., 2012) (**Figura 2.51, pág. 211**).

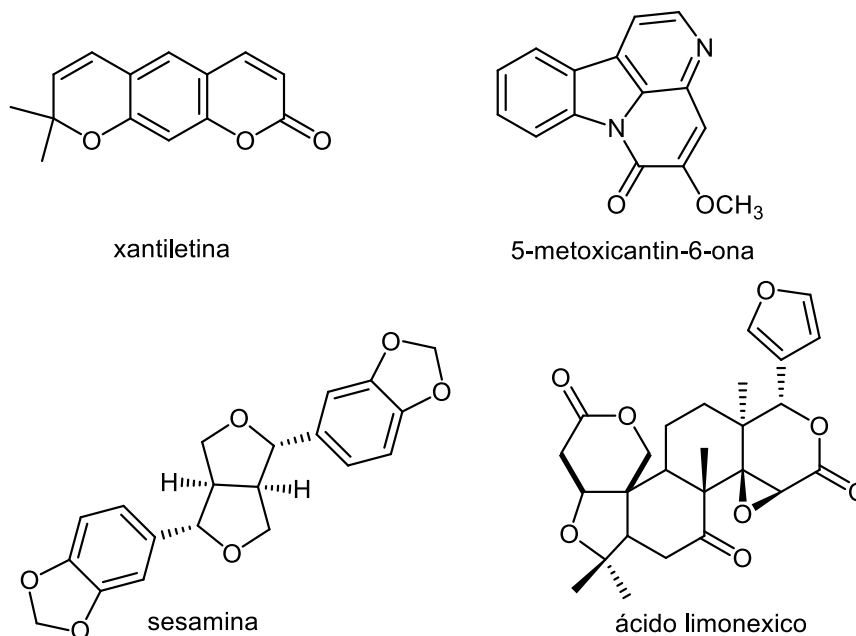


Figura 2.51. Substâncias isoladas de plantas com atividade contra formigas cortadeiras.

Essas substâncias representam apenas uma pequena parcela do largo espectro de compostos ativos, os terpenos, por exemplo, estão descritos na literatura como a classe de produtos naturais com maior quantidade de atividades inseticidas relatadas, compreendendo cerca de 40% dos compostos presentes nas plantas ativas (BOULOGNE et al., 2012).

Para timol e carvacrol, já foi observada ação tóxica contra vários tipos de insetos como carrapatos (MONTEIRO et al., 2009; SENRA et al., 2013), barata (TONG, 2010; TONG; COATS, 2010), cupins (PANDEY et al., 2012); besouros (ROZMAN et al., 2007), entre outros (BOULOGNE et al., 2012). No entanto não foram encontrados trabalhos na literatura atribuindo a estes dois monoterpenóides atividade inseticida contra formigas da espécie *A. sexdens*.

Para o nerolidol apenas di Campli et al. (2012) e Priestley et al. (2006) relataram atividade inseticida, no caso de ambos os trabalhos os ensaios foram realizados contra piolhos.

Os extratos foram pouco ativos, com exceção do extrato hexânico de *M. squarrosa* (**HMS**). Este apresentou taxa de mortalidade de 40,0% para 5,0 mg/mL, 50,0% para 50,0 mg/mL e cerca de 75,0% para 100 mg/mL, ao final de sete dias (**Figura 2.52**).

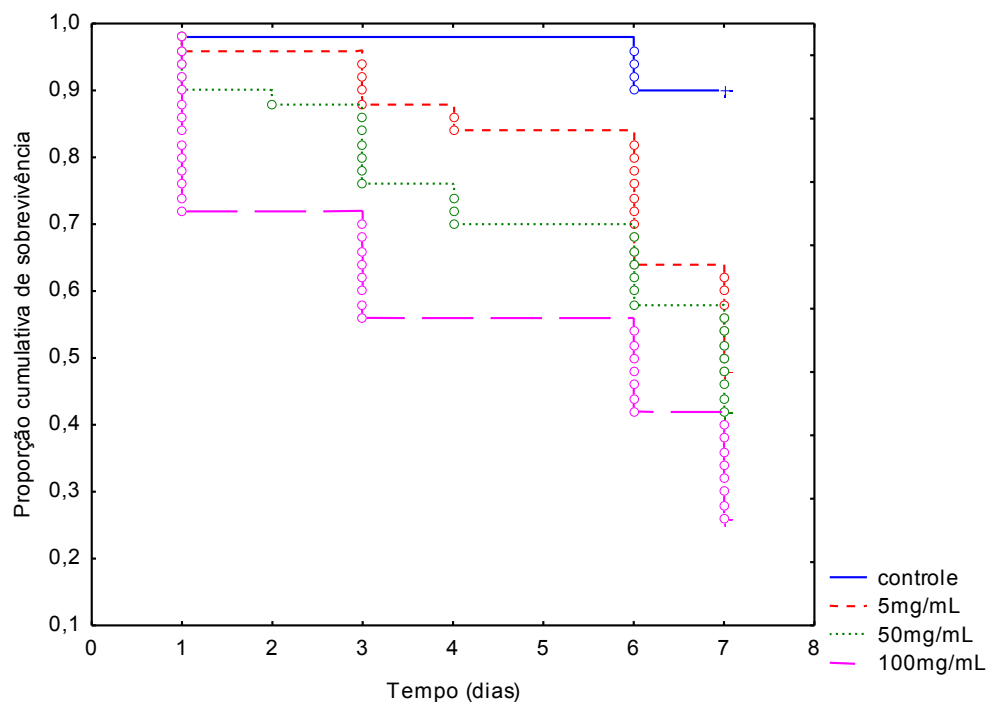


Figura 2.52. Probabilidade de sobrevivência das formigas tratadas com as soluções do extrato bruto hexânico de *Myrsine squarrosa* (**MS**) nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL.

De posse deste resultado, foi realizado mais um experimento de forma a avaliar as frações do extrato bruto de **HMS** obtidas por cromatografia líquida a vácuo (frações de hexano **HHMS**, diclorometano **HDMS**, acetato de etila **HAeMS** e metanol **HMMS**).

Por este novo teste foi possível observar que as frações de **HDMS** e **HAMS** foram muito ativas com taxa de mortalidade igual a 100% ao final de quatro dias para **HDMS** na concentração de 50,0 mg/mL (**Figura 2.53 superior, pág. 213**) e cerca de 95,0% para **HAeMS** nas concentrações de 50,0 e 100 mg/mL (**Figura 2.53 inferior, pág. 213**).

Isto indica que a(s) substância(s) responsável(is) pela atividade formicida deste extrato, possivelmente esteja(m) nestas frações.

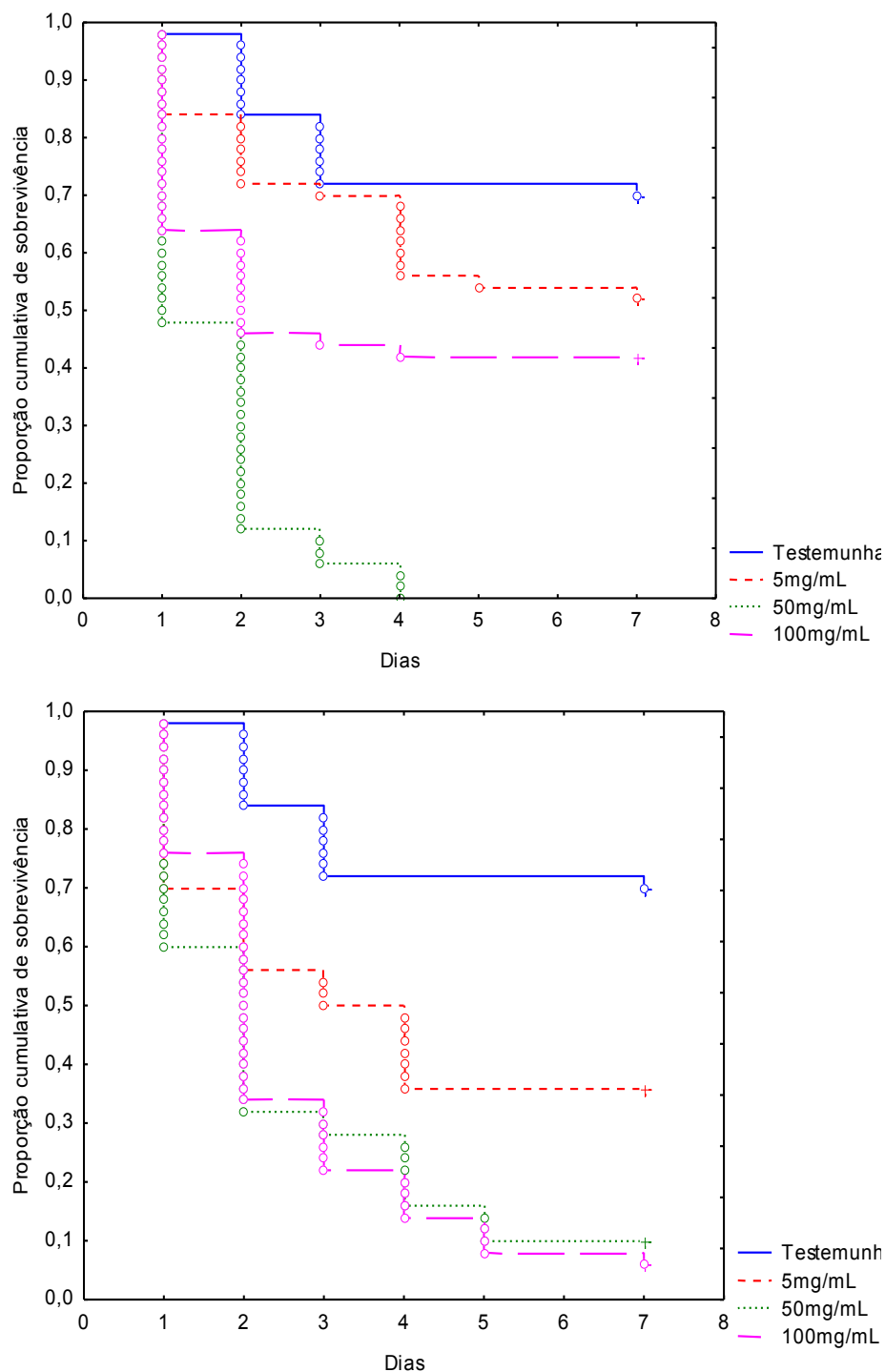


Figura 2.53. Probabilidade de sobrevivência das formigas tratadas com as soluções de **HDMS** (superior) e de **HAeMS** (inferior) nas concentrações de 5,0; 50,0 e 100 mg/mL.

Poucos estudos de atividades biológicas relacionados a *Myrsine* sp. foram encontrados. Embora exista uma grande variedade de substâncias já relatadas na literatura para este gênero (**Capítulo 1, tópico 1.2.2., págs. 23 e 24**), para *M. squarrosa* não foram encontrados trabalhos reportando estudos fitoquímicos ou de atividades biológicas para extratos ou substâncias isoladas desta planta.

Utilizando a metodologia de fracionamento guiado por bioensaio, foi possível determinar as frações **HDMS** e **HAeMS** como sendo as frações ativas presentes no extrato hexânico de *M. squarrosa*. No entanto, a caracterização da substância ou substâncias ativas, presentes nestas frações, não foi possível. Conforme foi visto no **Capítulo 1 (págs. 77 e 78)** foi isolado destas frações um mistura de duas substâncias e não foi possível separá-las o que impossibilitou a caracterização correta destas duas substâncias.

5. Avaliação da Atividade Antioxidante

5.1. Introdução

O estresse oxidativo está associado a várias patologias, desde doenças cardiovasculares, envelhecimento precoce até câncer. Ao longo dos anos, pesquisas têm demonstrado que uma dieta rica em antioxidantes pode ser benéfica para a saúde humana e assim tem-se gerado muito interesse sobre a capacidade antioxidante de produtos naturais (ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Um radical livre é qualquer espécie química capaz de existir de forma independente, que contém um elétron desemparelhado (HALLIWELL, 2005). Existem diversos tipos de radicais livres, dentre eles, podem-se destacar as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) como o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) como os radicais monóxido de nitrogênio e o dióxido de nitrogênio ($NO^{\cdot}$ e $NO_2^{\cdot}$) (HALLIWELL, 2005; VASCONCELOS et al., 2007; NIKI, 2010).

A produção de radicais livres é parte integrante do metabolismo humano e tem importante função biológica, como na fagocitose. No entanto, o desequilíbrio do balanço redox nos sistemas biológicos pode causar o estresse oxidativo, que se torna responsável por induzir diversas patologias como o envelhecimento precoce, transformação e morte celular, indução do câncer, etc. (VASCONCELOS et al., 2007).

O organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que muitas vezes consegue restabelecer e controlar o equilíbrio redox. Entretanto, a redução do nível de antioxidantes, seja por mutações que afetam enzimas antioxidantes de defesa como a superóxido dismutase (ESD) ou a produção excessiva de ERO ou ERN pela exposição a toxinas, favorece o estresse oxidativo e produz efeitos deletérios ao organismo (HALLIWELL, 2005).

Do ponto de vista defensivo, os antioxidantes podem ser classificados como preventivos, sequestrantes e de reparo. Os antioxidantes preventivos funcionam como a primeira linha de defesa, suprimindo a formação de ERO e ERN, como por exemplo, a redução de peróxido de hidrogênio ou de hidroperóxidos lipídicos em água (NIKI, 2010).

Os antioxidantes sequestrantes removem os radicais livres antes que estes ataquem moléculas biológicas essenciais, como fazem os carotenóides que sequestram quimicamente oxigênios singletes, sendo esta uma segunda linha de defesa *in vivo*. Como terceira linha de defesa, algumas enzimas funcionam como antioxidantes de reparo, reparando danos causados pelos processos oxidativos anormais (NIKI, 2010).

Os métodos químicos de avaliação de sequestro de radicais livres são os mais importantes e empregados métodos de análise de atividade antioxidante. São de baixo custo, alta eficiência e rendimento, e permitem comparar diferentes moléculas quanto a sua capacidade em sequestrar radicais (NIKI, 2010; ALARCÓN; DENICOLA, 2013).

Dos métodos químicos para avaliar a capacidade de antioxidantes para sequestrar radicais pode ser utilizado o método do DPPH (sequestro de radicais nitrogênio obtidos do 2,2-difenilpicrilhidrazil), para ERN e a avaliação do sequestro de superóxido para ERO.

O método de DPPH é um método muito simples, que pode ser analisado utilizando um espectrofotômetro comum (NIKI, 2010; ALARCÓN; DENICOLA, 2013). O radical estável 2,2-difenilpicrilhidrazil (**Figura 2.54, pág. 217**) pode ser adquirido comercialmente, sendo solúvel em solventes orgânicos, apresenta coloração azul escura, com banda de absorção típica em 517 nm. A atividade antioxidante é determinada através da capacidade do antioxidante em sequestrar esse radical e assim diminuir a sua presença gerando uma coloração amarela na solução (NIKI, 2010).

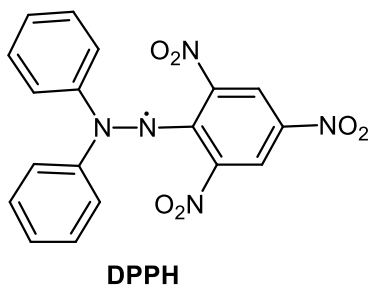


Figura 2.54. Radical DPPH.

O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é considerado uma das espécies reativas de oxigênio mais danosas ao homem, inativando enzimas, degradando o DNA, membranas e polissacarídeos. O estudo do sequestro dos radicais superóxidos pode ser conduzido também de uma forma simples, em bancada, através do método descrito por Beauchamp and Fridovich na década de 1970 (BEAUCHAMP, FRIDOVICH; 1971; ZHISHEN et al., 1999; HUANG et al., 2005).

Neste método, também colorimétrico, é utilizada a riboflavina como geradora fotoinduzida de superóxido, que reduz o NBT (Nitroazul de tetrazólio - amarelo) a formazana (**Figura 2.55**). A capacidade para sequestrar o radical superóxido é determinada quando na presença do antioxidante não ocorre formação da formazana (ZHISHEN et al., 1999; HUANG et al., 2005).

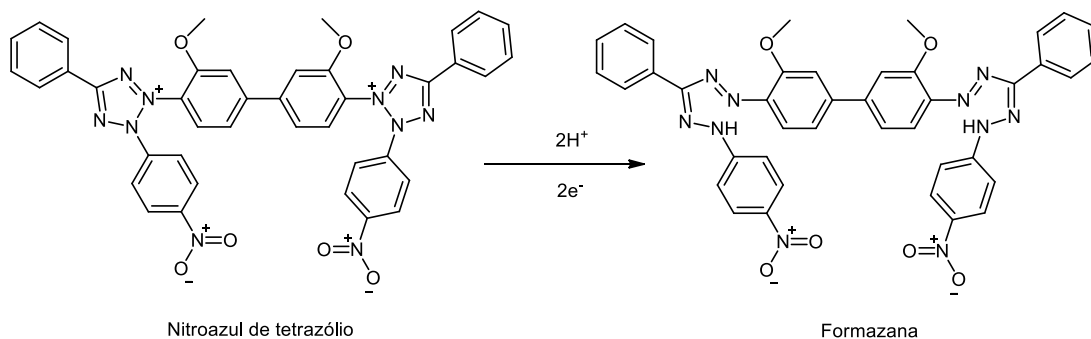


Figura 2.55. Redução do NBT a formazana.

As plantas e líquens desenvolveram ao longo de milhares de anos diversas estratégias de defesa, dentre elas um excelente sistema antioxidante para combater o estresse oxidativo. Estes sistemas podem ser divididos em dois tipos: Enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático utiliza enzimas como a superóxido dismutase, catalase, peroxidase, etc. O sistema não enzimático é o alvo principal da maioria das pesquisas por antioxidantes provenientes de organismos vegetais, nele é possível encontrar moléculas como o α -tocoferol e o ácido ascórbico que são capazes de sequestrar radicais tóxicos aos organismos, produzidos pelo estresse oxidativo (MANDAL et al., 2009).

Neste contexto, nesta parte do trabalho foi avaliada a capacidade do ácido úsnico e do ácido fumarprotocetrárico, isolados do líquen *C. rappii*, para sequestrar ERN e ERO.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Preparo das soluções

Os testes de sequestro de radicais livres foram realizados com o (-)-(S)-ácido úsnico (**3**), ácido fumarprotocetrárico (**4**), ácido rappiídico (**5**) e com o (+)-(R)-ácido úsnico (**6**) adquirido da Sigma-Aldrich. Foram preparadas soluções estoque em metanol:dimetilsulfóxido (92:8) de cada substância, que foram diluídas nas concentrações de trabalho: 6,25; 12,5; 25,0; 50,0; 100 e 200 μM .

5.2.2. Sequestro de superóxido

A capacidade das substâncias em sequestrar o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) foi avaliada em um meio reacional contendo etanol 60%, L-metionina (13,3 mM), nitroazul de tetrazólio (75,0 μM), ácido etilenodiaminotetracético EDTA (100 μM), riboflavina (2,0 μM) e as substâncias a serem avaliadas.

As misturas reacionais foram incubadas por dez minutos a 25 °C na presença de luz fluorescente para induzir a formação de $\text{O}_2^{\cdot-}$. O controle foi obtido nas mesmas condições sem a presença de luz fluorescente. A porcentagem do ânion superóxido sequestrado foi determinada por análise espectrofotométrica em 575 nm.

5.2.3. Sequestro de DPPH

A habilidade de (S)- e (R)-ácido úsnico de sequestrar o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi determinada de acordo com da Silva et al. (2012) com modificações. Cada composto, na concentração desejada, foi adicionado a um meio etanólico contendo 100 μM de DPPH.

O sistema foi mantido em ausência de luz por trinta minutos e a absorbância foi obtida a 517 nm. O resveratrol foi utilizado como controle para o sequestro de radicais livres em ambos os testes e os resultados foram obtidos de três experimentos diferentes, cada um realizado em quadruplicata.

