



UFOP

Universidade Federal
de Ouro Preto

**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE OURO PRETO**

**Instituto de Ciências Exatas e
Biológicas**



Dissertação

**Identificação de Substâncias Bioativas
Presentes em Extratos de Fungos Endofíticos
Associados à *Eremanthus erythropappus*
(Asteraceae) e Atividade Alelopática do Óleo
Essencial das Folhas**

Ana Paula Resende Pinto

Programa de Pós-Graduação em Química

PPGQUIM

Ouro Preto

2016



IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS PRESENTES EM EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS À *EREMANTHUS ERYTHROPAPPUS* (ASTERACEAE) E ATIVIDADE ALELOPÁTICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS

Autora: **Ana Paula Resende Pinto**

Orientadora: **Prof.^a Dr.^a Andréa Mendes do Nascimento**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração:

Química Orgânica

Ouro Preto/MG
Setembro de 2016

P659i

Pinto, Ana Paula Resende.

Identificação de substâncias bioativas presentes em extratos de fungos endofíticos associados à *eremanthus erythropappus* (asteraceae) e atividade alelopática do óleo essencial das folhas [manuscrito] / Ana Paula Resende Pinto. - 2016.

106f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Mendes do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica.

1. Compostas (Botânica). 2. Fungos. 3. Agentes alelopáticos. 4. Essências e óleos essenciais. I. Nascimento, Andréa Mendes do. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 547

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Química



**“Identificação de Substâncias Bioativas Presentes em
Extratos de Fungos Endofíticos Associados à
Eremanthus Erythropappus e Atividade Aleopática do
Óleo Essencial das Folhas”**

Autora: Ana Paula Resende Pinto

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, em 15 de setembro de 2016, pela comissão examinadora composta pelos membros:


Prof. Dr. José Carlos de Magalhães
UFSJ


Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho
UFOP


Prof.ª Dr.ª Andréa Mendes do Nascimento
UFOP

Nenhuma grande vitória é possível sem que tenha sido precedida de pequenas vitórias sobre nós mesmos.

L. M. Leonov

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

... À Deus que sempre iluminou o meu caminho, guiou os meus passos, me dando forças pra seguir em frente, me abençoando juntamente com Nossa Senhora Aparecida, todos os anjos e santos.

... Aos meus pais, Libério e Darlene, pelo amor, carinho, confiança, incentivo e apoio incondicional, por serem o meu alicerce e o meu porto seguro.

... Às minhas irmãs Emília e Raquel pelos momentos de descontração, companheirismo, amizade, tolerância e amor.

... À minha sobrinha linda Rafaela, que trouxe tanta alegria para mim e minha família, sendo um anjinho em nossas vidas.

... À minha avó Mariazinha pelo colo, amor, orações, carinho e alegria com que sempre se dirigia a mim.

... Aos meus familiares, em especial a tia Cláudia e tia Renilda por sempre ouvirem os meus desabafos, pelos conselhos, incentivo, carinho e risadas proporcionadas.

... À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Andréa Mendes do Nascimento pela oportunidade, orientação, pelos conhecimentos transmitidos e apoio na elaboração deste trabalho.

... Aos meus professores da graduação Msc. Camila de Melo Silva e Dr. Pascoal José Gaspar Júnior por sempre acreditarem em mim e por me incentivarem a buscar cada vez mais o conhecimento.

... Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela identificação molecular dos fungos endofíticos.

... Ao Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira do Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Piauí (UFPI) pelas análises da atividade citotóxica.

... Ao Prof. Dr. Marcos José Salvador do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) pelas análises da atividade antimicrobiana.

... À doutoranda Janaína Brandão Seibert do Laboratório de Farmacognosia, da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, pela ajuda e auxílio na realização da atividade alelopática, bem como na sua interpretação.

... Ao laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), pelas análises no aparelho de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectroscopia de Massa e na Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

... Ao Prof. Dr. Jason Guy Taylor pelo apoio, incentivo e conversas, de modo que eu permanecesse firme mesmo diante das dificuldades.

... As meninas da disciplina de Química Orgânica Avançada: Aline, Josilene e Paula minha segunda família, por me acolherem com tanto carinho, me ouvirem, me aconselharem, pela força, pelas horas de estudo e momentos incríveis compartilhados durante esses dois anos de Pós-Graduação.

... Aos amigos que fiz durante esses dois anos de mestrado, em especial a Thatiane, o Diego, a Gleicekelly, a Josierica, o Wellington, a Liz e a Viviane, os quais se tornaram tão importantes, onde dividimos momentos de alegria, compreensão, aprendizado e ensinamentos.

... Aos meus amigos, principalmente a Fatinha, Lucas, Nilo, Brenda, Nane e Sabrina pela cumplicidade, pelo companheirismo, pelas palavras de conforto e pela amizade forte e verdadeira.

... À vocês e todos aqueles que de forma direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista, que sempre acreditaram em mim, me ajudaram e apoiaram dando força para vencer mais esta etapa da minha vida, o MEU MUITO OBRIGADA!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Biodiversidade.....	4
2.2 Produtos naturais.....	5
2.3 Fungos endofíticos.....	8
2.4 Metabólitos secundários obtidos da relação planta/endofítico.....	12
2.5 Família Asteraceae.....	14
2.6 <i>Eremanthus erythropappus</i>	16
2.7 Óleo essencial.....	17
2.7.1 Óleo essencial de <i>Eremanthus erythropappus</i>	18
2.8 Atividades biológicas.....	19
2.8.1 Atividade antimicrobiana.....	19
2.8.2 Atividade antiproliferativa (citotóxica).....	20
2.8.3 Atividade alelopática.....	21
2.8.3.1 Plantas daninhas.....	23
3 OBEJTIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Local da coleta.....	28
4.2 Isolamento e preservação dos fungos endofíticos.....	28
4.3 Identificação dos fungos endofíticos.....	30
4.4 Condições de cultura dos fungos e preparação dos extratos brutos.....	31
4.4.1 Cultura sólida para preparação dos extratos brutos em pequena escala.....	31
4.4.2 Cultura sólida para preparação dos extratos brutos citotóxicos e antimicrobianos em larga escala.....	32

4.5	Triagem química dos extratos etanólicos dos fungos endofíticos associados à <i>E. erythropappus</i>	33
4.6	Ensaio de atividades biológicas.....	34
4.6.1	Ensaio de atividade antiproliferativa (citotóxica).....	34
4.6.2	Ensaio de atividade antimicrobiana.....	35
4.6.3	Ensaio de atividade alelopática.....	38
4.7	Triagem química das frações hexânica e acetato de etila dos fungos endofíticos com atividade citotóxica e antimicrobiana.....	39
4.8	Isolamento e purificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos brutos ativos.....	39
4.9	Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados.....	41
4.10	Obtenção e caracterização do óleo essencial das folhas de <i>E. erythropappus</i> ...	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1	Local da coleta.....	43
5.2	Isolamento e preservação dos fungos endofíticos.....	44
5.3	Identificação dos fungos endofíticos.....	45
5.4	Condições de cultura dos fungos e preparação dos extratos brutos.....	47
5.4.1	Cultura sólida para preparação dos extratos brutos em pequena escala.....	47
5.4.2	Cultura sólida para preparação dos extratos brutos citotóxicos e antimicrobianos em larga escala.....	48
5.5	Triagem química dos extratos etanólicos dos fungos endofíticos associados à <i>E. erythropappus</i>	49
5.6	Ensaio de atividades biológicas.....	50
5.6.1	Ensaio de atividade antiproliferativa (citotóxica).....	50
5.6.2	Ensaio de atividade antimicrobiana.....	52
5.6.3	Ensaio de atividade alelopática.....	54
5.7	Triagem química das frações hexânica e acetato de etila dos fungos endofíticos com atividade citotóxica e antimicrobiana.....	58
5.8	Isolamento e purificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos brutos ativos.....	59
5.8.1	Estudo das frações hexânicas dos fungos 4 e 5.....	59
5.8.2	Estudo das frações hexânicas dos fungos 9 e 11.....	65
5.8.3	Estudo das frações acetato de etila dos fungos 4, 9 e 11.....	69
5.8.3.1	Estudo do fungo 4.....	69
5.8.3.2	Estudo do fungo 9.....	70