Os testes foram realizados no Grupo de Estudos em Bioquímica de Plantas (GEBioPlan) sob orientação da Profa. Dra. Luzia Valentina Modolo.

5.3. Resultados e Discussões

Foram avaliadas as habilidades do (-)-(S)-ácido úsnico (**3**), ácido fumarprotocetrárico (**4**), ácido rappiídico (**5**) isolados de *C. rappii*, em sequestrar espécies reativas de oxigênio (superóxido) e espécies reativas de nitrogênio (DPPH) (**Figura 2.56**). Os resultados foram comparados com os obtidos para o enantiômero (+)-(R)-ácido úsnico (**6**) e com o composto de referência resveratrol.

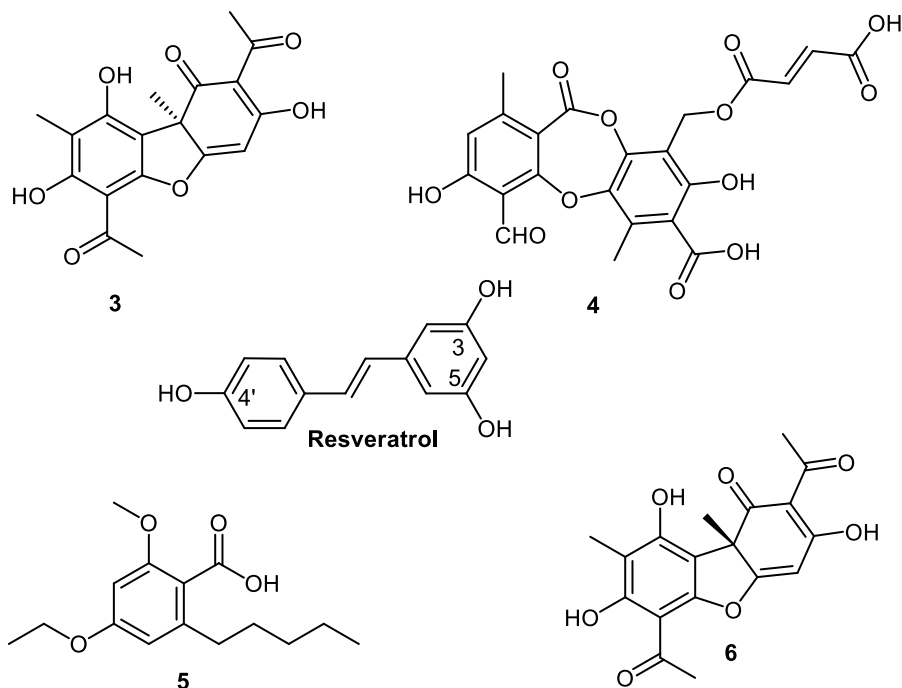


Figura 2.56. Substâncias avaliadas quanto a capacidade de sequestrar radicais livres. O resveratrol foi utilizado como controle positivo.

A capacidade de **3** e **6** em sequestrar o radical superóxido foi maior do que a do resveratrol na concentração de 50,0 μM (14,4; 18,7 e 10,8%; respectivamente), 100 μM (25,1; 31,4 e 10,9; respectivamente) e 200 μM (43,0; 45,3 e 25,15%; respectivamente), sendo **6** ligeiramente mais ativo do que **3** (**Figura 2.57**).

O ácido fumarprotocetrárico (**4**) foi a substância com maior capacidade de sequestrar ERO dentre as substâncias testadas sendo em média 2,5 vezes mais ativo do que o resveratrol, sequestrando até 60% do radical superóxido na concentração mais alta contra 25% do resveratrol. A capacidade de **5** em sequestrar superóxido foi semelhante a do resveratrol, sendo considerado pouco ativo (**Figura 2.57**).

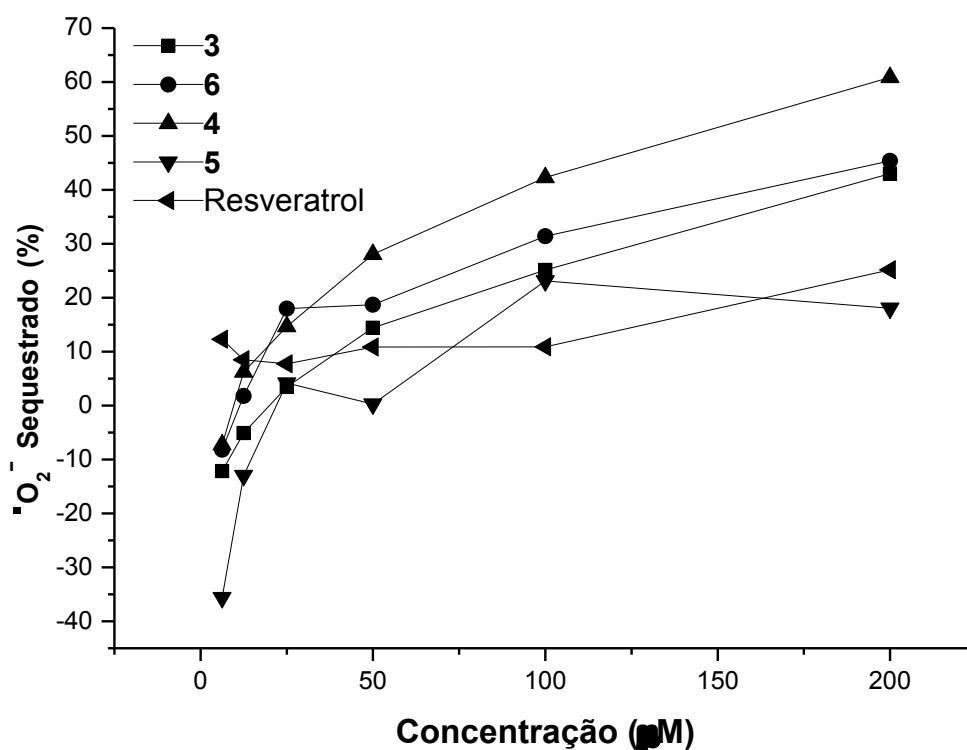


Figura 2.57. Gráfico da capacidade do (-)-(S)-ácido úsnico (**3**), ácido fumarprotocetrárico (**4**), ácido rappiidico (**5**) e (+)-(R)-ácido úsnico (**6**) em sequestrar o radical superóxido comparada com a capacidade do resveratrol.

Diferentemente do que foi observado para o radical superóxido, as substâncias testadas falharam em sequestrar o radical DPPH (**Figura 2.58**). De fato, Kumar e Muller (1999) relataram que o (+)-(*R*)-ácido úsnico (**6**) era incapaz de sequestrar radicais DPPH. Por essa conclusão também é possível expandir esse resultado para o (-)-(*S*)-ácido úsnico (**3**). Além disso, já foi observado que antioxidantes capazes de sequestrar o radical superóxido muitas vezes são pouco ativos ou até mesmo inertes quando testados frente ao DPPH (HUANG et al., 2005).

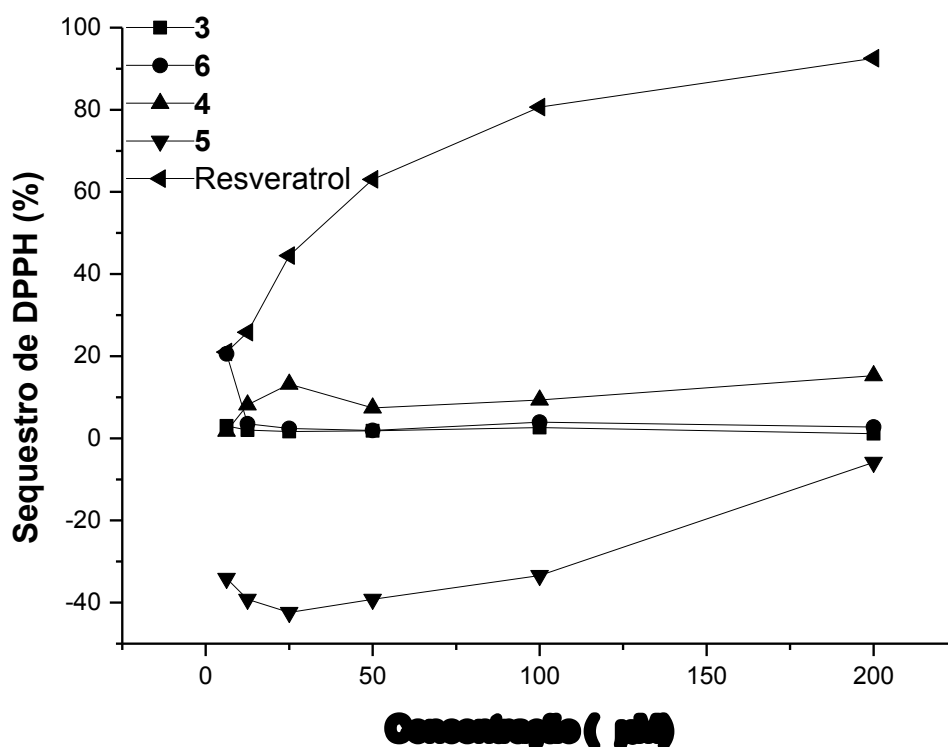


Figura 2.58. Gráfico da capacidade do (-)-(*S*)-ácido úsnico (**3**), ácido fumarprotocetrárico (**4**), ácido rappiídico (**5**) e (+)-(*R*)-ácido úsnico (**6**) em sequestrar o radical DPPH.

A proposta para o mecanismo de sequestro de radicais ERO pelo ácido úsnico e ácido fumarprotocetrárico ainda não é conhecida. Uma das possibilidades seria observar o mecanismo pelo qual os radicais são reduzidos pelos flavonóides, que são reconhecidos agentes antioxidantes. Neste caso, a redução dos radicais livres ocorre através de três caminhos: (i) o potencial para a quelação de metais que é fortemente dependente do arranjo dos grupos hidroxilas e carbonilas ao redor da molécula; (ii) da presença de substituintes hidrogeno-eletrodoadores capazes de reduzir radicais livres e (iii) a habilidade da substância em deslocalizar os elétrons desemparelhados levando à formação de um radical fenoxila estável (MUSIALIKI et al., 2009).

Os flavonóides catecólicos são um bom exemplo para o fator (iii), a redução do radical livre ocorre através da doação de um átomo de hidrogênio fenólico formando um radical fenóxido. No caso dos flavonóides catecólicos este processo se repete com a outra hidroxila e o resultado é uma molécula estável como uma quinona (**Figura 2.59**) (PIETTA, 2000).

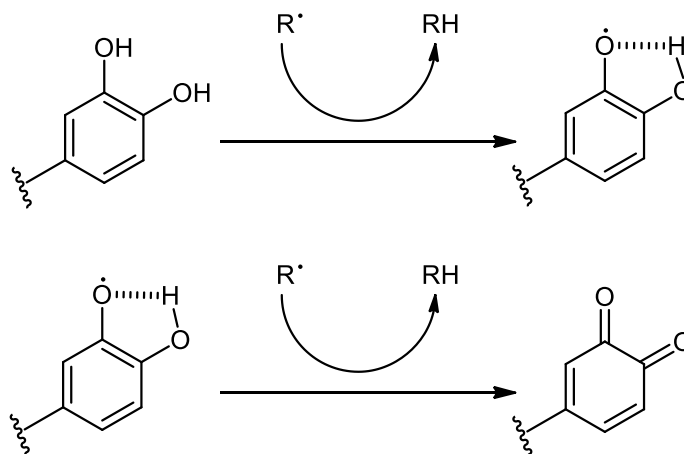


Figura 2.59. Processo de redução dos radicais livres por flavonóides catecólicos.

A presença do grupo catecólico 1,2 no anel B do flavonóide e a ligação dupla conjugada são os responsáveis pela deslocalização eletrônica e assim favorecem o processo de redução do radical livre (PIETTA, 2000). Van Acker e colaboradores (1996) realizaram a comparação entre a atividade antioxidante do kaempferol, com apenas um grupo –OH no anel B, e a quercetina, com dois grupos –OH (**Figura 2.60**) e observaram a influência do grupo 1,2 no aumento da atividade antioxidante. Benzofuranos (classe do ácido úsnico), com padrões de substituição semelhantes aos catecólicos também são mais ativos do que os que não possuem este padrão (RANGASWAMY et al., 2012).

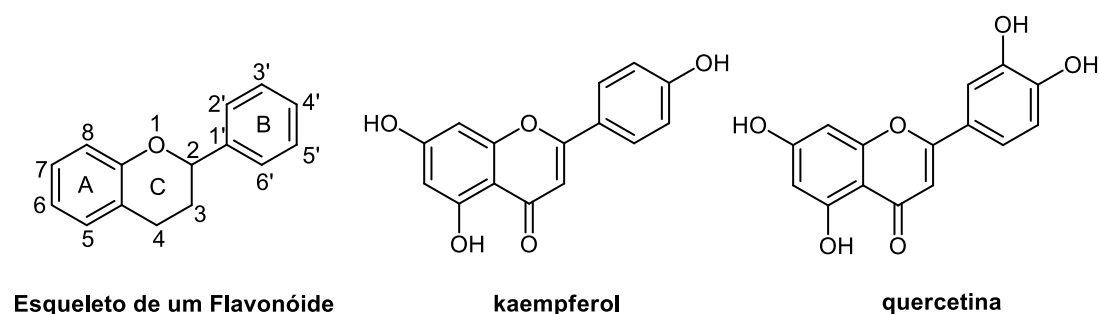


Figura 2.60. Estrutura básica de um flavonóide e estruturas do kaempferol e quercetina.

Seguindo esta linha de pensamento, seria possível expandir a teoria do grupo catecólico 1,2 para compostos com grupos –OH nas posições 1,3, com ligações duplas conjugadas, como o ácido úsnico e o próprio resveratrol. No entanto, isto não ocorre, o processo mecanístico que está envolvido a redução de radicais livres por grupos catecólicos 1,2 com duplas conjugadas não pode ser aplicado a compostos com grupo -OH do tipo 1,3. Através da análise deste mecanismo não é possível chegar a uma estrutura estável como uma quinona (**Figura 2.61, pág. 226**), por isso substâncias com grupos catecólicos tendem a terem atividade antioxidante mais pronunciada do que compostos com grupos –OH nas posições 1,3.

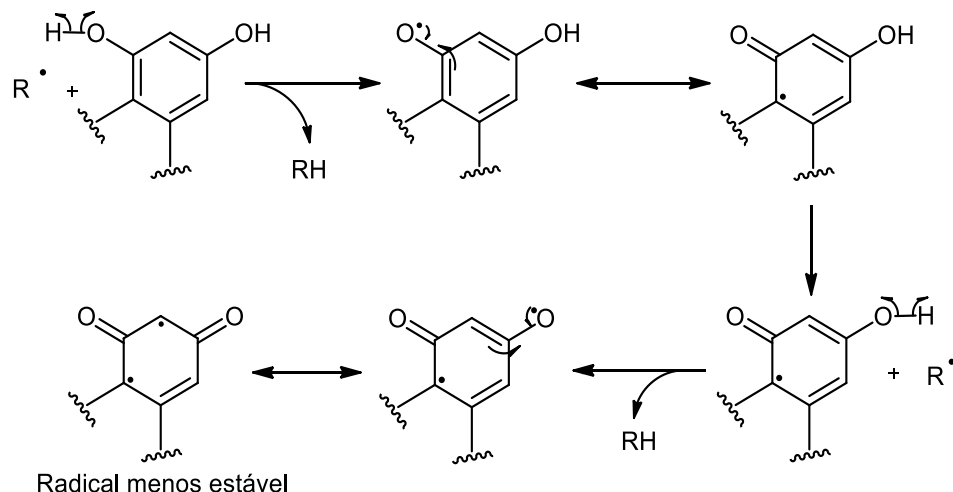


Figura 2.61. Proposta de mecanismo para a redução de radicais livres por grupos –OH nas posições 1,3; levando a uma estrutura *instável*.

Para estilbenos como o resveratrol, sabe-se que o sequestro de radicais livres ocorre preferencialmente pela hidroxila 4' e é relativo à capacidade desta substância em estabilizar o radical arila correspondente (CAO et al., 2012; WU et al., 2013). Assim para o ácido úsnico esta capacidade de estabilização pode estar relacionada às hidroxilas 3 e 7 que geram um radical que pode ser estabilizado por deslocalização de elétrons (**Figura 2.62 a e b, pág. 226**) e também por doação de densidade eletrônica (**Figura 2.62c, pág. 226**).

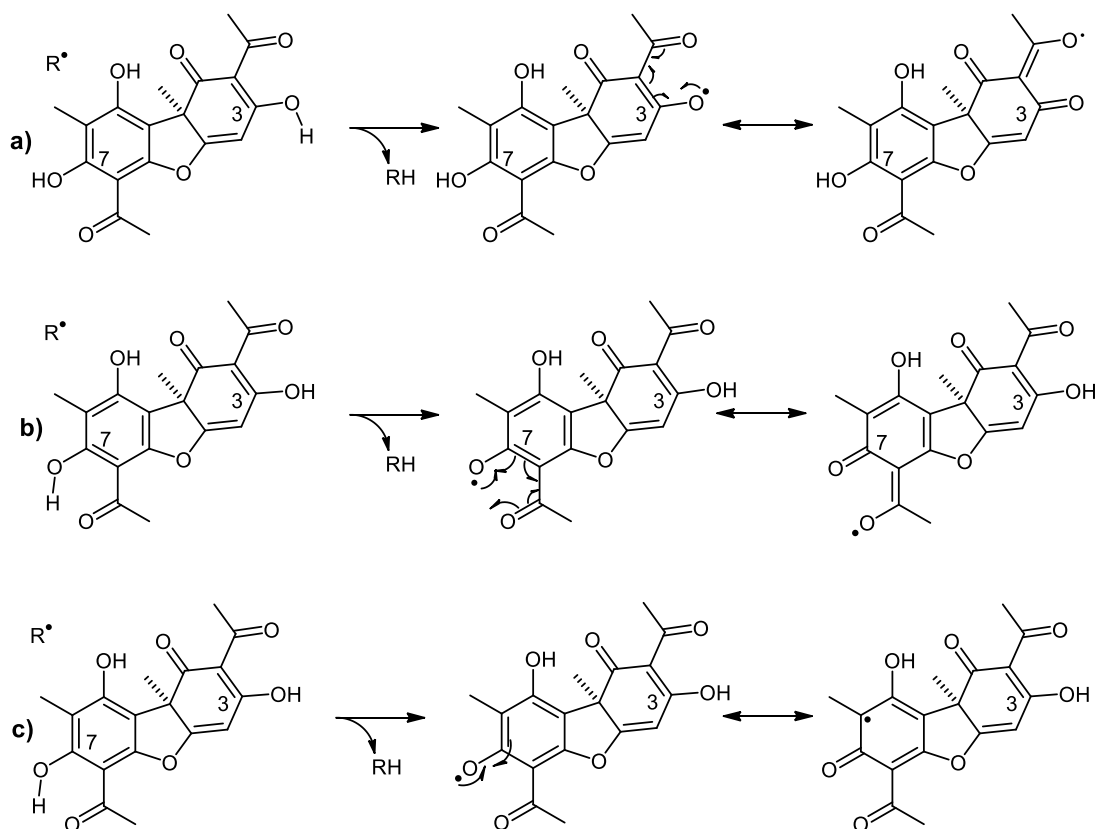


Figura 2.62. Estabilização do radical do ácido úsnico por deslocalização eletrônica (a e b) e por doação de densidade eletrônica (c).

Esta teoria pode ser expandida também para o ácido fumarprotocetrárico (**Figura 2.63**). Deslocalização dos elétrons pode estabilizar essa carga na molécula e assim produzindo um radical estável, capaz de liberar mais facilmente um átomo de hidrogênio.