5.8.3.3	Estudo do fungo 11.....	71
5.9	Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados.....	72
5.9.1	Determinação estrutural de F4-P10–Se4.....	72
5.9.2	Determinação estrutural de F11-A4.....	87
5.10	Obtenção e caracterização do óleo essencial das folhas de <i>E. erythropappus</i> ...	89
6	CONCLUSÕES.....	94
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

RSUMO

Os micro-organismos endofíticos são aqueles que são detectados em um momento particular associados aos tecidos aparentemente saudáveis de plantas hospedeiras. A relação bioquímica e a produção de metabólitos entre micro-organismos e suas plantas hospedeiras ainda é pouco investigada. Como resultado da importância destes metabólitos secundários na natureza, eles estão sendo estudados para ter aplicabilidade na medicina, na indústria e na agronomia. Este estudo propôs o isolamento, identificação e avaliação de atividades biológicas (antimicrobiana e antiproliferativa) dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados às folhas de *Eremanthus erythropappus*, além de caracterizar quimicamente o óleo essencial obtido das folhas da mesma, bem como avaliar sua atividade alelopática. Os 11 fungos endofíticos isolados de *E. erythropappus* foram cultivados em meio de cultura sólido (arroz), obtendo assim os extratos etanólicos brutos. Dos 11 fungos endofíticos isolados, 7 foram identificados por métodos moleculares, em termos de ordem e classe. Em seguida, foi realizada uma bioprospecção desses extratos brutos em bioensaios para avaliação das atividades biológicas. Em relação ao efeito antiproliferativo os extratos fúngicos 9 e 11 induziram atividade moderada das três linhagens celulares tumorais humanas testadas: PC3 (próstata-humano), HCT-116 (cólon-humano) e SF-295 (glioblastoma-humano). Para a atividade antimicrobiana as frações obtidas com hexano e acetato de etila do fungo 4 induziram efeito sobre as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para o fungo 5 apenas a fração acetato de etila gerou efeito sobre a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. Os extratos brutos com ação antimicrobiana e citotóxica, fontes potenciais de moléculas bioativas, foram investigados quimicamente, após cultivo em maior escala dos fungos endofíticos que os produziram. Realizaram-se duas triagens químicas, a primeira com todos os 11 extratos etanólicos, e a segunda com apenas as frações em hexano e acetato de etila, oriundas de partições dos extratos etanólicos dos fungos ativos. Os metabólitos secundários foram isolados através de métodos cromatográficos e a determinação estrutural foi realizada por métodos espectroscópicos. O metabólito secundário da sub-fração F4-P10-Se, isolado do extrato em acetato de etila do fungo 4 foi submetido à identificação por RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais. Com os dados dos espectros de RMN foi possível propor a estrutura como sendo um derivado do naftaleno. Também foi isolada, da fração acetato de etila do fungo 11, uma fração rica em griseofulvina (72,89%), uma substância que já foi isolada de extratos de outros fungos endofíticos, e possui atividade antiproliferativa e antifúngica descritas na literatura. Utilizando-se o aparelho de Clevenger, foi extraído o óleo essencial das folhas de *E. erythropappus* obtendo-se 0,049% de

rendimento. Neste óleo foram identificados por meio de CG-EM, 47 componentes representando 97,12% da sua constituição química, formada principalmente por sesquiterpenos e monoterpenos. Para o óleo essencial extraído no hidrodestilador, o rendimento foi de 0,12%, e foi utilizado para a realização do ensaio de atividade alelopática. Foi possível determinar pela primeira vez o potencial alelopático deste óleo sobre as sementes de alface, tomate, mostarda e picão-preto. Por meio dos valores da $CI_{50\%}$ verificou-se inibição para as plantas daninhas (mostarda e picão-preto) evidenciando um possível uso do óleo como um bioerbicida para o controle de gerenciamento das mesmas.

Palavras chave: *Eremanthus erythropappus*, fungos endofíticos, derivado do naftaleno, atividade antimicrobiana, atividade antiproliferativa, óleo essencial, atividade alelopática.

ABSTRACT

Identification of Bioactive Substances Present in Extracts Obtained from Endophytic Fungi Associated with *Eremanthus erythropappus* (Asteraceae) and Allelopathic Activity of the Essential Oil of the Leafs

Endophytic microorganisms are encountered at specific moments in the tissue of healthy host plants. The biochemical relationships between these microorganisms and the plant host and the metabolites that they produce have been poorly investigated. Given the importance of these secondary metabolites in nature, they have been studied to for their applicability in medicine, industry and agronomy. The objective of this study was to isolate, identify and evaluate the biological activity (antimicrobial and antiproliferative) of secondary metabolites produced by endophytic fungi associated with the leafs of *Eremanthus erythropappus*, and chemically characterize the essential oil obtained from the leafs of *Eremanthus erythropappus*, as well as to assess their allelopathic activity. A total of 11 endophytic fungi isolated from *E. erythropappus* were cultured in solid medium (rice) and used to obtain raw ethanolic extracts. Amongst the 11 endophytic fungi evaluated, 7 were identified by molecular methods in terms of order and class. Next, a bioprospecting study of the crude extracts was carried out in order to determine any biological activity. In the case of antiproliferative activity, the extracts of fungus 9 and 11 induced moderate activity against three tested human tumor cell lines: PC3 (prostate-human), HCT-116 (colon-human) and SF-295 (glioblastoma-human). In the case of antimicrobial activity, the hexane and ethyl acetate fractions of fungus 4 exhibited antibacterial activity against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. For the fungus 5, only the ethyl acetate fraction generated effect on Gram negative bacteria *Escherichia coli*. Upon cultivation of the endophytic fungi on a large scale, the crude extracts with antimicrobial and cytotoxic activity were chemically investigated. Two chemical screens were carried out: the first with all 11 ethanolic extracts, and the second with only fractions of hexane and ethyl acetate, originating from the ethanolic extracts of active fungi. Secondary metabolites were isolated by chromatographic methods and their structure was determined by spectroscopic methods. The secondary metabolite resulting from the F4-P10 sub-fraction was isolated from the ethyl acetate extract of fungus 4 and its structure elucidated by ^1H and ^{13}C NMR techniques. A naphthalene structure was proposed for this compound. It was also isolated from the ethyl acetate fraction of fungus 11, a fraction rich in griseofulvin (72.89%), a substance that has been isolated from extracts of other endophytic fungi, and whose antifungal and antiproliferative has already been described in the literature. The leaves of *E. erythropappus*