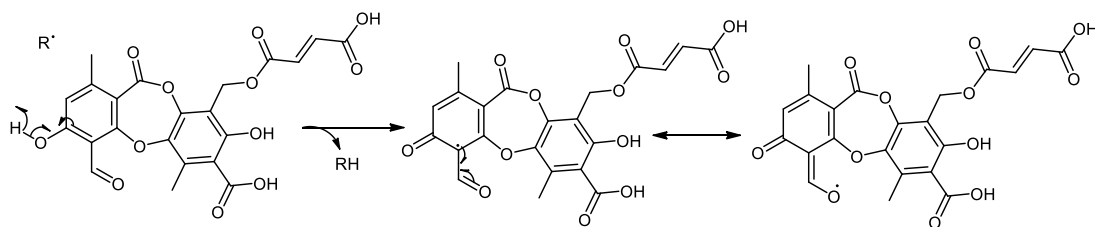


Figura 2.63. Estabilização do radical do ácido fumarprotocetrárico por deslocalização eletrônica.

Além disso, a capacidade do ácido fumarprotocetrárico para sequestrar o radical superóxido foi confirmada recentemente por Kosanic e colaboradores (2014) e também por Alves e colaboradores (2014) que relataram a capacidade desta molécula para atuar como antioxidante, *in vivo* reduzindo a peroxidação lipídica em ratos. Estes resultados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho.

Para o ácido rappedico (**5**) a menor capacidade para sequestrar radicais em relação a **3**, **4** e **6** já era esperada devido a falta de um grupo –OH ligado diretamente ao anel aromático. Muitas vezes a presença de grupos fenólicos em compostos orgânicos é preferível, para que ocorra a neutralização dos processos de iniciação da oxidação pelos radicais livres pela transferência de elétrons ou pela quebra da cadeia de reações radicalares através da transferência de um átomo de hidrogênio (HUSSEIN, 2011; KOSANIC et al., 2014).

A falha destas moléculas em sequestrar DPPH pode estar associada a alguns fatores, dentre eles pode-se citar o mecanismo pelo qual o DPPH é reduzido. Alguns autores relatam que o mecanismo envolvido na redução do DPPH é o de transferência de elétrons e não o de transferência de hidrogênio como ocorre com a redução de radicais superóxidos (ZHISHEN et al., 1999; HUANG et al., 2005; NIKI, 2010).

Isto pode implicar que, devido à capacidade de estabilização de elétrons desemparelhados de **3**, **4** e **6** a transferência de elétrons para o DPPH poderia ser prejudicada o que resultaria em uma baixa capacidade para sequestrar esse radical.

6. Avaliação da Atividade Antiproliferativa

6.1. Introdução

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é principal causa de morte da população, atingindo 7,6 milhões de óbitos no ano de 2008, o que corresponde a 13,0% de todas as mortes ocorridas no mundo. Este número pode chegar a mais de 36 milhões se forem contabilizados os casos que não foram informados (WHO, 2013a). Dentre os tipos de câncer mais letais estão os de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama (SARKAR et al., 2009; WHO, 2013b).

O câncer é caracterizado pela rápida proliferação de células anormais que crescem além de suas fronteiras e então podem invadir órgãos e se espalhar por todo o corpo. As análises moleculares dos tumores humanos e de animais permitiram o entendimento claro dos processos celulares que governam a progressão do ciclo da célula normal e tumoral. De fato, células com câncer não possuem controle sobre a progressão da fase G1, que é o período em que as células decidem se irão se proliferar ou se permanecerão em repouso (**Figura 2.64**) (GOLIAS et al., 2004).

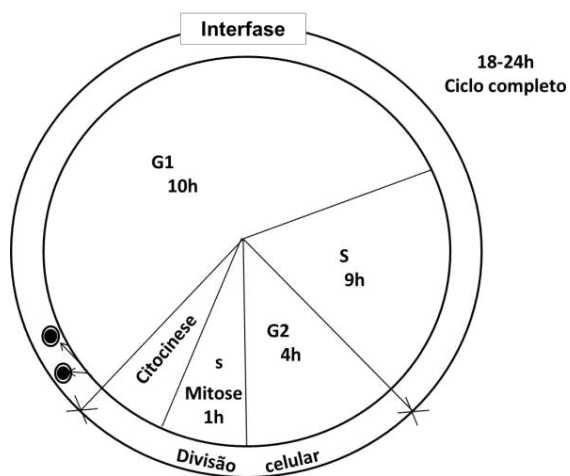


Figura 2.64. Ciclo celular e suas fases.

Os tratamentos quimioterápicos se baseiam no princípio de que as células tumorais se proliferam a uma taxa mais rápida do que as células normais. Dessa forma os quimioterápicos possuem uma toxicidade diferenciada para estas células e reduzem a sua proliferação. No entanto, a morte por câncer é geralmente atribuída ao desenvolvimento de metástase onde ocorre a disseminação das células cancerosas pelo corpo (SARKAR et al., 2009).

Diversas substâncias derivadas de plantas têm sido utilizadas pela população como forma de alívio das principais doenças que acometem o homem. Até o final dos anos 1980 aproximadamente 65% da população mundial utilizava medicamentos naturais ou derivados como primeira escolha para cuidar da saúde. As plantas tem um longo histórico de uso no tratamento do câncer e nos dias de hoje, existem diversos exemplos de substâncias que foram isoladas delas e que são utilizadas como medicamentos para combater esta doença (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Dessas substâncias as mais conhecidas são os alcalóides vincristina e vimblastina, isolados da planta *Catharantus roseus* (L.) G. Don. O paclitaxel é uma das substâncias naturais com maior atividade anticancerígena e foi isolada das folhas de plantas do gênero *Taxus*. Outro exemplo é o da substância Maytansina, isolada de *Maytenus serrata* (Hochst. ex A.Rich.) R.Wilczek, que age ajudando a tubulina a regular os processos de divisão celular. A indirubina pertence a uma classe de substâncias que foram identificadas como princípio ativo de uma planta conhecida como Danggui Longhui Wan, que tem sido utilizada na medicina tradicional chinesa para tratar leucemia. Irinotecan e belotecan são derivados de uma substância conhecida como campotecina, isolada de uma planta ornamental chinesa chamada de *Camptotheca acuminata* Decne. (**Figura 2.65, pág. 230**). Estes e outros exemplos mostram a importância de substâncias naturais no tratamento do câncer (CRAGG et al. 2009; CRAGG; NEWMAN, 2013).

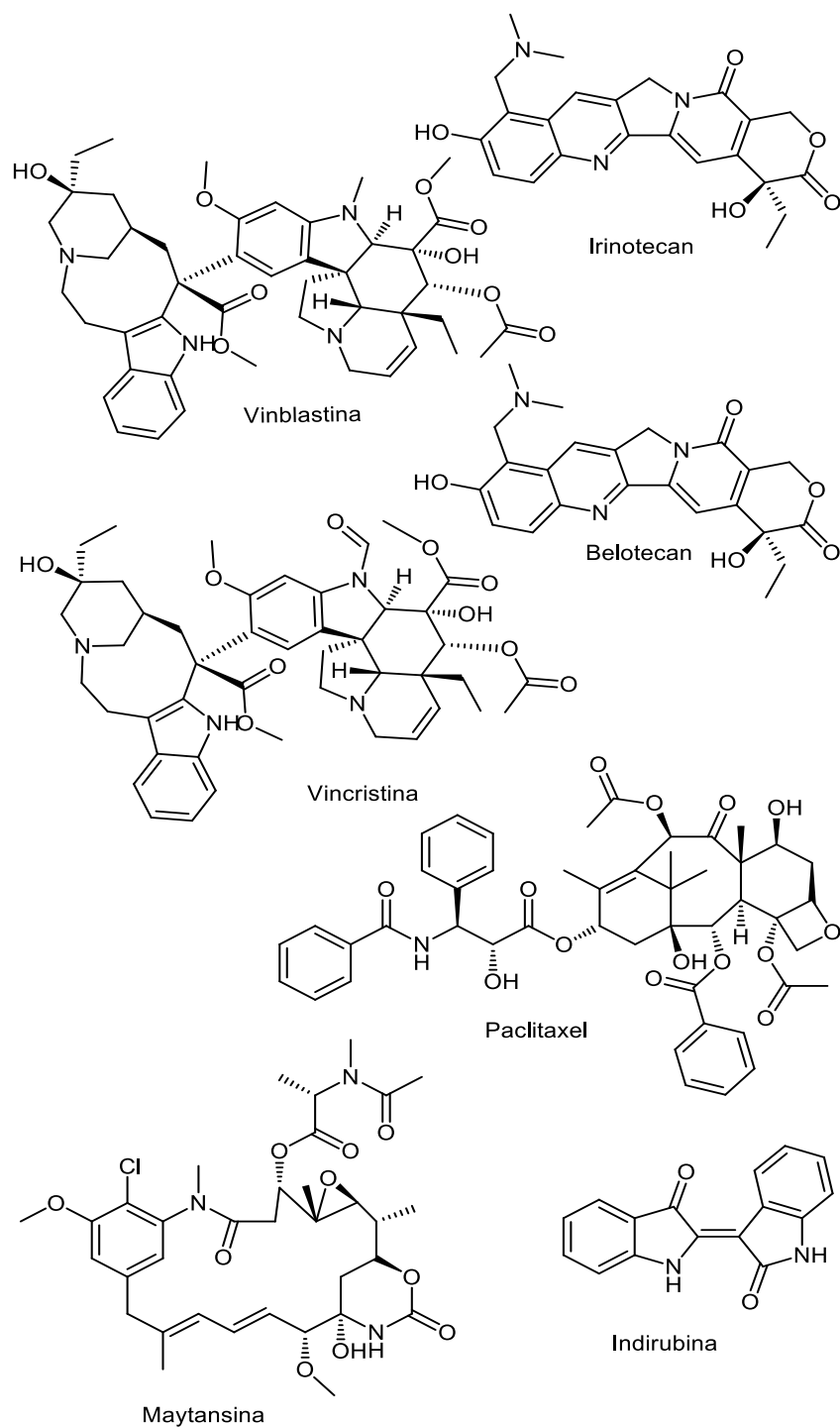


Figura 2.65. Substâncias extraídas de plantas que são utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer.

Assim, nesta parte do trabalho o (-)-(S)-ácido úsnico (**3**) isolado do líquen *C. rappii* e o (+)-(R)-ácido úsnico (**6**), adquirido da Sigma-Aldrich, foram submetidos à avaliação da atividade antiproliferativa de células tumorais.

6.2. Materiais e Métodos

Para realizar os ensaios de atividade antiproliferativa foram utilizados o (-)-(S)-ácido úsnico, o seu enantiômero (+)-(*R*)-ácido úsnico e a droga padrão etoposídeo.

6.2.1. Linhagens celulares

Para a realização do ensaio de atividade antiproliferativa foram utilizadas cinco linhagens celulares. As linhagens de células tumorais BT549 (mama), COLO205 (cólon), NCI-H226 (pulmão), C6 (glioma) e IMR32 (neuroblastoma) foram obtidas do National Cancer Institute – Frederick, MA, USA.

6.2.2. Cultura das células

As culturas estoque cresceram em um meio de cultura RPMI 1640 (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementadas com soro fetal bovino a 5,0% (para BT549, COLO205 e NCI-H226) ou em F-12K (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado por soro bovino a 2,5% e de cavalo a 15,0% (para células C6). Para a célula IMR32, a cultura cresceu em meio de cultura Eagle's Essential (Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino a 10,0%. Em todos os meios de crescimento foram adicionados penicilina (1,0 mg/mL) e estreptomicina (200 U/mL).

6.2.3. Ensaio de atividade antiproliferativa

As células foram adicionadas a uma placa de 96 poços (100 µL de célula por poço) foram expostas ao (-)-(*S*)-ácido úsnico (**3**) e (+)-(*R*)-ácido úsnico (**6**) nas concentrações de 10,0 a 0,0215 µM por 24 horas a temperatura de 37 °C e 5% de CO₂. Após a incubação, as células foram submetidas ao ensaio MTT para a quantificação da proliferação em 540 nm (MOSMANN, 1983).

A concentração de substância que inibe o crescimento celular em 50% (IC₅₀) foi determinada por análise de regressão não linear, utilizando o software ORIGIN 6.0. Como controle foi utilizado o medicamento Etoposídeo (Sigma-Aldrich). Os resultados foram obtidos de dois experimentos independentes, cada um em triplicata. Para análise estatística foi utilizado o software Assistat. As médias dos tratamentos foram comparadas por teste de Anova seguido por teste de Tukey.

Os testes foram realizados na Fundação Ezequiel Dias (FUNED) sob supervisão da Dra. Luciana Maria Silva e do Professor Dr. Ângelo de Fátima da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

6.3. Resultados e Discussões

Tanto o (-)-(S)-ácido úsnico (**3**) quanto o (+)-(R)-ácido úsnico (**6**) foram eficientes em inibir 50% (CI₅₀) do crescimento da cultura cancerosa de cólon. O etoposídeo (**Figura 2.66, pág. 234**), uma droga de referência, não foi ativo contra esta linhagem celular mesmo quando utilizado em concentrações acima de 10,0 µM (**Tabela 2.20**).

Os produtos naturais de líquen foram 1,5 vezes mais potentes do que o etoposídeo para a linhagem de neuroblastoma. As substâncias **3**, **6** e o etoposídeo inibiram menos de 25% do crescimento das células cancerosas de pulmão e glioma, mesmo quando empregadas concentrações acima de 10,0 µM (**Tabela 2.20**).

Tabela 2.20. Concentração de (-)-(S)-ácido úsnico (**3**), (+)-(R)-ácido úsnico (**6**) e etoposídeo necessária para inibir em 50% (CI₅₀) a proliferação de células tumorais humanas

Linhagem celular	CI ₅₀ * (µM)		Etoposídeo
	(3)	(6)	
BT549 (Mama)	ND	ND	ND
COLO (Colon)	0,18±0,09	0,13±0,05	ND
NCI-H226 (Pulmão)	ND	ND	ND
C6 (Glioma)	ND	ND	ND
IMR32 (Neuroblastoma)	0,36±0,06	0,35±0,3	0,51±0,19

*ND = Não Determinado. A inibição da proliferação celular foi < 50% para a concentração máxima testada para os ácidos úsnicos (10 µM) ou etoposídeo (5 µM).

O etoposídeo é um composto semissintético derivado do produto natural podofilotoxina (**Figura 2.66, pág. 234**), uma lignana ariltetralínica, encontrada nas raízes de *Podophyllum peltatum* L. (LIU et al., 2007). Esta substância faz parte da história recente da descoberta de substâncias anticancerígenas e passou a ser sintetizado pela Sandoz em 1970, para reduzir o efeito tóxico gastro-intestinal causado pela podofilotoxina.

Em geral, os derivados semissintéticos da podofilotoxina interagem com a tubulina e bloqueiam a mitose no final da fase S ou início da fase G₂, devido à ligação destes com a topoisomerase II, inibindo que essa enzima complete sua função e repare as duas fitas de DNA que foram previamente quebradas (BRANDÃO et al., 2010).

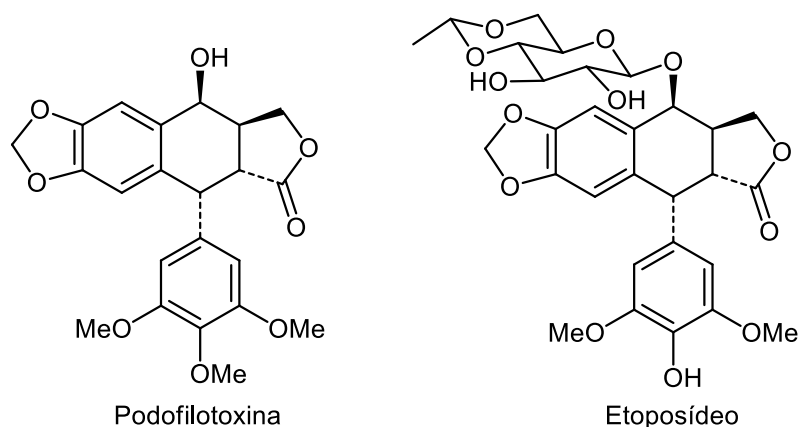
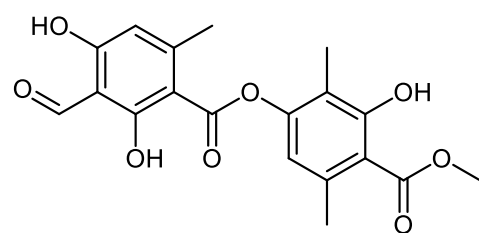
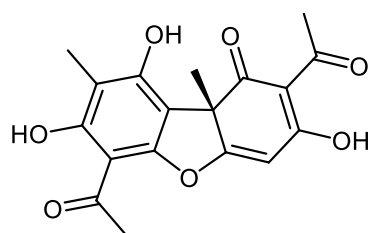


Figura 2.66. Estruturas das lignanas ariltetralínicas podofilotoxina e etoposídeo.

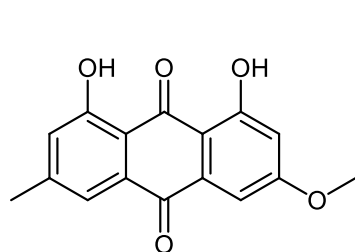
A atividade citotóxica dos metabólitos secundários de líquens tem sido estudada a mais de três décadas, no entanto os mecanismos moleculares a que estas substâncias estão envolvidas ainda não estão bem esclarecidos. No entanto, Backorová e colaboradores (2011), testaram, com sucesso, o efeito antiproliferativo do (+)-(*R*)-ácido úsnico e de outros metabólitos de líquens como a atranorina, o ácido girofórico e a parietina (**Figura 2.67, pág. 235**) e concluíram que a atividade destas substâncias está associado à indução da apoptose.



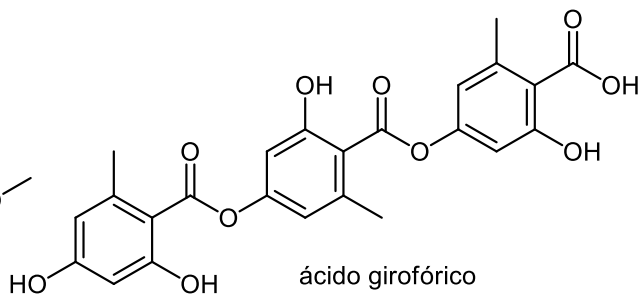
atranorina



(+)-(R)-ácido úsnico (7)



parietina



ácido girofórico

Figura 2.67. Metabólitos de líquen que possuem atividade antitumoral.

7. Conclusões

Todo o trabalho em fitoquímica de produtos naturais envolve um conjunto de conhecimentos multidisciplinares que, além do isolamento e caracterização de substâncias, englobam a necessidade de realizar ensaios biológicos rápidos que possam indicar e direcionar o isolamento de uma substância com atividade biológica específica.

O Professor Meinwald, um dos mais respeitados e pioneiros estudiosos em Química Ecológica, sempre defendeu a multidisciplinaridade existente na química de produtos naturais e sempre dizia: “Os químicos necessitam conversar com os biólogos, eles podem oferecer valiosas orientações sobre onde começar” (COLEGATE; MOLYNEUX, 2008; ROUHI, 2003).

Desta forma, no Capítulo 1 foram realizadas as caracterizações de alguns metabólitos secundários identificados nas espécies estudadas. Estas caracterizações foram a etapa chave para uma busca estratégica de substâncias bioativas presentes nas plantas e no líquen coletados no PESB e na UFV.

Assim, no Capítulo 2, a bioprospecção de metabólitos secundários levou à determinação de atividades fungicida para *Lippia triplinervis* e *Baccharis platypoda*, acaricida para *Baccharis dracunculifolia* e *L. triplinervis*, formicida para *Myrsine squarrosa*, *L. triplinervis* e *B. dracunculifolia* e antioxidante e antiproliferativa para *Cladonia rappii*. Em todos os casos foram encontradas as substâncias ativas presentes nas espécies estudadas.

Referências Bibliográficas

ABAD, M. J.; BERMEJO, P. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v. vii, p.76-96, 2007.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, Allured Publishing Corporation: Illinois, 4th ed., 2007, 804p.

ADONGO, J. O.; NJUE, A. W.; OMOLO, J. O.; CHEPLOGOI, P. K.; OTAYE, D. O. In vitro inhibition of *Botrytis cinerea* – causative agent for grey mold by crude extracts of basidiomycetes fungi. **Science Journal of Biotechnology**, v. 2012, p.1-3, 2012.

AHARONI, A.; GIRI, A. P.; VERSTAPPEN, F. W. A.; BERTEA, C. M.; SEVENIER, R.; SUN, Z.; JONGSMA, M. A.; SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, H. J. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species. **The Plant Cell**, v. 16, p. 3110-3131, 2004.

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; BOUWMEESTER, H. J. Volatile science? Metabolic engineering of terpenoids in plants. **Trends in Plant Science**, v.10, n.12, p. 594-602, 2005.

AL-JA'FARI, A-H.; VILA, R.; FREIXA, B.; TOMI, F.; CASANOVA, J.; COSTA, J.; CAÑIGUERL, S. Composition and antifungal activity of the essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*. **Phytochemistry** v. 72, p. 1406-1413, 2011.

ALONSO, E. C.; SANTOS, D. Y. A. C.; *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) seed oil toxicity against *Atta sexdens rubropilosa* (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotoxicology**, v. 106, n. 2; p.742-746, 2013.

ALVES, G. M. B.; MIA, M. B.; FRANCO, E. S.; GALVÃO, A. M.; SILVA, T. G.; GOMES, R. M.; MARTINS, M. B.; FALCÃO, E. P. S.; CASTRO, C. M. M. B.; SILVA, N. H. Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 27, p.139-143, 2014.

ALVES, R. C.; DEL PONTE, E. M. (Ed.) Fitopatologia.net - herbário virtual. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. Disponível na Internet: <http://www6.ufrgs.br/agronomia/fitossan/fitopatologia/ficha.php?id=256>. Acesso em: 16 de maio 2009.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p.1679-87, 2005.

ARTHUR, H.; JOUBERT, E.; DE BEER, D.; MALHERBE, C. J.; WITTHUHN, R. C. Phenylethanoid glycosides as major antioxidants in *Lippia multiflora* herbal infusion and their stability during steam pasteurization of plant material. **Food Chemistry**, v. 127, p. 581-588, 2011.

AUSTIN M. B.; NOEL, J. P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 79-110, 2003.

BACKOROVÁ, M.; BACKOR, M.; MIKES, J.; JENDZELOVKY, R.; FEDOROCKO, P. Variable responses of different human cancer cells to the lichen compounds parietin, antranorin, usnic acid and gyrophoric acid. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 37-44, 2011.

BAERSON, S. R.; SCHRODER, J.; COOK, D.; RIMANDO, A.; PAN, Z.; DAYAN, F. E.; NOONAN, B. P.; DUKE, S. O. Alkylresorcinol biosynthesis in plants: New insights from an ancient enzyme family? **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 10, p. 1286-1289, 2010.

BAILEY, J. A.; JEGER, M. J.; **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Wallingford: CAB Int. 1992. In: FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* Species Responsible for Anthracnose Diseases of Various Fruits. **Plant Disease**, v. 82, n. 6, p. 596-605, 1998.

BALBI-PEÑA, M. I.; STANGARLIN, J. R.; BECKER, A.; FRANZENER, G.; LOPES, M. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; Controle de *Alternaria Solani* em Tomateiro por Extratos de *Curcuma Longa* e Curcumina - II. Avaliação in Vivo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n.4, p. 401-404, 2006.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos**. Viçosa-MG: Editora UFV, 2007, 189p.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**, 1ª ed., Viçosa: Editora UFV, 2004, 215 p.

BARBOSA, L. C. A.; TEIXEIRA, R. R.; MONTANARI, R. M. Phytotoxic natural products as models for the development of crop protection agents. In: **Current Trends in Phytochemistry**. Epifano, F.; ed. Kerala: Research Signpost, 2008, cap. 2, 21-59.

BARROSO, G. M. Compositae-Subtribo Baccharidinae Hoffmann. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguésia**, v. 28, p. 1-273, 1976.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BENCHAAAR, C.; GREATHEAD, H. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 166-167, p.338-355, 2011.

BENNETT, G.F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). I Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v.16, p.52-61, 1974.

BIAVATTI, M. W.; MARENSI, V.; LEITE, S. N.; REIS, A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n. 4, p. 640-653, 2007.

BICALHO, K. U.; TEREZAN, A. P.; MARTINS, D. C.; FREITAS, T. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; Evaluation of the toxicity of *Virola Sebifera* crude extracts, fractions and isolated compounds on the nest of leaf-cutting ants. **Psyche**, v.2012, p.1-7, 2012.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? **American journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BLOCK, S.; BACCELLI, C.; TINANT, B.; MEERVELT, L.; ROZEMBERG, R.; JIWAN, J. L. H.; LLABRÉS, G.; PAUW-GILLET, M-C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Diterpenes from the leaves of *Croton zambesicus*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1165-1171, 2004.

BOTELHO, M.A.; NOGUEIRA, N.A.P.; BASTOS, G.M.; FONSECA, S.G.C.; LEMOS, T.L.G.; MATOS, F.J.A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V.S.; BRITO, G.A.C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 349-356, 2007.

BOUCHRA, C.; ACHOURI, M.; HASSANI, L.M.I; HMAMOUCI. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 165-169, 2003.

BOULOGNE, I.; PETIT, P.; LAFONTAINE, H. O.; DESFONTAINES, L.; MERCIRIS, G. L. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. **Environmental Chemical Letters**, v.10, p. 325-347, 2012.

BOUSTIE, J.; TOMASI, S.; GRUBE, M. Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. **Phytochemistry Reviews**, v.10, p.287-307, 2011.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, p. 1359-1369, 2010.

BREHM-STECHER, B. F.; JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.3357-3360, 2003.

BRIGGS, G. G. **Predicting uptake and movement of agrochemicals from physical properties**. Palestra no encontro SCI: Uptake of Agrochemicals and pharmaceuticals, belgrave square, London, England, 9th December, 1997.

BRIGHENTE, I. M. C.; DIAS, M.; VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n.2, p.156-161, 2007.

BRITTO, L. G.; NETTO, F. G. S.; OLIVEIRA, M. C. S. O.; BARBIERI, F. S. **Bio-ecologia, importância médico veterinária e controle de carrapatos com ênfase no carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. Porto Velho: EMBRAPA, 2006, 24p.

BUDEL, J. M., DUARTE, M. R., SANTOS, C. A. M., FARAGO, P. V., MATZENBACHER, N. I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I-Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 268-271, 2005.

BURGUER, M. C. M.; OLIVEIRA, G. S.; MENEZES, A. C. S.; VIEIRA, P. C.; da SILVA, M. F. G. F.; VEIGA, T. M. Ácido myrsinoico A e derivado: Inibidores da fotossíntese *in vitro*. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1395-1400, 2012.

BUTLER, M. S.; BUSS, A. D. Natural products – The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, v.71, p.919-929, 2006.

CAIAFA, A. N.; da SILVA, A. F. Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais – Brasil. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 163-173, 2005.

- CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; MACIEL, M. V.; COSTA, C. T. C.; MACEDO, I. T.F.; OLIVEIRA, L. M. B.; BRAGA, R. R.; SILVA, R. A.; VIEIRA, L. S. Antihelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. **Veterinary Parasitology**, v. 148, p. 288–294, 2007.
- CAO, X-Y.; YANG, J.; DAI, F.; DING, D-J.; KANG, Y-F.; WANG, F.; LI, X-Z.; LIU, G-Y.; YU, S-S-; JIN, X-L.; ZHOU, B. Extraordinary radical scavengers: 4-Mercaptostilbenes. **Chemistry A European Journal**, v. 18, p. 5898-5905, 2012.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The fungi**, London: Academic Press, 2nd ed., 588p., 2006.
- CARMONA, F.; ANGELUCCI, M. A.; SALES, D. S.; CHIARATTI, T. M.; HONORATO, F. B.; BIANCHI, R. V.; PEREIRA, A. M. S. *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown hydroethanolic extract of the leaves is effective in the treatment of migraine in women. **Phytomedicine**, v. 20, p. 947-950, 2013.
- CARVALHO, A. F.; MELO, V. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. Mem. **Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 569–571, 2003.
- CARVALHO, E. A. B., ANDRADE, P. P.; SILVA, N. H.; PEREIRA, E. C.; FIQUEIREDO, R. C. B. Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: An ultrastructural study. **Micron**, v. 36, p. 155-161, 2005.
- CASTAÑO-QUINTANA, K.; MONTOYA-LERMA, J.; GIRALDO-ECHEVERRI, C. Toxicity of foliage extracts of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) on *Atta cephalotes* (Hymenoptera:Myrmicinae) workers. **Industrial Crops and Products**, v.44, p. 391-395, 2013.
- CAVALCANTI, S. C. H.; NICOLAU, E. D. O. S. S.; BLANK, A. F.; CÂMARA, C. A. G.; ARAÚJO, I. N.; ALVES, P. B. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technology**, v. 101, p.829-832, 2010.

CAZAL, C. M.; DOMINGUES, V. C.; BATALHÃO, J. R.; BUENO, O. C.; FILHO, E. R.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B. Isolation of Xanthyletin, an inhibitor of ants simbiotic fungus, by high –current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p.4307-4312, 2009.

CETIM, H.; CILEK, J. E.; OZ, E.; AYDIN, L.; DEVECI, O.; YANIKOGLU, A. Acaricidal activity of *satureja thymbra* L. essential oil and its major components, carvacrol and γ -terpinene against adult *Hyalomma marginatum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 170, p. 287-290, 2010.

CHANDA, S.; RAKHOLIYA, K. Combination therapy: Synergism between natural plant extracts and antibiotics against infectious diseases. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (Org.). **Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances**. Badajoz:Formatex, 2011, 656p.

CHARNEI, A. M.; ELIASARO, S. Verticillate *Cladonia* species (Lichenized Ascomycota) from high-altitude environments of Serra do Mar in Southern Brazil. **Hoehnea**, v. 40, n. 1, p.87-97, 2003.

CHEN, S.; MARSTON, A.; STUPPNER, H. (Org.). Handbook of chemical and biological plant analytical methods. Chichester:John Wiley & Sons, 2014, 1176p.

CHOMA, I. M.; GRZELAK, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p2684-2691, 2011.

CHUTIA, M.; BHUYAN, D.; PATHAK, M. G.; SARMA, T. C.; BORUAH, P. Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT-Food Science Technology**, v. 42, p. 777-780, 2009.

CLARKE, E. D.; DELANEY, J. S. Physical and molecular properties of agrochemicals: An analysis of screen inputs, hits, leads, and products. **Chimia**, v. 57, n.11, p. 731-734, 2003.

CLSI. Clinical and Laboratory Standarts Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Method M27-A2**, 3rd ed.; Wayne, Pennsylvania, 2008a, v.28, n.14, p. 1-25.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antifungal disk diffusion susceptibility testing of non-dermatophyte filamentous fungi Method M51-A**, 1st ed.; Wayne, Pennsylvania, 2010, v.30, n.11, p. 1-29.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Method M38-A**, 2nd ed.; Wayne, Pennsylvania, 2008b, v.28, n.16, p. 1-35.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. (Org.). **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination**. New York: CRC Press, 2008, 622p.

COLL, J. C.; BOWDEN, B. F. The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. **Journal of natural Products**, v. 49, n. 5, p. 934-936, 1986.

COMBRINCK, S.; REGNEIR, T.; KAMATOU, G. P. P. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 344-349, 2011.

COMPADRE, C. M.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D.; KAMATH, S. K. Hernandulcin: An intensely sweet compound discovered by review of ancient literature. **Science**, v.227, p. 417-419, 1985.

CONSTANTINO, I.; BARLOCCO, D. Privileged structures as leads in medicinal chemistry. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 65-85, 2006.

COPPING, L. G.; DUKE, O. S. Natural products that have been used commercially as crop protection agent. **Pest Management Science**, v. 63, p. 524-554, 2007.

CORDEIRO, L. M. C.; REIS, R. A.; CRUZ, L. M.; STOCKER-WORGOTTER, E.; GRUBE, M.; IACOMINI, M. Molecular studies of photobionts of selected lichens from the coastal vegetation of Brazil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, p. 381-390, 2005.

CORNWELL, P. A.; BARRY, B. W. Sesquiterpene components of volatile oils as skin penetration enhancers for the hydrophilic permeant 5-fluorouracil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, p.261–269, 1994.

COSTA, J. L. da S. Aplicação de Fungicidas via Tratamento de Sementes para o Controle da Antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), **EMBRAPA**, Aracajú, SE, p. 14, 2002. Disponível em <http://www.cpatc.embrapa.br>

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical reviews**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p.3670-3695, 2013.

CROCOLL, C. **Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome p450s in oregano and thyme**. 2010. 151f. Tese (Doutorado em Biologia) – Max Planck Institut für Chemische Ökologie, Alemanha, 2010.

CURD, F.; ROBERTSON, A. Usnic acid. Part III. Usnetol, usnetic acid, and pyrousnic acid. **Journal of the Chemical Society**, p.1173-1179, 1933.

da SILVA, D. L.; REIS, F. S.; MUNIZ, D. R.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SABINO, A. A.; MODOLO, L. V.; de FÁTIMA, A. Free radical scavenging and antiproliferative properties of Biginelli adducts. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2645-2650, 2012.

DAEMON, E.; MATURANO, R.; MONTEIRO, C. M. O.; GOLDNER, M. S.; MASSONI, T. Acaricidal activity of hydroethanolic formulations of thymol against *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 186, p. 542-545, 2012a.

DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; ROSA, L. S.; CLEMENTE, M. A.; ARCOVERDE, A. (2009) Evaluation of the acaricide activity of thymol on engorged and unengorged larvae of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 105, p. 495–497, 2009.

DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; SENRA, T. O.; CALMON, F.; FAZA, A.; AZEVEDO, P. M. C.; GEORGOPOULOS, S. L.; OLIVEIRA, L. F. Spectroscopic evaluation of thymol dissolved by different methods and influence on acaricidal activity against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p.1901-1906, 2012b.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oil on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44, 2003.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C.; CROUS, P.W. The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, p. 32-113, 2012.

DAYAN, F. E.; CANTRELL, C. L. DUKE, S. O. Natural products in crop protection. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p. 4022-4034, 2009.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 286-295, 2008.

DEISING, H. B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S. F. Mechanisms and Significance of Fungicide Resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 289 - 295, 2008.

DELLA LUCIA, T. M. C.; GANDRA, L. C.; GUEDES, R. N. C. Managing leaf-cutting ants: peculiarities, trends and challenges. **Pest Management Science**, v. 70, p. 14-23, 2014.

DELLA LUCIA, T. M. C.; VILELA, E. F.; ANJOS, N.; MOREIRA, D. D. O. **Criação de formigas cortadeiras em laboratório**. In: Della Lucia, T. M. C. (Org.). Formigas Cortadeiras. Folha de Viçosa, Viçosa, Brasil, p. 151-162, 1993.

DELLA LUCIA, T. M. C.; SOUZA, D. J. Importância e história de vida das formigas-cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T. M. C. (Ed). **Formigas cortadeiras. Da biologia ao Manejo**. UFV, Viçosa – MG, p. 14-26, 2011.

DEWICK, P. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**. 3nd ed. West Sussex: Jhon Wiley & Sons, 2009, 539p.

di CAMPLI, E.; di BARTOLOMEO, S.; PIZZI, P. D.; di GIULIO, M.; GRANDE, R.; NOSTRO, A.; CELLINI, L. Activity of tea tree oil and Nerolidol alone or in combination against *Pediculus capitis* (Head Lice) and its eggs. **Parasitology Research**, v. 111, p.1985-1992, 2012.

DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus anulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, p. 130–133, 1973.

DUKE, S. O.; CANTRELL, C. L.; MEEPAGALA, K. M.; WEDGE, D. E.; TABANCA, N.; SCHRADER, K. K. Natural toxins for use in pest management. **Toxins**, v. 2, p. 1943-1962, 2010.

EDWARDS, H. G. M.; NEWTON, E. M.; WYNN-WILLIAMS, D. D. Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 651-653, p. 27-37, 2003.

EID, S. Y.; EL-READI, M. Z.; WINK, M. Synergism of three-drug combinations of sanguinarine and other plant secondary metabolites with digitoxin and doxorubicin in multi-drug resistant cancer cells. **Phytomedicine**, v.19, p.1288-1297, 2012.

EJIRI, H.; SANKAWA, U.; SHIBATA, S. Graciliform and its acetates in cladonia graciliformis. **Phytochemistry**, v. 14, p. 277-279, 1975.

ELAD, Y. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. **Biological Reviews**, v. 72, p. 381-422, 1997.

ENGEVIX. **Caracterização do meio físico da área autorizada para a criação do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro - Relatório técnico final dos estudos – 8296 RG-H4-003/94, "VER. 1".** IEF/BIRD/PRÓ-FLORESTA/SEPLAN, 1995. 34 p. *apud* CAIAFA, A. N.; da SILVA, A. F. Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais – Brasil. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 163-173, 2005.

ESPINOSA-GARCIA, F. J.; LANGENHEIM, J. H. Effects of sabinense and gama terpinene from coastal redwood leaves acting singly or in mixtures on the growth of some of their fungus endophytes. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, n.8, p. 643-650, 1991.

EUROSTAT. **The use of plant protection products in the European union.** European Communities: Luxembourg, 222p., 2007.

FABIANE, K. C.; FERRONATO, R.; SANTOS, A. C.; ONOFRE, S. B. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis incinella* D.C. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 197-203, 2008.

FARIAS, E. M. F. G.; XIMENES, R. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; CHIAPPETA, A. A.; SENA, K. X. F. R.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of candida species. **Journal of Herbal Medicine**, v. 2, p. 63-67, 2012.

FARIAS, M. R.; PÉRTILE, R.; CORREA, M. C.; ALMEIDA, M. T. R.; PALERMO, J. A.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoid Saponins from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p. 927-933, 2010.

FERNANDES, S. A. *Baccharis platypoda*. 2011. 1 fotografia, color., 7,85 cm x 14,0 cm.

- FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L. C.; LEITÃO FILHO, H. F.; SILVA, A. G.; NASCIMENTO, L. R.; MARSAIOLI, A. J. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p. 355-367, 1995.
- FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L. C.; LEITÃO FILHO, H. F.; SILVA, A. G.; NASCIMENTO, L. R.; MARSAIOLI, A. J. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p. 355-367, 1995.
- FERRARINI, S. R.; DUARTE, M. O.; ROSA, R. G.; ROLIM, V.; EIFLER-LIMA, V. L.; VON POSER, G.; RIBEIRO, V. L. S. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and β -amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v.157, p.149-153, 2008.
- FERRAZ, R. P. C.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, N. C.; SOARES, M. B. P.; da SILVA, T. B.; MACHADO, W. J.; PRATA, A. P. N.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; BEZERRA, D. P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, p.615-621, 2013.
- FERRONATO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B.; Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 224-230, 2007.
- FILHO, O. P.; DORVAL, A.; FILHO, E. B. Preferência de saúva limão, *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908 (HYMENOPTERA: FORMICIDAE) a diferentes espécies florestais, em condições de laboratório. **Ciência Florestal**, v. 12, p.1-7, 2002.
- FLAKUS, A.; AHTI, T.; KUKWA, M.; WILK, K. New and interesting records of *Cladonia* and their lichenicolous fungi from the Andean cloud forest in Bolivia. **Annales Botanici Fennici**, v. 45, p. 448-454, 2008.
- FONTANIELLA, B.; LEGAZ, M. E.; PEREIRA, E. C.; SEBASTIÁN, B.; VICENTE, C. Requirements to produce fumarprotocetraric acid using alginate-immobilized cells of *Cladonia verticillaris*. **Biotechnology Letters**, p. 813-817, 2000.