yielded 0.049% of essential oil by the Clevenger apparatus. In this oil were identified by GC-MS, 47 components representing 97.12% of the chemical composition of the essential oil, which is mainly composed of sesquiterpenes and monoterpenes. In the case of the essential oil extracted by hydrodistillation, this oil was obtained in 0.12% yield and used to evaluate its allelopathic activity. The allelopathic potential of this oil on lettuce seeds, tomato, mustard and beggartick was determined for the first time. The IC_{50} demonstrated inhibition of various weeds (mustard and beggartick) and thus showing a possible use of this oil as a bioherbicide for the control and management of weeds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de fármacos obtidos de plantas: aspirina (1), digitoxina (2), morfina (3), quinina (4) e pilocarpina (5).....	6
Figura 2 - Metabólitos provenientes de fungos: mevinolina (6), ciclosporinas (7), alcaloide ergotamina (8), asperlicina (9) e papulacandina (10).....	7
Figura 3 - Estrutura química da penicilina (11) e cefalosporina (12) obtidas de fungos.....	8
Figura 4 - Tetranactina, produto natural utilizado na agricultura.....	8
Figura 5 - Compostos bioativos isolados de fungo endofítico: 3- (R)-7-butil-6,8-dihidroxi-3-pent-11-enil-isocroman-1-ona (14); 7-(R)-but-15-enil-6,8-dihidroxi-3-pent-11-enil-isocroman-1-ona (15); 7-(R)-butil-6,8-dihidroxi-3-pentil-isocroman-1-ona (16).....	10
Figura 6 - Citocalasinas, substâncias anticâncer produzidas pelo endofítico <i>Rinocladiella</i> sp.....	11
Figura 7 - Pestacina (21) e isopestacina (22), substâncias com atividades antioxidante e antimicrobiana, obtidas do fungo endofítico <i>Pestalotiopsis microspora</i>	12
Figura 8 - Estrutura química do ácido nodulispórico obtido do fungo endofítico <i>Muscodor vitigenus</i>	13
Figura 9 - Paclitaxel, metabólito secundário, produzido por fungo endofítico.....	14
Figura 10 - Estrutura química da artemisinina, isolada da planta <i>Artemisia annua</i>	15
Figura 11 - Foto de <i>Eremanthus erythropappus</i>	16
Figura 12 - Substâncias testes aprovadas, usadas contra diversos tumores.....	21
Figura 13 - Dois agentes quimioterapêuticos isolados da planta <i>Catharanthus roseus</i> ..	21
Figura 14 - Possíveis vias de liberação dos aleloquímicos das plantas no ambiente.....	22
Figura 15 - Foto da planta <i>Brassica rapa</i> L.....	25
Figura 16 - Foto da planta <i>Bidens pilosa</i> L.....	25
Figura 17 - Foto da planta <i>Solanum palinacanthum</i> Dun.....	26
Figura 18 - Fluxograma do isolamento, identificação e preservação dos fungos endofíticos.....	29
Figura 19 - Fluxograma da cultura em pequena escala para obtenção dos extratos brutos.....	32

Figura 20 - Foto da área de coleta da planta <i>E. erythropappus</i> , na Canga do Degeo-UFOP, em Ouro Preto-MG.....	43
Figura 21 - Foto das folhas de <i>E. erythropappus</i> em saco plástico.....	44
Figura 22 - Foto da cabine de segurança biológica, contendo os materiais utilizados para desinfecção.....	44
Figura 23 - Fotos de placas de Petri contendo os fungos endofíticos de 1 a 11 isolados de folhas de <i>E. erythropappus</i>	45
Figura 24- Fotos de frascos de Erlenmeyer contendo cultura dos fungos endofíticos em meio sólido (arroz), acrescido de etanol 95%.....	48
Figura 25 - Representação da atividade alelopática do óleo essencial de folhas de <i>E. erythropappus</i> sobre sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>).....	54
Figura 26 - Representação da atividade alelopática do óleo essencial de folhas de <i>E. erythropappus</i> sobre sementes de tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>).....	55
Figura 27 - Representação da atividade alelopática do óleo essencial de folhas de <i>E. erythropappus</i> sobre sementes de mostarda (<i>Brassica rapa L.</i>).....	55
Figura 28- Representação da atividade alelopática do óleo essencial de folhas de <i>E. erythropappus</i> sobre sementes de picão-preto (<i>Bidens pilosa L.</i>).....	55
Figura 29 - Cromatograma obtido por CG para a fração hexânica do fungo 4.....	60
Figura 30 - Cromatograma obtido por CG para a fração hexânica do fungo 5.....	62
Figura 31 - Cromatograma obtido por CG para fração hexânica do fungo 9.....	65
Figura 32 - Cromatograma obtido por CG para fração hexânica do fungo 11.....	66
Figura 33 - Espectro de RMN de ¹ H de F4-P10–Se 4 (400 MHz , DMSO-d ₆).....	77
Figura 34 - Espectro de RMN de ¹³ C de F4-P10–Se 4 (100 MHz , DMSO-d ₆).....	78
Figura 35 - Espectro de RMN de ¹³ C, DEPT 135°, de F4-P10–Se 4 (100 MHz, DMSO-d ₆).....	79
Figura 36 - Espectro de correlação HSQC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz , DMSO d ₆).....	80
Figura 37 - Espectro de correlação HSQC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz , DMSO-d ₆) - Ampliação 1.....	81
Figura 38 - Espectro de correlação HSQC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz , DMSO-d ₆) - Ampliação 2.....	82
Figura 39 - Espectro de correlação HMBC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz , DMSO-d ₆).....	83