- FORESTIERI, A. M.; MONFORTE, M. T.; RAGUSA, S.; TROVATO, A.; IAUK, L. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity in rodents of plant extracts used in African medicine. **Phytotherapy Ressarce**, v. 10, p. 100-106, 1996.
- FRANÇA, H.; CORRÊA, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; KUSTER, R. M.; SANTOS, R. P.; ROCHA, L. Flavonoids from *Myrsine rubra* M. F. Freitas & Kinoshita (Myrsinaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 885-887, 2011.
- FREIESLEBEN, S. H.; JÄGER, A. K. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms – A review. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 3, n. 2; p.154, 2014.
- FREITAS, M. F.; CARRIJO, T. T. A família Myrsinaceae nos contraforte do Maciço da Tijuca e entorno do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, p. 813-828, 2008.
- FUGUEIRA, E. L. Z.; COELHO, A. R.; ONO, E. Y. S.; HYROOKA, E. Y.; Milho: Riscos Associados à Contaminação por *Fusarium verticillioides* e Fumonisinás. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n.2, p.359-378, 2003.
- FUNARI, C. S.; GULLO, F. P.; NAPOLITANO, A.; CARNEIRO, R. L.; MENDES-GIANNINI, F.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; SILVA D. H. S. Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2086-2094, 2012.
- GANDRA, L. C.; RIBEIRO, M. M. R., DELLA LUCIA, T. M. C.; GUEDES, R. N. C. Mortality and respiratory rate of *Atta bisphaerica* ant workers (Hymenoptera: Formicidae) after application of a plant (*Ageratum conyzoides*) extract. **Sociobiology**, v. 57, n. 3, 2011.
- GHISALBERTI, E. L. Detection and isolation of bioactive natural products. In: COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. (Org.). **Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination**. New York: CRC Press, 2008. Cap. 2, p.11-76.

- GOLIAS, C. H.; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOULOS, K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. **International Journal of Clinical Practice**, v. 58, n. 12, p.1134-1141, 2004.
- GOMES, G.A; MONTEIRO, C.M.O.; SENRA, T.O.S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R.S.; GOIS, R.W.S.; DAEMON, E.; SANTIAGO, G.M.P.; CARVALHO, G.M. Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* (Verbenaceae) on larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 111, n.6, 2423-2430, 2012.
- GOMIDE, M. S.; LEMOS, F. O.; LOPES, M. T. P.; ALVES, T. M. A.; VICCINI, L. F.; COELHO, C. M. The effect of the essential oils from five different *Lippia* species on the viability of tumor cell lines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 895-902, 2013.
- GOTTLIEB O.R.; BORIN M.R.M.B. Natural Products Research in Brazil. **Ciência & Cultura**, v.49, n. 5, p. 315-320, 1997.
- GRIFFITHS, E.; GIBBS, J. N.;WALLER, J. M. Control of coffee berry disease. **Annals of Applied Biology**, V.67, p. 45-74,1971.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2 p. 150-156, 2014.
- GUAN, A.; LIU, C.; YANG, X.; DEKEYSER, M. Application of the intermediate derivatization approach in agrochemical discovery. **Chemical Reviews**, no prelo, 2014.
- GUILHON, C. C.; RAYMUNDO, L. J. R. P.; ALVIANO, D. S.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M .F.; MATHEUS, M. E.; CAVALCANTI, S. C. H.; ALVIANO, C. S.; FERNANDES, P. D. Characterization of the anti-inflammatory and antinociceptive actives and the mechanisms of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 406-413, 2011.

GUMBOSKI, E. L.; ELIASARO, S. *Cladonia litoralis* (Cladoniaceae), a new species from southern Brazil. **The Bryologist**, v. 114, p. 665-667, 2011.

GUPTA, V. K.; VERMA, S.; GUPTA, S.; SINGH, A.; PAL, A.; SRIVASTAVA, S. K.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, S. C.; DAROKAR, M. P. Membrane-damaging potential of natural L-(-)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical microbiology & Infectious diseases**, v.31, p.3375-3383, 2012.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p.113-147, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-7, 2005.

HANNIG, G. T.; ZIEGLER, M.; MARÇON, P. G. Feeding cessation effects of chlorantraniliprole, a new anthranilic diamide insecticide, in comparison with several insecticides in distinct chemical classes and mode-of-action groups. **Pest Management Science**, v. 65, n. 9, p. 969-974, 2009.

HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Current opinion in chemical biology**, v. 11, p. 480-484, 2007.

HEIDEN, G.; SCHNEIDER, A. *Baccharis* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/index?tid=5232&mode=5>>, Acesso em: 20 dez. 2012,13:23:03. 2010.

HENKEL, T.; BRUNNE, R. M.; MULLER, H.; REICHEL, F. Statiscal investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. **Angewandt Chemie International Edition**, v. 38, n. 5, p.643-646, 1999.

HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; JOSEPH, H.; BAILLEUL, F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p.211-222, 2008.

HÖLLDOBLER, B.; WILSON, E. O. **The ants**. The Belknap press of Harvard University Press: Massachusetts, 1990, 733p.

HONDA, N. K.; PAVAN, F. R.; COELHO, R. G.; LEITE, S. R. A.; MICHELETTI, A. C.; LOPES, T. I. B.; MISUTSU, M. Y.; BEATRIZ, A.; BRUM, R. L.; LEITE, C. Q. F. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, v. 17, p.328-332, 2010.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, v. 21, n.6, 1998.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p. 1841-1856, 2005.

HUNECK, S. The absolute configuration of (+)-usnic acid and (+)-isousnic acid. X-Ray analyses of the (-)- α -phenylethylamine derivative of (+)-usnic acid and of (-)-Pseudoplacodiolic acid, a new dibenzofuran, from the lichen *Rhizoplaca chrysoleuca*. **Tetrahedron Letters**, v. 22, p. 351-352, 1981.

HUSSEIN, M. A. A convenient mechanism for free radical scavenging activity of resveratrol. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, p. 459-469, 2011.

HUTER, O. F. Use of natural products in the crop protection industry. **Phytochemical Reviews**, v. 10, p. 185-194, 2011.

IMDORF, A.; KILCHENMAN, V.; BOGDANOV, S. Toxizität von thymol; campher, menthol and eucaliptol auf *Varroa jacobsoni* oud Ind *Apis mellifera* L. in labortest. **Apidologie**, v. 26, p. 27–31, 1995.

INGOLFSDÓTTIR, K. The usnic acid. **Phytochemistry**, v.61, p. 729-736, 2002.

INGOLFSDÓTTIR, K.; CHUNG, G. A. C.; VILHJÁLMUR, G. S.; GISSURARSON, S. R.; VILHELMSDÓTTIR, M. Antimycobacterial activity of lichen metabolites in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 141-144, 1998.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, p.603-608, 2000.

JOHNSON, L. B.; KAUFFMAN, C. A. Voriconazole: A new triazole antifungal agent. **Clinical Infectious Diseases**, v.36, n. 5, p. 630-637, 2003.

JORGENSEN, J. H.; FERRARO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. **Medical Microbiology**, v. 49, p.1749-1755, 2009.

KIM, J. H.; CAMPBELL, B. C.; MAHONEY, N.; CHAN, K. L.; MOLYNEUX, R. J.; BALAJEE, A. Augmenting the activity of antifungal agents against aspergilla using structural analogues of benzoic acid as chemosensitizing agents. **Fungal Biology**, v. 114, p. 817-824, 2010.

KIMATI, H., AMORIN, L., BERGAMIN, A.; CAMARGO, L. E. A., REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. 3ªed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, 1995, 919p.

KIMATI, H., AMORIN, L., BERGAMIN, A.; CAMARGO, L. E. A., REZENDE, J.A.M. **Manual de Fitopatologia - Doenças de plantas Cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, 2005, 663p.

KLAFKE, G. M. **Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos carrapaticidas**. In: Pereira, M.C.; Labruna, M.B.; Szabo, M.P.J.; Klafke, G.M. (eds) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Biologia, Controle e Resistência. MEDVET, São Paulo, pp 65–80, 2008.

KLOPELL, F. C.; LEMOS, M.; SOUSA, J. P. B.; COMUNELLO, E.; MAISTRO, E. L.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S.F. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforsch**, v.62, p. 537-542, 2007.

KOCH, M. A.; SCHUFFENSEN, A; SCHECK, M.; WETZEL, S.; CASALTA, M.; ODERMATT, A.; ERLT, P.; WALDMANN, H. Charting biologically relevant chemical space: A structural classification of natural products (SCONP). **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v. 102, n. 48, p. 17272-17277, 2005.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews**, v.4, p.206-220.

KOEPPEN, W. **Climatologia**. 1948. Fondo Cultura Económica. México & Buenos Aires, 478p *Apud* CAIAFA, A. N.; da SILVA, A. F. Composição florística e espectro biológico de um campo de altitude no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, Minas Gerais – Brasil. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 163-173, 2005.

KOHZAKI, K.; GOMI, K.; KOKUDO, Y. Y.; OZAWA, R.; TAKABAYASHI, J.; AKIMITSU, K. Characterization of sabinene synthase gene from rough lemon (*Citrus jambhiri*). **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1700-1704, 2009.

KOSANIC', M.; RANKOVIC', B.; STANOJKOVIC', T.; RANCIC', A.; MANOJLOVIC', N. Cladonia lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. **LWT – Food Science and Technology**, *no prelo*, 2014.

KOUZNETSOV, V. V.; GÓMEZ, C. M. M.; DERITA, M. G.; SVETAZ, L.; del OLMO, E.; ZACCHINO, S. A. Synthesis and antifungal activity of diverse C-2 pyridinyl and pyridinylvinyl substituted quinolines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 6506-6512, 2012.

KOZUBEK, A.; TYMAN, J. H. P. Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 1, p. 1-25, 1999.

KRCMERY, V.; JESENSKA, Z.; SPANIK, S.; GYARFAS, J.; NOGOVA, J.; BOTEK, R.; MARDIAK, J.; SUFLIARSKY, J.; SISOLAKOVA, J.; VANICKOVA, M.; KUNOVA, A.; STUDENA, M.; TRUPL, J. Fungaemia due to *Fusarium spp.* In Cancer Patients. **The Journal of Hospital Infections**, v.36, p. 223-228, 1997.

KUMAR, K. C. S.; MULLER, K. Lichen metabolites. 1. Inhibitory action against leukotriene B₄ Biosynthesis by a non-redox mechanism. **Journal of Natural Products**, v. 62, p.817-820, 1999.

KUTCHAN, T. M. A role for intra-and intercellular translocation in natural products biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p.292-300, 2005.

LAGE, T. C. A. **ácido úsnico precipitado em meio de cultura BDA**. 2011c. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAGE, T. C. A. ***Baccharis dracunculifolia***. 2014. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAGE, T. C. A. ***C. acutatum* visto do microscópio**. 2011e. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAGE, T. C. A. ***Cladonia rappi***. 2012. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAGE, T. C. A. **Conídios de *Botrytis cinerea* ao microscópio**. 2011b. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAGE, T. C. A. **Conídios de *Colletotrichum acutatum* ao microscópio**. 2011a. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAGE, T. C. A. **Etapas do teste de imersão de fêmeas ingurgitadas de *R. microplus***. 2011d. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAGE, T. C. A. **Formiga cortadeira**. 2012b. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAGE, T. C. A. **Jardim de fungos – formiga cortadeira**. 2012c. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAGE, T. C. A. **Montagem do Teste tópico contra *Atta sexdens***. 2012e. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAGE, T. C. A. **Teste tópico contra *Atta sexdens***. 2012d. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F. MATOS, R. S.; DAEMON, E. Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenacea) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 863-869, 2013.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.453–462, 2001.

LAP – Laboratório de Artrópodes Parasitos. **Contagem de larvas de *R. microplus***. 2011b. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAP – Laboratório de Artrópodes Parasitos. **Etapas do teste do pacote de larvas de *R. microplus***. 2011a. 1 fotografia, color. 7,85 cm x 14 cm.

LAROCHELLE, J.; ALVAREZB, F.; BUSSIÈRESB, J.F.; CHEVALIERB, I.; DALLAIREB, L.; DUBOISB, J.; FAUCHERB, F.; FENYVESC, D.; GOODYERD, P.; GRENIERE, A.; HOLMEF, E.; LAFRAMBOISEE, R.; LAMBERTB, M.; LINDSTEDTF, S.; MARANDAG, B.; MELANÇOND, S.; MEROUANIB, A.; MITCHELLD, J.; PARIZEAULTA, G.; PELLETIERH, L.; PHANB, V.; RINALDOH, P.; SCOTTT, C. R.; SCRIVERD, C.; MITCHELL, G. A. Effect of nitisinone (NTBC) treatment on the clinical course of hepatorenal tyrosinemia in Québec. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.107, p. 49-54, 2012.

LAUTERWEIN, M.; OETHINGER, M.; BELSNER, K.; PETERS, T.; MARRE, R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 11, p. 2541-2543, 1995.

LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; BARRERA, J. B.; MORETTI, C.; Le MENOLIVIER, L. Triterpene saponins from *Myrsine pellucida*. **Phytochemistry**, v.37, n. 6, p. 1671-1677, 1994.

LEGAZ, M .E.; ARMAS, R.; VICENTE, C. Bioproduction of depsidones for pharmaceutical purposes. In: RUNDFELDT, C. (Org.) **Drug development – A case study based insight into modern strategies**. Rijeka, Croatia:InTech, 2011, 654p.

LEITÃO, S. G.; DAMASCENO, J. P. L.; MARTINI, M. G.; MIRANDA, S. N.; NEUFELD, P. Analysis of the chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenacea). **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, 2011.

LINDELL, S. D.; PATTENDEN, L. C.; SHANNON, J. Combinatorial chemistry in the agrosiences. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 4035-4046, 2009.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p.3-25, 1997.

LIPKUS, A. H.; YUAN, Q.; LUCAS, K. A.; FUNK, S. A.; BARTELT, W. F.; SCHENCK, R. J.; TRIPPE, A. J. Structural diversity of organic chemistry. A scaffold analysis of the CAS registry. **Journal of Organic Chemistry**, v. 73, p. 4443-4451, 2008.

LIU, Y-Q.; YANG, L.; TIAN, X. Podophyllotoxin: Current perspectives. **Current Bioactive Compounds**, v. 3, p. 37-66, 2007.

LIU, Y-Q.; YANG, L.; TIAN, X. Podophyllotoxin: Current perspectives. **Current Bioactive Compounds**, v. 3, p. 37-66, 2007.

LOAYZA, I.; ABJDER, D.; ARANDA, R.; JAKUPOVIC, J.; COLLIN, G.; DESLAURIERS, H.; JEAN, F-I. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 381-389, 1995.

LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. (Org.) **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa:IST Press, 2007, 272p.

LOBO, P. L. D.; FONTELES, C. S. R.; MARQUES, L. A. R. V.; JAMACARU, F. V. F.; FONSECA, S. G. C.; CARVALHO, C. B. M.; MORAES, M .E. A. The efficacy of three formulations of *Lippia sidoides* Cham. Essential oil in the reduction of salivary *Streptococcus mutans* in children with caries: A randomized, double-blind, controlled study. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1043-1047, 2014.

LOFALL, B. P.; TIMDAL, E. *Cladonia krogiana*, a new xanthone-containing species from Norway. **Lichenologist**, v. 34, n.4, p. 277-281, 2002.

LOPES, N.P.; KATO, M.J.; ANDRADE, E.H.; MAIA, J.G.; YOSHIDA, M.; PLANCHART, A.R.; KATZIN, A.M. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. by Waiapi Amazon Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.67, p. 313–319, 1999.

LOPEZ, S. N.; RAMALLO, I. A.; SIERRA, M. G.; ZACCHINO, S. A.; FURLAN, R. L. E. Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 104, n.2, p.441-444, 2007.

LÓPEZ, S. N.; RAMALLO, I. A.; SIERRA, M. G.; ZACCHINO, S. A.; FURLAN, R. L. E. Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n. 2, p.441-444, 2007.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10, 2013.

LUDERE, M. T.; van REE, T.; VLEGGAR, R. Isolation and relative stereochemistry of lippialactone, a new antimalarial compound from *Lippia javanica*. **Fitoterapia**, v. 86, p. 188-192, 2013.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v.76, p. 612-631, 2010.

MANDAL, S.; YADAV, S.; YADAV, S.; NEMA, R. K. **Antioxidants: A review**, v.1, n.1, p. 102-104, 2009.

MANGURO, L. O. A.; MIDIWO, J. O.; KRAUS, W.; UGI, I. Benzoquinone derivatives of *Myrsine africana* and *Maesa lanceolata*. **Phytochemistry**, v.64, p. 855-862, 2003.

MANN, J. **Secondary Metabolism**, Clarendon Press: Oxford, 2nd ed., 2005. 374p.

MAREI, G. I. Kh.; RASOUL, M. A. A.; ABDELGALEIL, S. A. M. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 56-61, 2012.

MARIN, A. L. A.; COSTA, M. R.; MENARIM, H.; MOREIRA, A. M.; EVERALDO, E. G. Herança da Resistência à Antracnose na Cultivar de Feijoeiro Comum Cornell 49-242. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 302-306, 2003.

MARTINEZ-CORREA, H. A.; CABRAL, F. A.; MAGALHÃES, P. M.; QUEIROGA, C. L.; GODOY, A. T.; SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; PAVIANI, L. C. Extracts from leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO₂, ethanol and water. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 63, p. 31-39, 2012.

MASSIGNANI, J. J.; MARIVANE, L.; MAISTRO, E. L.; SCHAPHAUSER, H. P.; JORGE, R. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. F.; ANDRADE, S. F. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1355-1360, 2009.

MATHEW, B. P.; NATH, M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. **ChemMedChem**, v. 4, p. 310-323, 2009.

MATHIAS, M. I. C. (Org.). **Guia básico de morfologia interna de carrapatos ixodídeos**. São Paulo: Editora UNESP, 2013, 123 p.

MAYO, D. W.; PIKE, R. M.; FORBES, D. C. **microscale organic laboratory: with multistep and multiscale synthesis**, Jhon Wiley and Sons: New Jersey, 5th ed., 2011. 681p.

MENDES, A. S.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; BRITO, F. C.; MASSONI, T. Acaricidal activity of thymol on larvae and nymphs of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.183, p.136–139, 2011.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. 2. ed. Ribeirão Preto - SP: Tecmedd, 2004, 115p.

MOLZ, M. ***Baccharis dracunculifolia* Foto**. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=1590>, acesso em: 30 jun. 2014, 10:53:23.

MONTANARI, R. M. *Lippia triplinervis*. 2011a. 1 fotografia, color., 7,85 cm x 14,0 cm.

MONTANARI, R. M. *Myrsine squarrosa*. 2012. 1 fotografia, color., 7,85 cm x 14,0 cm.

MONTEIRO, C. M. O.; DAEMON, E.; SILVA, A. M. R.; MATURANO, R.; AMARAL, C. Acaricide and ovicide activities of thymol on engorged females and eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 106, p. 615-619, 2010.

MONTEIRO, C. M. O.; DAEMON, E.; CLEMENTE, M. A.; ROSA, L. S.; MATURANO, R. Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.105, p.1093–1097, 2009.

MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R.; DAEMON, E.; CATUNDA-JUNIOR F. E. A.; CALMON, F.; SENRA, T. O. S.; FAZA, A.; CARVALHO, M. G. Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. **Parasitology Research**, v. 111, n.3, p. 1295-1300, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MULLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p.9-16, 2001.

MURAKAMI, T.; HIGASHI, S. Social organization in two primitive Attine Ants, *Cyphomyrmex rimosus* and *Myrmicocrypta ednaella*, with reference to their fungus substrate and food sources. **Journal of Ethology**, v.15, p. 17-25, 1997.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. **Microbiologia Médica**, Editorial Elsevier: Madrid, 5ª ed., 2006, 976p.