Figura 40 -	Espectro de correlação HMBC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz, DMSO- d ₆) - Ampliação 1.....	84
Figura 41 -	Espectro de correlação HMBC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz, DMSO- d ₆) - Ampliação 2.....	85
Figura 42-	Espectro de correlação HMBC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz, DMSO- d ₆) - Ampliação 3.....	86
Figura 43 -	Acoplamentos observados no espectro de correlação HMBC da substância F4-P10–Se4.....	74
Figura 44 -	Estrutura proposta para a substância F4-P10–Se4.....	76
Figura 45 -	Cromatograma obtido por CG para a fração F11-A4.....	87
Figura 46 -	Estrutura química da griseofulvina.....	88
Figura 47 -	Fotos do processo de obtenção do óleo essencial através do aparelho de Clevenger.....	89
Figura 48 -	Foto do Hidrodestilador (Linax), usado na extração do óleo essencial.....	90
Figura 49 -	Cromatograma obtido por CG do óleo essencial das folhas de <i>E.</i> <i>erythropappus</i>	90
Figura 50 -	Estrutura dos principais constituintes presentes no óleo essencial de <i>E.</i> <i>erythropappus</i>	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Micro-organismos utilizados para a análise do ensaio antimicrobiano.....	36
Tabela 2 -	Identificação molecular dos fungos endofíticos associados à <i>E. erythropappus</i>	46
Tabela 3 -	Extratos etanólicos brutos obtidos dos fungos endofíticos isolados de folhas de <i>E. erythropappus</i>	48
Tabela 4 -	Extratos etanólicos brutos obtidos em larga escala dos fungos com atividades citotóxicas e antimicrobianas.....	49
Tabela 5 -	Extratos fúngicos com atividades citotóxicas e antimicrobianas obtidos a partir da partição líquido-líquido.....	49
Tabela 6 -	Triagem química dos 11 extratos etanólicos brutos e o branco (sem adição de fungo).....	50
Tabela 7 -	Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos etanólicos brutos na concentração única de 50 µg/mL.....	51
Tabela 8 -	Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos em termos de concentração inibitória mínima (CIM).....	52
Tabela 9 -	Atividade antimicrobiana das frações em hexano e acetato de etila dos fungos 4 e 5.....	53
Tabela 10 -	Equações correspondentes à faixa de linearidade na determinação da porcentagem de inibição da germinação e do crescimento radicular para o óleo essencial de folhas de <i>E. erythropappus</i> sobre sementes de alface, tomate, mostarda e picão-preto.....	56
Tabela 11 -	Determinação da CI _{50%} da germinação e do crescimento radicular para o óleo essencial de folhas de <i>E. erythropappus</i> sobre sementes de alface, tomate, mostarda e picão-preto.....	56
Tabela 12 -	Triagem química das frações em hexano e acetato de etila dos fungos 4, 5, 9 e 11.....	59
Tabela 13 -	Compostos químicos presentes na fração hexânica do fungo 4 identificados por CG-EM.....	62
Tabela 14 -	Compostos químicos presentes na fração hexânica do fungo 5 identificados por CG-EM.....	63