- MUSIALIK, M.; KUZMICZ, R.; PAWLOWSKI, T. S.; LITWINIENKO, G. Acidity of hydroxyl groups: An overlooked influence on antiradical properties of flavonoids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 2699-2709, 2009.
- NAKAUNE, R.; NAKANO, M. Benomyl resistance of *Colletotrichum acutatum* is caused by enhanced expression of B-tubulin 1 gene regulated by putative leucine zipper protein CaBEN1. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 1324-1335, 2007.
- NASH III, T. H. (Org.). **Lichen biology**: New York: Cambridge University Press, 2008. 486p.
- NASIR, M.; MUGHAL, S. M.; MUKHTAR, T.; AWAN, M. Z. Powdery mildew of mango: A review of ecology, biology, epidemiology and management. **Crop Protection**, v. 64, p. 19-26, 2014.
- NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 503-514, 2010.
- NOSTRO, A.; ROCCARO, A. S.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, A.; PIZZIMENTI, F. C.; CIONI, P. L.; PROCOPIO, F.; BLANCO, A. R. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 519–523, 2007.
- NTALLI, N. G.; FERRARI, F.; GIANNAKOU, I.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. **Pest Management Science**, v. 67, p. 341–351, 2011.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 52, 2003.
- OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; JÚNIOR, J. P. S.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n. 4, p. 510-516, 2006.

OLIVEIRA, M. S. **Diversidade Entre Isolados de *Alternaria Solani*: Avaliação Morfológica, Fisiológica e Molecular**. 2003.110f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2007.

PACHECO, A. G.; OLIVEIRA, P. M.; PILÓ-VELOSO, D.; ALCÂNTARA, A. F. C. ¹³C-NMR Data of diterpenes isolated from *Aristolochia* species. **Molecules**, v. 14, p. 1245-1262, 2009.

PANDEY, A.; CHATTOPADHYAY, P.; BANERJEE, S.; PAKSHIRAJAN, K.; SINGH, L.; Antitermitic activity of plant essential oils and their major constituents against termite *Odontotermes assamensis* Holmgren (Isoptera: Termitidae) of north east India. **International Biodeterioration & biodegradation**, v. 75, p. 62-67, 2012.

PANELLA, N. A.; DOLAN, M. C.; KARCHESY, J. J.; XIONG, Y.; PERALTA-CRUZ, J.; KHASAWNEH, M.; MONTENIERI, J. A.; MAUPIN, G.O. Use of novel compounds for pest control: Insecticidal and acaricidal activity of essential oil components from Heartwood of Alaska Yellow Cedar. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p.352-358, 2005.

PARK, M. J.; GWAK, K. S.; YANG, I.; KIM, K. W.; JEUNG, E. B.; CHANG, J. W.; CHOI, I. G. Effect of citral, eugenol, Nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, v. 80, p.290-296, 2009.

PARK, Y.K., PAREDES-GUSMAN, J.F., AGUIAR, C. L., ALENCAR, S. M., FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p.1100-1103, 2004.

PARREIRA, N. A.; MAGALHÃES, L. G.; DENIS, R. M.; CAIXETA, S. C.; DE SOUSA J. P. B.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; NANAYAKKARA, N. P. D.; RODRIGUES, V.; FILHO, A. A. S. Antiprotozoal, schistosomicidal and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 993-1001, 2010.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D. S.; VILLAR, A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 201-214. 2001.

PASTER, N.; MENASHEROV, M.; RAVID, U.; JUVEN, B. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. **Journal of Food Protection**, v.58, p. 81–85, 1995.

PATITUCCI, M. L.; SILVA, R. S.; VALENTE, L. M. M.; EPIFANIO, R. A.; PINTO, A. C. Espectrometria de massas de diterpenos: Fragmentações características de isopimaranos oxigenados em C7. **Química Nova**, v. 13, n. 4, 2730277, 1990.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4^a ed, São Paulo:Cengage Learning, 2010, 700p.

PEIXOTO, A. L.; MORIN, M. P. Coleções botânicas: documentação da biodiversidade brasileira. **Ciência & Cultura**, v. 55, n. 3, p. 21-24, 2003.

PEÑAFLORES, M. F. G. V.; ALMEIDA, R. N. A.; SIMOTE, S. Y.; YAMANE, E.; BUENO, O.; HEBLING, M. J. A.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; PAGNOCCA, F. G. Toxicity of substances isolated from *Simarouba versicolor* St. Hil. (Simaroubaceae) to leaf-cutting ant *Atta sexdens* L. (Hymenoptera: Formicidae) and the symbiotic fungus *Leucoagaricus gongylophorus* (Singer) Möller. **BioAssay**, v.4, n.1, 2009.

PEREIRA, E. C.; da SILVA, N. H.; ANDRADE, L. C.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Production of lichen metabolites by immobilized cells of *Cladonia clathrata* Ahti & Xavier Filho. **Phyton (Horn)**, v. 39, p. 79-89, 1998.

PERES, N. A.; TIMMER, L. W.; ADASKAVEG, J. E.; CORREL, J. C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Plant Disease**, v. 89, n. 8, p. 784-796, 2005.

- PHELLANDRENE process for extracting copper. **Chemist and Druggist**, 1911.
- PIETTA, P. G.; Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica Nova**, v.25, n. 1, p. 45-65, 2002.
- PORTER, R. B. R.; REESE, P. B.; WILLIAMS, L. A. D.; WILLIAMS, D. J. Acaricidal and insecticidal activities of cadina-4,10(15)-dien-3-one. **Phytochemistry**, v. 40, n.3, p. 735-738, 1995.
- POULOSE, A. J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, n. 2; p. 307-314, 1978.
- POZZA, A. A. A.; MARTINEZ, H. E. P.; CAIXETA, S. L.; CARDOSO, A. A.; ZAMBOLIM, L.; POZZA, E. A. Influência da nutrição mineral na intensidade da mancha-de-olho-pardo em mudas de cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n. 1, p. 53-60, 2001.
- PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A.; OLIVEIRA, A. B. Identification of some chemical components of the essential oil from Molasses Grass (*Melinis minutiflora* Beauv.) and their activity against cattle-tick (*Boophilus microplus*). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 9, p.193-197, 1998.
- PRATS, G. **Microbiología y Parasitología Médicas**. Madrid:Editorial Médica Panamericana, 2013. 581 p.
- PRIESTLEY, C. M.; BURGESS, I. F.; WILLIAMSON, E. M. Lethality of essential oil constituents towards the human louse *Pediculus humanus* and its eggs. **Fitoterapia**, v. 77, p. 303-309, 2006.

QUIRANTES-PINÉ, R.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; FUNES, L.; BORRÁS-LINARES, I.; MICOL, V.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats. **Phytomedicine**, v. 20, p. 1112-1118, 2013.

RAMALLO, I. A.; ZACCHINO, S. A.; FURLAN, R. L. E. A rapid TLC autobiographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 15-19, 2006.

RANGASWAMY, J.; KUMAR, H. V.; HARINI, S. T.; NAIK, N. Synthesis of benzofuran based 1,3,5-substituted pyrazole derivatives: A new class of potent antioxidants and antimicrobials-A novel accost to amend biocompatibility. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 4773-4777, 2012.

RAO, A.; ZHANG, Y.; MUEND, S.; RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of TOR pathway. **Microbial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n.12, p.5062-5069, 2010.

RASHID, M. A.; MAJID, M. A.; QUADER, M. A. Complete NMR assignments of (+) usnic acid. **Fitoterapia**, v. 70, p. 113-115, 1999.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6^a ed., 2001, 906p.

REGNIER, T.; du PLOOY, W.; COMBRICK, S.; BOTHA, B. Fungitoxicity of *Lippia scaberrima* essential oil and selected terpenoid components on two mango postharvest spoilage pathogens. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 254-258, 2008.

RIBEIRO, M. M. R.; DELLA LUCIA, T. M. C.; BACCI, L.; MOREIRA, M. D.; PICANÇO, M. C. Effect of plant extracts on survival of leaf-cutting ant workers (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, v. 52, n. 2, p.387-398, 2008.

RIBEIRO, V. L.; SANTOS, J. C.; BORDGNON, S. S. L.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T.; VON POSER, G. L. Acaricidal Properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource Technology**, v.101, p.2506-2509, 2010.

RIELLA, K. R.; MARINHO, R. R.; SANTOS, J. S.; PEREIRA-FILHO, R. N.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE-JUNIOR, R. L. C.; THOMAZZI, S. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, O. 656-663, 2013.

ROBERTSON, A.; Risk of aflatoxin contamination increases with hot and dry growing conditions. **Integrated Crop Management**, v.494, n. 23, September 19, 2005. Disponível em: <http://www.ipm.iastate.edu/ipm/icm//ipm/icm/2005/9-19/aflatoxin.html>> Acesso em: 16/11/2009.

ROCHLEDER, F.; HELDT, W. Untersuchung einiger flechtenarten. **Annalen der Chemie und Pharmacie**, v 8, p. 1-18, 1843.

RODRIGUÉZ, D. J.; GARCÍA, R. R.; CASTILLO, F. D. H.; GONZÁLEZ, C. N. A.; GALINDO, A. S.; QUINTANILLA, J. A. V.; ZUCCOLOTTO, L. E. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plant against postharvest fruit fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p.960-966, 2011.

ROLIM, R. G. **Baccharis coridifolia DC. Foto.** Disponível em:< http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=9406>, acesso em: 29 jun. 2014, 18:51:23.

ROUHI, A. M. The case of natural products research. **Chemical and Engineering News**, v.81, p. 80, 2003.

ROZMAN, V.; KALINOVIC, I.; KORUNIC, Z. Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and lauraceae to three stored-product insects. **Journal od Stored Products Research**, v. 43, p.349-355, 2007.

SAFFORD, H. D. Brazilian Páramos I: An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. **Journal of Biogeography**, v. 26, p. 693-712, 1999.

SAHA, K. S.; BUKHSH, A. R. K. Molecular approaches towards development of purified natural products and their structurally known derivatives as efficient anti-cancer drugs: Current trends. **European journal of Pharmacology**, v. 714, p.239-248, 2013.

SÁNCHEZ-RAMOS, I.; CASTAÑAERA, P. Acaricidal activity of natural monoterpenes on *Tyrophagus putrescentie* (Schrank), a mite of stored food. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, p.93-101, 2001

SANDASI, M.; KAMATOU, G. P. P.; COMBRICK, S.; VILJOEN, A. M. A chemotaxonomic assessment of four indigenous South African *Lippia* species using GC-MS and vibrational spectroscopy of the essential oils. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p.142-152, 2013.

SANTOS, D. A.; FUKUI, M. J.; NANAYAKKARA, N. P. D.; KHAN, S. I.; SOUSA, J. P. B.; ANDRADE, S. F.; SILVA FILHO, A. A.; QUINTÃO, N. L. M. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p. 543-550. 2010.

SANTOS, J. A.; JULIATTI, F. C.; SANTOS, V. A.; POLIZEL, A. C.; JULIATTI, F. C.; HAMAWAKI, O. T. Caracteres epidemiológicos e uso da análise de agrupamento para resistência parcial à ferrugem da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 443-447, 2007.

SARKAR, B.; DOSCH, J.; SIMEONE, D. Cancer stem cells: A new theory regarding a timeless disease. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 3200-3208, 2009.

SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA, R. B.; BARATA, L. E. S.; MOURÃO, R. H. V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v.134, p. 1474-1478, 2012.

SAUTER, H.; STEGLICH, W.; ANKE, T. Strobilurins: Evolution of a new class of active substances. **Angewandte chemie international edition**, v. 38, p. 1328-1349, 1999.

SAWKOLSKI, H. Ueber die usninsäure. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v.8, p. 1459-1463, 1875.

SCHNEIDER, A. A. **Baccharis megapotamica Spreng. Foto**. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=5515>, acesso em: 29 jun. 2014, 18:43:00.

SCORALIK, M. G.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O.; MATURANO, R. Enhancing the acaricide effect of thymol on larvae of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) by solubilization in ethanol. **Parasitology Research**, v. 110, p. 645-648, 2012.

SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; MONTEIRO, C. M. O.; CALMON, F.; MATURANO, R.; GOMES, G. A.; FAZA, A.; CARVALHO, M. G. C.; DAEMON, E. Assessment of the acaricidal activity of carvacrol, (*E*)-cinnamaldehyde, *trans*-anethole, and linalool on larvae of *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, p. 1461-1466, 2013.

SEO, S-M.; KIM, J.; KANG, J.; KOH, S-H.; AHN, Y-J.; KANG, K-S.; PARK, I-K. Fumigant toxicity and acetylcholinesterase inhibitory activity of 4 Asteraceae plant essential oils and their constituents against Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, no prelo, 2014.

SHRESTHA, A.; RIMAL, J.; RAO, A.; SEQUEIRA, P. S.; DOSHI, D.; BHATN G. K. *In vitro* antifungal effect of mouth rinses containing chlorhexidine and thymol. **Journal of Dental Sciences**, v. 6, p.1-5, 2011.

SHUKLA, V.; JOSHI, G. P.; RAWAT, M. S. M. Lichen as a potential natural source of bioactive compounds: a review. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, p. 303-314, 2010.

SILVA FILHO, A. A.; RESENDE, D. O.; FUKUI, M. J.; SANTOS, F. F.; PAULETTI, P. M.; CUNHA, W.R.; SILVA, M. L. A.; GREGÓRIO, L. E.; BASTOS, J.K.; NANAYAKKARA, N. P. D. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, p. 479-482, 2009.

- SILVA, A.; BACCI JR, M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; HEBLING, M. J. A. Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources. **Journal of Insect physiology**, v. 49, p. 307-313, 2003.
- SMITS, A. J. [Temperatura de fusão do ácido úsnico]. **Liebigs Annalen der Chemie**, v.325, p.339-347, 1903.
- STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Can.). **Bulletin of Entomological Research**, v. 53, p.563–578, 1962.
- STOUT, J. M.; BOUBAKIR, Z.; AMBROSE, S. J.; PURVES, R. W.; PAGE, J. E. The hexanoyl-CoA precursor for cannabinoid biosynthesis formed by an acyl-activating enzyme in *Cannabis sativa* trichomes. **The Plant Journal**, v. 71, p. 353-365, 2012.
- SU, B-N.; CUENDET, M.; NIKOLIC, D.; KRISTINSSON, H.; INGÓFSDÓTTIR, K.; van BREEMEN, R. B.; FONG, H. H. S.; PEZZUTO, J. M.; KINGHORN, A. D. NMR study of fumarprotocetraric acid, a complex lichen depsidone derivative from *Cladonia furcata*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 41, p. 391-394, 2003.
- TAGUCHI, H.; SANKAWA, U.; SHIBATA, S. Biosynthesis of usnic acid. **Tetrahedron Letters**, n. 42, p. 5211-5214, 1966.
- TASDEMIR, D.; KAISER, M.; DEMIRCI, F.; BASER, K.H.C. Essential oil of Turkish *Origanum onites* L. and its main components, carvacrol and thymol show potent antiprotozoal activity without cytotoxicity. **Planta Medica**, v.72, p.1006, 2006.
- TATAGIBA, J. S., LIBERATO, J. R., ZAMBOLIM, L., VENTURA, J. A. & COSTA, H. Controle e condições climáticas favoráveis à antracnose do mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.186-192, 2002.
- TAY, T.; TURK, A. O.; YILMAZ, M.; TURK, H.; KIVANÇ, M. Evaluation of the antimicrobial activity of the acetone extract of the lichen *Ramalina farinacea* and its (+)-usnic acid, norstictic acid and protocetraric acid constituents. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.59, p. 384-388, 2004.

TAYLOR, M. A. Recent developments in ectoparasitocides. **The Veterinary Journal**, v.161, p. 253-268, 2001.

TEIXEIRA, M. T. B.; FAERSTEIN, E.; LATORRE, M R. Técnicas de análise de sobrevida. **Caderno de Saúde Pública**, p. 579-594, 2002.

TEREZAN, A. P.; ROSSI, R. A.; ALMEIDA, R. N. A.; FREITAS, T. G.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C.; PIRANI, J. R. Activities of extracts and compounds from *Spiranthera odorantíssima* St. Hil. (Rutaceae) and their symbiotic fungus. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 5, p.882-886, 2010.

TONG, F. **Investigation of mechanisms of action of monoterpenoid insecticides on insect gamma-aminobutyric acid receptors and nicotinic acetylcholine receptors**. 2010. 112f. Tese (Doutorado em Toxicologia) – Iowa State University, Iowa-USA, 2010.

TONG, F.; COATS, J. R. Effects of monoterpenoid insecticides on [³H]-TBOb binding in house fly GABA receptor and ³⁶Cl⁻ uptake in American cockroach ventral nerve cord. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p.327-324, 2010.

TOP TROPICALS. **Baccharis halimifolia** photo. Disponível em: <http://toptropicals.com/cgi-bin/garden_catalog/cat.cgi?uid=Baccharis_halimifolia>, acesso em: 29 jun. 2014, 18:40:54.

UNITED NATIONS ORGANIZATION. **World population prospects: The 2006 revision**. New York, NY: 2007, 96p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Pesticides industry sales and usage: 2006 and 2007 market estimates**. Washington, DC: 2011, 34p.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. **Fêmea de *Rhipicephalus microplus***. Disponível em: <http://www.coccidia.icb.usp.br/parasite_db/galeria_imgs/low/A_18_126_low.jpg>, Acesso em: 11 jul. 2014, 11:40:30.

UNIVERSITY OF ADELAIDE. ***Aspergillus niger* broth**. Disponível em: <[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Aspergillus/niger.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus/niger.html)>, Acesso em: 17 jun. 2014d, 11:39:30.

UNIVERSITY OF ADELAIDE. **Conidial head of *Aspergillus niger* photo**. Disponível em: <[http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Aspergillus/niger.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Aspergillus/niger.html)>, Acesso em: 17 jun. 2014b, 11:39:30.

UNIVERSITY OF ADELAIDE. ***Cryptococcus neoformans* broth**. Disponível em: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Yeasts/Cryptococcus/C_neoformans.html>, Acesso em: 17 jun. 2014c, 11:38:30.

UNIVERSITY OF ADELAIDE. ***Cryptococcus neoformans* photo**. Disponível em: <http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Yeasts/Cryptococcus/C_neoformans.html>, Acesso em: 17 jun. 2014a, 11:38:30.

URBAS, P.; ARAÚJO, M. V.; LEAL, I. R.; WIRTH, R. Cutting more from cut forest: Edge effects on foraging and herbivory of leaf-cutting ants in Brazil. **Biotropica**, v. 39, n. 4, p. 489-495, 2007.

VALENTE, P. P.; AMORIN, J. M.; CASTILHO, R. O.; LEITE, R. C.; RIBEIRO, M. F. B. In vitro acaricidal efficacy of plant extracts from Brazilian flora and isolated substances against *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v.113, p. 417-423, 2014.

Van ACKER, S. A. B. E.; Van DEN BERG, D-J.; TROMP, M. N. J. L.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 331-342, 1996.

van KLINK, J. W.; BROPHY, J. J.; PERRY, N. B.; WEAVERS, R. T. Beta-triketones from Myrtaceae: Isoleptospermone from *leptospermum scoparium* and papuanone from *Corymbia dallachiana*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n.3, p. 487-489, 1999.

- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para a sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.
- VENGURLEKAR, S.; SHARMA, R.; TRIVEDI, P. Efficacy of some natural compounds as antifungal agents. **Pharmacognosy Review**, v. 6, n. 12, p.91-99, 2012.
- VERAS, H. N. H.; RODRIGUES, F. F. G.; COLARES, A. V.; MENEZES, I. R. A.; COUTINHO, H. D. M.; BOTELHO, M. A.; COSTA, J. G. M. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v.83, n.3, p. 508-512, 2012.
- VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. **Química Nova**, v.28, n.1, p. 85-94, 2005.
- WATTENBERG, L.W. Inhibition of azoxymethane-induced neoplasia of the large bowel by 3-hydroxy-3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatriene (nerolidol). **Carcinogenesis**, v. 12, p. 151–152, 1991.
- WHO, World Health Organization. **Global Health Observatory: Cancer mortality and morbidity**. Disponível em: <http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer/en/index.html>. Acesso em: 15 fev.2013a, 15:01:30
- WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, B.; TUDZYNSKI, P.; van KAN, J. A. L. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mold disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, n. 5, p. 561-580, 2007.
- WU, C-F.; YANG, J-Y.; WANG, F.; WANG, X-X. Resveratrol: Botanical origin, pharmacological activity and applications. **Chinese journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 1, p.1-15, 2013.

YAMAZAKI, M.; SHIBATA, S.; USUI, T. The biogenesis of plant products. 2. Biogenesis of thymol. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 11, p. 363-365, 1963.

YANG, W. S.; JEONG, D.; YI, Y-S.; LEE, B-H.; KIM, T. W.; HTWE, K. M.; KIM, Y-D.; YOON, K. D.; HONG, S.; LEE, W-S.; CHO, J. Y. *Myrsine seguinii* ethanolic extract and its active component quercetin inhibit macrophage activation and peritonitis induced by LPS by targeting to Syk/Src/IRAK-1. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 1165-1174, 2014.

ZACCHINO, A. S.; GUPTA, M. P. **Manual de técnicas in vitro para la detección de compuestos antifúngicos**, v.85, Rosario, Argentina: Corpus Editorial y Distribuidora, 2007.

ZAMBOLIM, L.; PICANÇO, M. C.; SILVA, A. A.; FERREIRA, L. R.; FERREIRA, F. A. **Produtos fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas)**, Viçosa: DFP, 625p., 2008.

ZAMBOLIM, L.; VENANCIO, W.S.; OLIVEIRA, S.H.F. **Manejo da resistência de fungos a fungicidas**. Viçosa, MG; UFV, DFP, 2007. 168 p.

ZHANG, L.; YAN, K.; ZHANG, Y.; HUANG, R.; BIAN, J.; ZHENG, C.; SUN, H.; CHEN, Z.; SUN, N.; AN, R.; MIN, F.; ZHAO, W.; ZHUO, Y.; YOU, J.; SONG, Y.; YU, Z.; LIU, Z.; YANG, K.; GAO, H.; DAI, H.; ZHANG, X.; WANG, J.; FU, C.; PEI, G.; LIU, J.; ZHANG, S.; GOODFELLOW, M.; JIANG, Y.; KUAI, J.; ZHOU, G.; CHEN, X. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v.104, n. 11, p.4606-4611, 2003.

ZHISHEN J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

ZHONG, X.; IDE, T.; OTSUKA, H.; HIRATA, E.; TAKEDA, Y. (+)-isolarisiresinol 3a-O-sulphate from leaves of *Myrsine Seguinii*. **Phytochemistry**, v. 49, n.6, p.1777-1778, 1998.

ZHONG, X.; OTSUKA, H.; IDE, T.; HIRATA, E.; TAKEDA, Y. Hydroquinone diglycoside acyl esters from leaves of *Myrsine seguinii*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 923-927, 1999.

Anexos

Dados cristalográficos para o (-)-(S)-ácido úsnico (3).

Table1. Crystal data and structure refinement for (-)-(S)-usnic acid (S-1).

Empirical formula C₁₈ H₁₆ O₇
Formula weight 344.31
Temperature 150(2) K
Wavelength 1.54178 Å
Crystal system Orthorhombic
Space group P 21 21 21
Unit cell dimensions a = 8.0077(3) Å a = 90°.
 b = 18.8247(6) Å b = 90°.
 c = 20.1978(7) Å g = 90°.
Volume 3044.67(18) Å³
Z 8
Density (calculated) 1.502 Mg/m³
Absorption coefficient 0.987 mm⁻¹
F(000) 1440
Crystal size 0.0081 x 0.0082 x 0.605 mm³
Theta range for data collection 3.209 to 67.229°.
Index ranges -9 ≤ h ≤ 9, -20 ≤ k ≤ 22, -23 ≤ l ≤ 23
Reflections collected 37959
Independent reflections 5346 [R(int) = 0.0229]
Completeness to theta = 67.679° 97.5 %
Refinement method Full-matrix least-squares on F²
Data / restraints / parameters 5346 / 0 / 471
Goodness-of-fit on F² 1.044

Final R indices [$I > 2\sigma(I)$] $R_1 = 0.0231$, $wR_2 = 0.0628$

R indices (all data) $R_1 = 0.0233$, $wR_2 = 0.0630$

Absolute structure parameter $0.026(18)$

Extinction coefficient n/a

Largest diff. peak and hole 0.166 and $-0.176 \text{ e.}\text{\AA}^{-3}$

Table 2. Bond lengths [Å] and angles [°] for (-)-(S)-usnic acid (S-1)

O(1A)-C(2A)	1.361(2)
O(1A)-C(13A)	1.405(2)
O(14A)-C(4A)	1.286(2)
O(14A)-H(1SA)	1.20(4)
O(16A)-C(15A)	1.268(2)
O(16A)-H(1SA)	1.24(4)
O(17A)-C(6A)	1.244(2)
O(19A)-C(9A)	1.344(2)
O(19A)-H(19A)	0.8400
O(21A)-C(11A)	1.345(2)
O(21A)-H(21A)	0.8400
O(21B)-C(11B)	1.351(2)
O(21B)-H(21B)	0.8400
O(23A)-C(22A)	1.240(2)
C(2A)-C(3A)	1.338(2)
C(2A)-C(7A)	1.492(2)
C(3A)-C(4A)	1.440(3)
C(3A)-H(3A)	0.9500
C(4A)-C(5A)	1.437(2)
C(5A)-C(6A)	1.432(2)
C(5A)-C(15A)	1.440(2)
C(6A)-C(7A)	1.519(2)
C(7A)-C(8A)	1.514(2)
C(7A)-C(18A)	1.565(2)

C(8A)-C(13A)	1.369(2)
C(8A)-C(9A)	1.401(2)
C(9A)-C(10A)	1.398(2)
C(10A)-C(11A)	1.398(3)
C(10A)-C(20A)	1.507(2)
C(11A)-C(12A)	1.427(2)
C(12A)-C(13A)	1.400(2)
C(12A)-C(22A)	1.461(2)
C(15A)-C(24A)	1.487(3)
C(18A)-H(18A)	0.9800
C(18A)-H(18B)	0.9800
C(18A)-H(18C)	0.9800
C(20A)-H(20A)	0.9800
C(20A)-H(20B)	0.9800
C(20A)-H(20C)	0.9800
C(22A)-C(25A)	1.501(3)
C(24A)-H(24A)	0.9800
C(24A)-H(24B)	0.9800
C(24A)-H(24C)	0.9800
C(25A)-H(25A)	0.9800
C(25A)-H(25B)	0.9800
C(25A)-H(25C)	0.9800
O(1B)-C(2B)	1.372(2)
O(1B)-C(13B)	1.402(2)
O(14B)-C(4B)	1.284(2)
O(14B)-H(1SB)	1.23(4)
O(16B)-C(15B)	1.274(2)

O(16B)-H(1SB)	1.22(4)
O(17B)-C(6B)	1.234(2)
O(19B)-C(9B)	1.341(2)
O(19B)-H(19B)	0.8400
O(23B)-C(22B)	1.237(2)
C(15B)-C(5B)	1.430(3)
C(15B)-C(24B)	1.482(3)
C(18B)-C(7B)	1.563(2)
C(18B)-H(18D)	0.9800
C(18B)-H(18E)	0.9800
C(18B)-H(18F)	0.9800
C(20B)-C(10B)	1.504(3)
C(20B)-H(20D)	0.9800
C(20B)-H(20E)	0.9800
C(20B)-H(20F)	0.9800
C(22B)-C(12B)	1.462(3)
C(22B)-C(25B)	1.496(3)
C(24B)-H(24D)	0.9800
C(24B)-H(24E)	0.9800
C(24B)-H(24F)	0.9800
C(25B)-H(25D)	0.9800
C(25B)-H(25E)	0.9800
C(25B)-H(25F)	0.9800
C(2B)-C(3B)	1.328(3)
C(2B)-C(7B)	1.493(2)
C(3B)-C(4B)	1.447(3)
C(3B)-H(3B)	0.9500

C(4B)-C(5B)	1.434(2)
C(5B)-C(6B)	1.447(2)
C(6B)-C(7B)	1.522(2)
C(7B)-C(8B)	1.515(2)
C(8B)-C(13B)	1.373(2)
C(8B)-C(9B)	1.396(2)
C(9B)-C(10B)	1.401(2)
C(10B)-C(11B)	1.392(3)
C(11B)-C(12B)	1.436(3)
C(12B)-C(13B)	1.399(2)
C(2A)-O(1A)-C(13A)	106.37(12)
C(4A)-O(14A)-H(1SA)	100.7(17)
C(15A)-O(16A)-H(1SA)	102.1(17)
C(9A)-O(19A)-H(19A)	109.5
C(11A)-O(21A)-H(21A)	109.5
C(11B)-O(21B)-H(21B)	109.5
C(3A)-C(2A)-O(1A)	124.85(15)
C(3A)-C(2A)-C(7A)	124.25(15)
O(1A)-C(2A)-C(7A)	110.87(13)
C(2A)-C(3A)-C(4A)	117.04(15)
C(2A)-C(3A)-H(3A)	121.5
C(4A)-C(3A)-H(3A)	121.5
O(14A)-C(4A)-C(5A)	120.26(16)
O(14A)-C(4A)-C(3A)	116.73(15)
C(5A)-C(4A)-C(3A)	122.73(15)
C(6A)-C(5A)-C(4A)	119.63(15)
C(6A)-C(5A)-C(15A)	122.57(15)

C(4A)-C(5A)-C(15A)	117.51(15)
O(17A)-C(6A)-C(5A)	125.12(15)
O(17A)-C(6A)-C(7A)	117.46(14)
C(5A)-C(6A)-C(7A)	117.05(14)
C(2A)-C(7A)-C(8A)	99.45(13)
C(2A)-C(7A)-C(6A)	113.62(14)
C(8A)-C(7A)-C(6A)	120.83(13)
C(2A)-C(7A)-C(18A)	107.94(14)
C(8A)-C(7A)-C(18A)	108.56(13)
C(6A)-C(7A)-C(18A)	105.87(13)
C(13A)-C(8A)-C(9A)	119.74(15)
C(13A)-C(8A)-C(7A)	107.20(14)
C(9A)-C(8A)-C(7A)	131.90(15)
O(19A)-C(9A)-C(10A)	119.14(15)
O(19A)-C(9A)-C(8A)	121.50(15)
C(10A)-C(9A)-C(8A)	119.34(16)
C(9A)-C(10A)-C(11A)	118.84(15)
C(9A)-C(10A)-C(20A)	120.82(16)
C(11A)-C(10A)-C(20A)	120.29(16)
O(21A)-C(11A)-C(10A)	116.55(15)
O(21A)-C(11A)-C(12A)	119.93(16)
C(10A)-C(11A)-C(12A)	123.52(15)
C(13A)-C(12A)-C(11A)	113.70(15)
C(13A)-C(12A)-C(22A)	125.24(15)
C(11A)-C(12A)-C(22A)	121.03(15)
C(8A)-C(13A)-C(12A)	124.71(15)
C(8A)-C(13A)-O(1A)	111.60(14)

C(12A)-C(13A)-O(1A) 123.61(15)
 O(16A)-C(15A)-C(5A) 119.40(16)
 O(16A)-C(15A)-C(24A) 116.57(16)
 C(5A)-C(15A)-C(24A) 124.01(15)
 C(7A)-C(18A)-H(18A) 109.5
 C(7A)-C(18A)-H(18B) 109.5
 H(18A)-C(18A)-H(18B) 109.5
 C(7A)-C(18A)-H(18C) 109.5
 H(18A)-C(18A)-H(18C) 109.5
 H(18B)-C(18A)-H(18C) 109.5
 C(10A)-C(20A)-H(20A) 109.5
 C(10A)-C(20A)-H(20B) 109.5
 H(20A)-C(20A)-H(20B) 109.5
 C(10A)-C(20A)-H(20C) 109.5
 H(20A)-C(20A)-H(20C) 109.5
 H(20B)-C(20A)-H(20C) 109.5
 O(23A)-C(22A)-C(12A) 120.16(16)
 O(23A)-C(22A)-C(25A) 118.45(16)
 C(12A)-C(22A)-C(25A) 121.38(15)
 C(15A)-C(24A)-H(24A) 109.5
 C(15A)-C(24A)-H(24B) 109.5
 H(24A)-C(24A)-H(24B) 109.5
 C(15A)-C(24A)-H(24C) 109.5
 H(24A)-C(24A)-H(24C) 109.5
 H(24B)-C(24A)-H(24C) 109.5
 C(22A)-C(25A)-H(25A) 109.5
 C(22A)-C(25A)-H(25B) 109.5

H(25A)-C(25A)-H(25B) 109.5
C(22A)-C(25A)-H(25C) 109.5
H(25A)-C(25A)-H(25C) 109.5
H(25B)-C(25A)-H(25C) 109.5
C(2B)-O(1B)-C(13B) 106.42(13)
C(4B)-O(14B)-H(1SB) 101.9(19)
C(15B)-O(16B)-H(1SB) 103.6(19)
C(9B)-O(19B)-H(19B) 109.5
O(16B)-C(15B)-C(5B) 119.80(16)
O(16B)-C(15B)-C(24B) 116.73(17)
C(5B)-C(15B)-C(24B) 123.47(16)
C(7B)-C(18B)-H(18D) 109.5
C(7B)-C(18B)-H(18E) 109.5
H(18D)-C(18B)-H(18E) 109.5
C(7B)-C(18B)-H(18F) 109.5
H(18D)-C(18B)-H(18F) 109.5
H(18E)-C(18B)-H(18F) 109.5
C(10B)-C(20B)-H(20D) 109.5
C(10B)-C(20B)-H(20E) 109.5
H(20D)-C(20B)-H(20E) 109.5
C(10B)-C(20B)-H(20F) 109.5
H(20D)-C(20B)-H(20F) 109.5
H(20E)-C(20B)-H(20F) 109.5
O(23B)-C(22B)-C(12B) 120.48(18)
O(23B)-C(22B)-C(25B) 118.30(18)
C(12B)-C(22B)-C(25B) 121.22(17)
C(15B)-C(24B)-H(24D) 109.5

C(15B)-C(24B)-H(24E) 109.5
 H(24D)-C(24B)-H(24E) 109.5
 C(15B)-C(24B)-H(24F) 109.5
 H(24D)-C(24B)-H(24F) 109.5
 H(24E)-C(24B)-H(24F) 109.5
 C(22B)-C(25B)-H(25D) 109.5
 C(22B)-C(25B)-H(25E) 109.5
 H(25D)-C(25B)-H(25E) 109.5
 C(22B)-C(25B)-H(25F) 109.5
 H(25D)-C(25B)-H(25F) 109.5
 H(25E)-C(25B)-H(25F) 109.5
 C(3B)-C(2B)-O(1B) 124.35(15)
 C(3B)-C(2B)-C(7B) 124.72(16)
 O(1B)-C(2B)-C(7B) 110.86(14)
 C(2B)-C(3B)-C(4B) 117.26(16)
 C(2B)-C(3B)-H(3B) 121.4
 C(4B)-C(3B)-H(3B) 121.4
 O(14B)-C(4B)-C(5B) 120.74(16)
 O(14B)-C(4B)-C(3B) 116.96(16)
 C(5B)-C(4B)-C(3B) 122.04(15)
 C(15B)-C(5B)-C(4B) 117.36(15)
 C(15B)-C(5B)-C(6B) 122.94(15)
 C(4B)-C(5B)-C(6B) 119.65(15)
 O(17B)-C(6B)-C(5B) 125.21(16)
 O(17B)-C(6B)-C(7B) 118.14(15)
 C(5B)-C(6B)-C(7B) 116.31(14)
 C(2B)-C(7B)-C(8B) 99.63(13)

C(2B)-C(7B)-C(6B)	113.14(14)
C(8B)-C(7B)-C(6B)	120.90(14)
C(2B)-C(7B)-C(18B)	109.49(14)
C(8B)-C(7B)-C(18B)	109.62(14)
C(6B)-C(7B)-C(18B)	103.90(13)
C(13B)-C(8B)-C(9B)	119.37(15)
C(13B)-C(8B)-C(7B)	107.58(14)
C(9B)-C(8B)-C(7B)	132.12(15)
O(19B)-C(9B)-C(8B)	121.87(15)
O(19B)-C(9B)-C(10B)	118.32(15)
C(8B)-C(9B)-C(10B)	119.80(15)
C(11B)-C(10B)-C(9B)	118.96(16)
C(11B)-C(10B)-C(20B)	121.33(16)
C(9B)-C(10B)-C(20B)	119.71(15)
O(21B)-C(11B)-C(10B)	117.41(16)
O(21B)-C(11B)-C(12B)	119.46(16)
C(10B)-C(11B)-C(12B)	123.13(15)
C(13B)-C(12B)-C(11B)	113.90(15)
C(13B)-C(12B)-C(22B)	125.75(17)
C(11B)-C(12B)-C(22B)	120.34(16)
C(8B)-C(13B)-C(12B)	124.73(16)
C(8B)-C(13B)-O(1B)	111.59(14)
C(12B)-C(13B)-O(1B)	123.63(15)

Autorizações de Coleta



6198772742534674

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010026/2014-2

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 104/2011, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA - UFV

CNPJ: 259.444.550/0001-96

Representante Legal: EDUARDO SEITI GOMIDE MIZUBUTI

Cargo/Função: Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

CPF: 629.427.606-30 **RG:** M1137959

Projeto: Caracterização Química e biológica dos Metabólitos Secundários de Plantas da Serra do Brigadeiro - MG

Coordenador do Projeto: Sergio Antonio Fernandes

CPF: 027.529.526-51 **RG:** M8016616 - SSP _ MG / MG

Finalidade do projeto: O sucesso das práticas agrícolas modernas e do tratamento das diversas doenças que acometem o homem e os animais está intimamente associado à descoberta de novos produtos químicos. Há uma preocupação crescente quanto ao impacto que estas substâncias causam ao meio ambiente e ao Homem, o que leva à adoção de políticas mais severas para o registro destas. Além disso, a seleção de organismos resistentes, associada ao uso indiscriminado e incorreto dos produtos comerciais, leva a uma busca por novas substâncias com novos mecanismos de ação, alta especificidade, alta eficiência em baixa dosagem, baixa toxicidade e baixa persistência no meio ambiente. A síntese aleatória de novas substâncias ou o desenho racional de moléculas são alternativas interessantes na busca por novos agroquímicos e fármacos, no entanto, estas técnicas não alcançam o bom desempenho que delas se espera. De fato, o pilar estrutural molecular utilizado em química orgânica é limitado. Por outro lado, estudos complementares indicam que os grupos farmacofóricos presentes em substâncias de origem natural apresentam uma grande diversidade estrutural, com mais centros quirais, carbonos sp³ e esqueletos cíclicos do que aqueles presentes em compostos sintéticos. Neste contexto, ambientes como os campos de altitude são particularmente importantes para os estudos que buscam a descoberta de novas substâncias naturais biologicamente ativas. Nestes locais existe uma elevada taxa de endemismo, e os organismos desse meio único e raro podem ser responsáveis pela produção de substâncias ainda desconhecidas. Assim, o parque Estadual da Serra do Brigadeiro - PESB, situado no Maciço da Mantiqueira, próximo a cidade de Araponga - MG é uma grande fonte de pesquisa ainda inexplorada. Inicialmente, alguns autores identificaram nesta região, através de um levantamento florístico, 81 espécies de plantas, sendo quatro novas, o que leva ao interesse pela busca de novos metabólitos secundários presentes nestas plantas de altitude. Neste contexto, as substâncias encontradas nestas plantas terão suas bioatividades testadas contra as principais pragas agrícolas (fungos, carrapatos, plantas daninhas e formigas) e doenças que acometem o homem como o envelhecimento precoce, câncer e doenças fúngicas.

Amostras a serem acessadas:

Grupos Taxonômicos: *Baccharis platypoda* *Baccharis dracunculifolia* *Cladonia rappii* *Lippia triplinervis* *Myrsine squarrosa*

Tipo de material/quantidade de amostras: Partes aéreas das plantas e talo/micélio quando líquen. Cerca de 1000 g de cada planta e 200 g de líquen.