Tabela 15 - Compostos químicos da fração hexânica do fungo 9 identificados por CG-EM.....	66
Tabela 16 - Compostos químicos da fração hexânica do fungo 11 identificados por CG-EM.....	67
Tabela 17 - Frações recolhidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 4.....	69
Tabela 18 - Frações reunidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 4.....	69
Tabela 19 - Sub-frações reunidas da CC de Sephadex da fração F4-P10.....	70
Tabela 20 - Frações recolhidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 9.....	70
Tabela 21 - Frações reunidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 9.....	71
Tabela 22 - Frações recolhidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 11.....	71
Tabela 23 - Frações reunidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 11.....	72
Tabela 24 - Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e de correlações da substância F4-P10–Se 4 (400 e 100 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm), multiplicidade, $J = \text{Hz}$).....	75
Tabela 25 - Compostos químicos da fração F11-A4 identificados por CG-EM.....	87
Tabela 26 - Composição química do óleo essencial das folhas de <i>E. erythropappus</i>	91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ASD	Meio de cultivo contendo ágar Sabouraud dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BDA	Meio de cultivo contendo Batata Dextrose Ágar
CC	Cromatografia em coluna
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CI _{50%}	Concentração Inibitória de 50%
CIM	Concentração inibitória mínima
°C	Grau Celsius
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
DPM	Desvio padrão da média
G	Grama
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
HR-ESI-MS	Alta resolução por <i>electrospray</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
IK	Índice de Kovats
J	Constante de acoplamento
(m/m)	Massa por massa
Mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
mg/L	Miligrama por litro
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
Nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da poliamerase

Ppm	Parte por milhão
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI-1640	Meio de cultivo criado por <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
R ²	Coefficiente de correlação linear
SDB	Meio de cultivo contendo caldo Sabouraud dextrose
TSA	Meio de cultivo contendo ágar tripticase de soja
TSB	Meio de cultivo líquido contendo caldo tripticase de soja
TR	Tempo de retenção
ufc/mL	Unidade formadora de colônias por mililitro
UV	Radiação ultravioleta
VCR	Variação do crescimento radicular
VG	Variação da germinação
(v/v)	Volume por volume
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
δ	Deslocamento químico

1 INTRODUÇÃO

Ao falar em biodiversidade, automaticamente pensa-se em alta diversidade de espécies ou formas de vida, tanto animal quanto vegetal, levando-se em conta tanto sua função ecológica quanto sua variedade genética, sem se esquecer de que toda e qualquer espécie possui um papel fundamental para o equilíbrio ambiental. Nas últimas décadas, espécies que demoraram milhões de anos para desenvolverem-se estão sendo dizimadas, e alterações dos sistemas naturais associados às atividades humanas, estão cada vez mais extensas e agressivas.¹

A biodiversidade do Brasil é considerada como uma fonte de substâncias biologicamente ativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos.²

Considerada uma das mais ricas do Planeta, a biodiversidade brasileira engloba de 15% a 25% de todas as espécies vegetais, a qual vem sendo estudada sob vários aspectos, envolvendo químicos, biólogos e farmacologistas, além de constar, uma alta taxa de endemismo biológico, dispersa em biomas únicos.³

O Cerrado brasileiro é reconhecido como a Savana mais rica do mundo, na qual toda a área Centro-oeste do país está sob a predominância do mesmo e de faixas de transição em relação a outros territórios vizinhos, nesse caso, especialmente o Amazônico, a Mata Atlântica e um pouco da Caatinga. Entretanto, o seu domínio distingue por apresentar-se como um território de difusão de espécies tanto animais quanto de espécies endêmicas. Contudo, o alto nível de endemismo e sua biodiversidade justificam a riqueza desse bioma.¹