Local de depósito de subamostra: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Equipe do projeto: SERGIO ANTONIO FERNANDES / CPF 027.529.526-51

TIAGO COELHO DE ASSIS LAGE / CPF 051.594.946-93

RICARDO MARQUES MONTANARI / CPF 040.281.376-67

Validade da Autorização: 01/02/2014 a 01/02/2017

Página 1 de 2

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio do Coordenador do Projeto, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003. O roteiro para confecção do relatório está disponível em <http://www.cnpq.br/web/guest/relatorio-de-atividades>. Os relatórios devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico, para o endereço apg@cnpq.br e, preferencialmente, em formato .pdf.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010026/2014-2. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

Se ocorrer coleta de espécie não autorizada ou não identificada, deverá ser observado o que consta no Decreto nº 6.514, de 22/07/2008, no que refere à flora e fauna, e em particular sobre espécies ameaçadas de extinção ou de endemismo estrito.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRTM). A remessa para instituições nacionais está isenta de autorização prévia. Contudo, a remessa para instituições sediadas no exterior depende de autorização prévia do CNPq, nos termos das resoluções do CGEN 15/2004 e 20/2006. Os modelos dos termos, assim como as citadas resoluções, estão disponíveis em <http://www.cnpq.br/web/guest/remessa-e-transporte> e devem ser enviados ao CNPq em meio eletrônico para o endereço apg@cnpq.br, preferencialmente em formato .pdf. Ainda, para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, especialmente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 21 de Janeiro de 2014

Raquel de Andrade Lima Coelho

Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 6198772742534674 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.

 Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica. Brasília, 21 de Janeiro de 2014 Raquel de Andrade Lima Coelho Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 161/2010	Processo: 010026/2014-2 Validade: 01/02/2014 a 01/02/2017 Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE VICOSA CNPJ: 259.444.550/0001-96 Pesquisador: Sergio Antonio Fernandes CPF: 027.529.526-51 RG: M8016616 - SSP _ MG / MG <i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/ e informar o número do protocolo 5740871357643631 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i>
--	--

Artigos

LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E. Acaricidal activity of *Lippia triplinervis* essential oil on larvae and engorged female of *R. microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 112, 863, 2013.

LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A.; MONTEIRO, C. M. O.; SENRA, T. O. S.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; DAEMON, E. Chemical composition and acaricidal effect of *B. dracunculifolia* and *B. platypoda* essential oil on *R. microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, 148, 24, 2015.

LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; da SILVA, J. G.; FERNANDES, S. A. Free Radical Scavenging and Antiproliferative Activities of (-)-(S)-Usnic Acid, Fumarprotocetraric Acid and a new o-Orsellinic Acid derivative, Rappiadic Acid, from the lichen *Cladonia rappii* **Journal of Natural Products**, a ser submetido em 2014.

LAGE, T. C. A.; LOPES, U. P.; MONTANARI, R. M.; da SILVA, M. S. S.; ZAMBOLIM, L.; ZACCHINO, S.; SORTINO, M.; FERNANDES, S. A. Fungicidal activity of essential oil and extracts of *Lippia triplinervis* Gardner and his major constituents: Thymol and carvacrol. **Crop Protection**, a ser submetido em 2015.

LAGE, T. C. A.; GANDRA, L.; MONTANARI, R. M.; DELLA LUCIA, T. M. C.; FERNANDES, S. A. Formicidal activity of essential oils from *L. triplinervis*, *B. dracunculifolia* and extracts from *M. squarrosa*. **Sociobiology**, a ser submetido em 2015.

Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)

Tiago Coelho de Assis Lage · Ricardo Marques Montanari ·
Sergio Antonio Fernandes · Caio Márcio de Oliveira Monteiro ·
Tatiane de Oliveira Souza Senra · Viviane Zeringota ·
Fernanda Calmon · Renata da Silva Matos · Erik Daemon

Received: 27 October 2012 / Accepted: 20 November 2012 / Published online: 6 December 2012
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012

Abstract The objective of this work was to characterize and investigate the acaricidal activity of the essential oil of the aerial parts of *Lippia triplinervis* at different concentrations on unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus*. The essential oil yielded 2.21 % (w/w to dry matter) and was composed mainly of carvacrol (31.9 %), thymol (30.6 %), and *p*-cymene (12.3 %). Two tests were performed to assess the acaricidal activity: the modified larval packet test, with concentrations of 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, and 20.0 mg/mL and the female immersion test, with concentrations of 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, and 50.0 mg/mL. There were ten repetitions for each concentration, and for each test, a control group was formed in which the ticks were treated with Tween 80 (20 mg/mL). The experimental groups were kept in a climate-controlled chamber (27±1 °C and RH >80 %). The mortality of the larvae was above 95 % in all the groups tested

and reached 100 % as of the 5.0 mg/mL concentration, while the control group exhibited 0 % mortality. In the female immersion test, there was a significant decline ($p<0.05$) in the egg mass weight, egg production index, and hatching percentage starting at the concentration of 30.0, 40.0, and 20.0 mg/mL, respectively, and the control percentage at the concentrations of 40.0 and 50.0 mg/mL were above 90 and 95 %. The *L. triplinervis* oil as thus an alternative source of the monoterpenes thymol, carvacrol, and *p*-cymene, and its toxicity on *R. microplus* larvae and females makes it promising possibility for control of this tick.

Introduction

The cattle tick *Rhipicephalus microplus* Canestrini (1888) is considered the most important livestock pest, from an economic standpoint, in the Neotropical region (Martins et al. 2006). In the Brazilian cattle tick, it is responsible of annual losses that are estimated at 2 billion dollars due to treatment costs and reduced animal performance (Grisi et al. 2002).

The control of *R. microplus* is usually done by the use of synthetic acaricides, but the majority of these commercial products have low efficiency due to the development of resistant strains, caused by years of indiscriminate use without proper technical criteria (Furlong et al. 2007; Amaral et al. 2011). There are reports of resistance to organophosphates, synthetic pyrethroids, amitraz, macrocyclic lactones, and fipronil (Furlong et al. 2007; Klafke 2008; Castro-Janer et al. 2010). According to Furlong et al. (2007), in Brazil, most commercial acaricides do not have efficacy greater than 70 %.

In addition to the problems of resistance, there is growing demand for safer control methods and reduced dependence

T. C. A. Lage · R. M. Montanari · S. A. Fernandes (✉)
Grupo de Química Supramolecular e Biomimética (GQSB),
Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa
(UFV), Campus Universitário, Avenida P.H. Rolfs, s/n,
Viçosa, Minas Gerais, Brazil 36570-000
e-mail: santonio@ufv.br

S. A. Fernandes
e-mail: sefermandes@gmail.com

T. de Oliveira Souza Senra · V. Zeringota · F. Calmon ·
R. da Silva Matos · E. Daemon
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas,
Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de
Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

C. M. de Oliveira Monteiro (✉)
Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
Brazil
e-mail: caiosat@gmail.com



Full length article

Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)



Tiago Coelho de Assis Lage ^a, Ricardo Marques Montanari ^a, Sergio Antonio Fernandes ^{a,*},
Caio Márcio de Oliveira Monteiro ^b, Tatiane de Oliveira Souza Senra ^c, Viviane Zeringota ^c,
Renata da Silva Matos ^b, Erik Daemon ^b

^a Grupo de Química Supramolecular e Biomimética (GQSB), Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Campus Universitário, Avenida P.H. Rolfs, s/n, Viçosa, MG, 36570-900, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Comportamento e Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Zoologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Ciências Veterinárias, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica, RJ, Brazil

HIGHLIGHTS

- The chemical composition of essential oil (EO) of *B. dracunculifolia* was accessed.
- *B. dracunculifolia* EO comprises mostly nerolidol, germacrene D and limonene.
- The volatile oil is highly active against *R. microplus* larvae and engorged female.
- Nerolidol is the major constituent responsible for acaricidal activity.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 August 2014

Received in revised form 9 October 2014

Accepted 21 October 2014

Available online 24 October 2014

Keywords:

Cattle ticks
Alecrim-do-campo
Terpenes
Nerolidol
Limonene

ABSTRACT

Baccharis dracunculifolia DC (common name "alecrim-do-campo" in Brazil) is a plant with widespread distribution in South America that is the botanical origin of green propolis. The aim of this study was to evaluate the chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *B. dracunculifolia* and its constituents nerolidol and limonene on unengorged larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). The essential oil yield was 0.8% of dry mass and the major constituents were nerolidol (22.3%), germacrene D (7.2%), limonene (6.9%), β -pinene (6.7) and bicyclogermacrene (6.5%). The acaricidal activity of the essential oil and the pure compounds nerolidol and (R)-(+)-limonene were assessed in the laboratory through the modified larval packet test (LPT) and the female immersion test (FIT). In the LPT, the essential oil and nerolidol were both active, causing more than 90% mortality at concentrations from 15.0 and 10.0 mg mL⁻¹, respectively, whereas (R)-(+)-limonene was not active. In the FIT, the oil and nerolidol caused reduction in the quantity and quality of eggs produced, with control

* Corresponding author.

E-mail address: santonin@ufv.br or sfernandes@gmail.com (S.A. Fernandes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2014.10.011>

0014-4894/© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

Congressos

LAGE, T. C. A.; LOPES, U. P.; MONTANARI, R. M.; da SILVA, M. S. S.; ZAMBOLIM, L.; FERNANDES, S. A. **Análise da atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas rupestres de Minas Gerais** no VI SIMPÓSIO IBEROAMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS, Ponta Grossa-PR, junho de 2012.

SENRA, T. O. S.; LAGE, T. C. A.; MONTANARI, R. M.; ZERINGOTA, V.; CALMON, F.; MATOS, R. S.; MONTEIRO, C. M. O.; DAEMON, E.; FERNANDES, S. A. **Atividade do óleo essencial de *Lippia microcephala* sobre larvas de *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (acari: ixodidae)** no XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, São Luiz - MA, setembro de 2012.

CALMON, F.; LAGE, T. C. A.; SENRA, T. O. S.; MONTANARI, R. M.; ZERINGOTA, V.; MATOS, R. S.; MONTEIRO, C. M. O.; DAEMON, E.; FERNANDES, S. A. **Mortalidade de larvas de *R. microplus* e *R. sanguineus* tratadas com óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia*** no XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, São Luiz - MA, setembro de 2012.

LAGE, T.C.A.; da SILVA, J. G.; MONTANARI, R. M.; FERNANDES, S. A. **Primeira descrição de (-)-(S)-ácido úsnico em *Cladonia rappii* Evans** no XXVI ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Ouro Preto-MG, novembro de 2012.

LAGE, T.C.A.; RODRIGUEZ, M. V.; MONTANARI, R. M. M.; FERNANDES, S. A. ZACHINNO, S. **Composition and Antifungal Activity of Essential Oils from *Lippia triplinervis*, *Baccharis platypoda* and *Baccharis dracunculifolia*** no 5th Mercosur Meeting on Pharmaceutical Sciences, Porto Alegre, novembro de 2013.



CERTIDÃO

Certificamos para os devidos fins que o trabalho ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS RUPESTRES DE MINAS GERAIS, de autoria de Ueder Pedro Lopes, Ricardo Marques Montanari, Maria do Socorro Souza da Silva, Laercio Zambolim, Sergio Antonio Fernandes, foi apresentado por Tiago Coelho de Assis Lage, na categoria Poster, durante o(a) evento de extensão VI Simpósio Iberoamericano de Plantas Medicinais, promovido pela Universidade Estadual de Ponta Grossa/Pró-Reitoria de Extensão e Assuntos Culturais /Rede Iberoamericana de Estudo e Aproveitamento Sustentável da Biodiversidade Regional de Interesse Farmacêutico - RIBIOFAR/CYTED/CNPq, realizado(a) no período de 13 a 15 de Junho de 2012. Coordenação de Dionezine de Fátima Navarro.

Ponta Grossa, 2 de Julho de 2012.


Prof. Dr. Gisele Alves de Sá Quimelli
Pro-Reitor de Extensão e Assuntos Culturais

**XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária
XXIII Jornada Maranhense de Parasitologia e Medicina Tropical**

Certificamos que

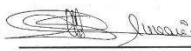
Viviane Zeringota Rodrigues; Tiago Coelho de Assis Lage; Tatiane de Oliveira Souza Serra; Fernanda Calmon; Renata da Silva Matos; Caio Márcio de Oliveira Monteiro; Ricardo Marques Montanari; Sergio Antonio Fernandes; Erik Daemou

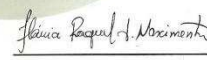
Participou do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e da XXIII Jornada Maranhense de Parasitologia e Medicina Tropical realizados nos dias 3 à 6 de setembro de 2012 na cidade de São Luis, Estado do Maranhão, na qualidade de

Apresentadores do pôster AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO ÓLEO DE Lippia microcephala SOBRE FÊMEAS DE Rhipicephalus microplus (ACARI: Ixodidae)

São Luis, MA, 06 de Setembro de 2012.


Livio Martins Costa Júnior
Presidente XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária


Solange Maria Gennari
Presidente do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária


Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Presidente XXIII Jornada Maranhense de Parasitologia e Medicina Tropical

**XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária
XXIII Jornada Maranhense de Parasitologia e Medicina Tropical**

Certificamos que

*Fernanda Calmon; Tiago Coelho de Assis Lage; Tatiane de Oliveira Souza Serra; Ricardo Marques Montanari; Viviane Zeringota Rodrigues;
Renata da Silva Matos; Caio Márcio de Oliveira Monteiro; Erik Dacmon; Sergio Antonio Fernandes*

**Participou do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e
da XXIII Jornada Maranhense de Parasitologia e Medicina Tropical realizados
nos dias 3 à 6 de setembro de 2012 na cidade de São Luis, Estado do Maranhão,
na qualidade de
Apresentadores do pôster MORTALIDADE DE LARVAS DE *R. microplius* E *R. sanguineus* TRATADAS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis dracunculifolia*)**

São Luis, MA, 06 de Setembro de 2012.


Livio Martins Costa Júnior
Presidente XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária

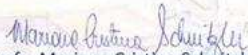

Solange Maria Gennari
Presidente do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária

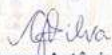

Flávia Raquel Fernandes do Nascimento
Presidente XXIII Jornada Maranhense de Parasitologia
e Medicina Tropical



**ENCONTRO REGIONAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA
OURO PRETO • 2012 • MINAS GERAIS**

Certificamos que **Tiago Lage**, **Jefferson Guilherme da Silva**, **Ricardo Marques Montanari** e **Sergio Antonio Fernandes** são autores(as) do trabalho **Primeira descrição de (-) - (S) - Ácido Úsnico em Cladonia rappii Evans do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, MG** apresentado nas formas oral e de pôster no XXVI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, realizado no Centro e Artes e Convenções da UFOP, no período de 12 a 14 de novembro de 2012 em Ouro Preto - Minas Gerais.


Profa. Mariane Cristina Schnitzler
Presidente da Comissão Organizadora


Profa. Gilmarê Antônia da Silva
Presidente da Comissão Científica

Organização



Patrocínio



Apoio



5th Meeting of Pharmaceutical Sciences
COMPOSITION AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM *Lippia triplinervis*, *Baccharis platypoda* AND *Baccharis dracunculifolia*.

Lage, T.C.A.^{1,*}; Rodríguez, M. V.²; Montanari, R.M.¹; Fernandes, S.A.¹; Zacchino, S.²

¹Grupo de Química Supramolecular e Biomimética, Universidade Federal de Viçosa - UFV;

²Área de Farmacognosia, Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina.

Introduction: In immunocompromised or high-risk hospitalized patients, Invasive Fungal Infections are a major cause of mortality, with rates often >50%¹. Although it appears to be an array of antifungal drugs for clinical use, the eradication of mycoses is not an easy task, since recurrence and resistance lead to many fails². There is a general consensus that new antifungal drugs are necessary. In this context, natural products emerge as an alternative to combat these infections.

Objective(s): The aim of this work was evaluate the composition and antifungal activity of the essential oils (EO) from *B. platypoda* DC, *B. dracunculifolia* DC and *L. triplinervis* Gardner against pathogenic fungi.

Materials and Methods: *L. triplinervis* and *B. platypoda* were collected at State Park of Serra do Brigadeiro – MG, Brazil in two different places (**PM**=Pico do Mamute - 20°41'13.54"S, 42°28'38.81"W, 1845m and **PG**=Pico do Gramma - 20°43'33.20"S, 42°28'45.36"W, 1549m). *B. dracunculifolia* was collected in UFV Campus (20°41'4.44"S, 42°51'34.68"W, 682m). The EOs were extracted by hydrodistillation in a Clevenger apparatus for 4 h. The oils were analyzed in a GC/MS Shimadzu GCMS-QP 5000A and the quantification was carried out in a GC/FID Shimadzu GC17-A using a Capillary column SUPELCO DB-% (30m x 0,25mm x 0,25µm) Under these conditions: Carrier gas (He)=1,8mL/min, injector Ta=230°C, column Ta=40°C for 2 min, then 40-240°C 3°C/min. The fungal strains used were *Candida albicans* (Cal) ATCC 10231, *C. tropicalis* (Ct) CCC131, *Cryptococcus neoformans* (Cn) ATCC 32264, *Aspergillus fumigatus* (Afu) ATCC 26934, *A. flavus* (Afl) ATCC 9170, *A. niger* (Ani) ATCC 9029, *Trichophyton mentagrophytes* (Tm) ATCC 9972 from American Type Culture Collection. *Microsporium gypseum* (Mg) CCC 115 and *Trichophyton rubrum* (Tr) CCC 113 from Centro de Referência en Micología – Rosario, Argentina (CCC). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of each essential oil was determined by using broth microdilution methods of the Clinical Laboratory Standards Institute M27-A3 and M 38-A2².

Results and Discussion: The yields and the major components of EOs were, respectively: *L. triplinervis* PM, 2.21%, carvacrol (31.9%), thymol (30.6%) and *p*-cymene (12.3%) for PG, 2.92%, carvacrol (46.4%), *p*-cymene (15.9%) and γ -terpinene (12.9%); *B. platypoda* PM, 0.8%, β -felandrene (27.6%), sabinene (17.6%) and α -pinene (8.6%); for PG, 0.92%, sabinene (26.3%), α -pinene (12.1%) and α -amorfane (10.3%). For *B. dracunculifolia*, 0.8%, nerolidol (22.3%), germacrene D (7.2%), limonene (6.9%) and β -pinene (6.7%). *Aspergillus* spp. were not sensitive to the EO, thymol or carvacrol. *L. triplinervis* EO of PM and PG showed the most potent activity against Mg, Tr and Tm with MIC = 31.2 µg/mL, surely due to the presence of thymol and carvacrol MICs = 15.6 µg/mL. The tested fungi showed low-sensitivity to *B. platypoda* PM, with MIC = 125 to 1000 µg/mL. However, Mg, Tr and Tm was surprisingly sensitive to *B. platypoda* PG, with MIC = 31.2 µg/mL, probably due to the high concentration of sabinene³. *B. dracunculifolia* EO was active only against Cn (MIC=62.5 µg/mL).

Conclusions: The results indicated that *L. triplinervis* EO was the most active among all tested EOs, surely due to the presence of thymol and carvacrol in high concentrations. The antifungal activity of *B. platypoda* PG EO, is reported for the first time and It is possible that the high concentration of sabinene was related to its antifungal activity. *B. dracunculifolia* EO has a quite lower antifungal activity compared to the rest of tested plants.

References:

1. D.P. Kontoyiannis, *Am J Med*, **125**, 525 (2012).
2. V. K. Kouznetsov et al., *Bioorgan Med Chem* **20**, 6506 (2012).
3. K. Kohzaki et al., *J Plant Phys* **166**, 6506 (2009).

Acknowledgements: To CNPq and CAPES/Brazil for financial support, FAPEMIG/Brazil for providing the Ph.D. fellowship and IEF-MG to concede the plant collect license 003/12. SZ and MVR acknowledge CONICET and ANPCyT (PICTs 0608-2010 and 1494-2009).