O estado de Minas Gerais, na maior parte de seu território é revestido pela tipologia vegetal denominada Cerrado, seguido de Mata Atlântica e Caatinga. As famílias de plantas mais comuns e que se destacam nesse bioma são Melastomataceae, Eriocaulaceae, Velloziaceae, Asteraceae e Orchidaceae. Do ponto de vista da biodiversidade, campos rupestres são considerados importantes, pois concentram alto grau de espécies endêmicas.⁴

Muitas plantas de biomas brasileiros têm sido utilizadas como medicamentos naturais por populações, no tratamento de doenças tropicais, incluindo a leishmaniose, malária, esquistossomose, infecções fúngicas e bacterianas.⁵

Moléculas complexas como terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos são sintetizadas pelo metabolismo secundário das plantas e são de grande importância nas relações ecológicas planta/planta, planta/animal e, inclusive, planta/micro-organismo fitopatogênico. Tais substâncias são os produtos naturais e representam uma fonte alternativa

quase inesgotável de novas moléculas com potencial para serem utilizadas no controle químico de doenças.⁶

A descoberta acidental da penicilina, por Fleming em 1928, isolada do fungo *Penicillium notatum*, deu início aos estudos investigativos dos fungos, uma das fontes mais bem-sucedidas de produtos naturais. Pesquisas mostram o enorme potencial dos fungos em produzir diversas classes de substâncias que podem ser utilizadas tanto na medicina como na agricultura.⁷

Fármacos importantes de uso clínico em várias patologias foram obtidos de micro-organismos, destacando-se os antibióticos penicilina e cefalosporina como os exemplos mais conhecidos de produtos naturais de fungos.⁸ Entretanto, a frequência com que novos compostos são encontrados em extratos de micro-organismos de solo está em declínio, porque estes micro-organismos disponíveis têm sido selecionados numerosas vezes.⁹ Neste contexto, é importante uma nova ou pouco explorada fonte de substâncias químicas com potencial biológico, como os micro-organismos endofíticos.

Os fungos encontrados no interior de espécies vegetais, denominados como fungos endofíticos representam um enorme potencial na produção de substâncias novas e bioativas.⁷

Produtos naturais isolados de fungos endofíticos são atribuídos a uma gama de atividades biológicas, tais como: antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante, antidiabética, anticancerígena, antiviral, citotóxica, propriedades imunossupressoras, dentre outras. Alguns estudos mostram que fungos endofíticos têm a capacidade de produzir os mesmos constituintes químicos ativos que a planta hospedeira. Um exemplo bem conhecido é a produção do Taxol, um importante fármaco anticancerígeno, produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*.⁷

Plantas da família Asteraceae são estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, proporcionando o desenvolvimento de novos fármacos, inseticidas, entre outros. Em trabalhos científicos relacionados a espécies da família Asteraceae é reportado o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários, sendo as lactonas sesquiterpênicas consideradas como marcadores quimiotaxonômicos.¹⁰ Contidos em muitos órgãos vegetais, os óleos essenciais também são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides.¹¹

De grande importância econômica, as Asteraceas são cultivadas como ornamentais, medicinais, oleaginosas, aromáticas, inseticidas e comestíveis. São consideradas um dos grupos que obtiveram maior sucesso adaptativo entre as plantas com flores, além de apresentar grande diversidade e ampla distribuição, sendo encontrada em várias formações vegetais.¹²

Espécies de Asteraceae são muito encontradas na região de Ouro Preto em Minas Gerais, sendo um dos destaques o Parque Estadual do Itacolomi, uma área de elevada altitude (acima de 1200 m), referente a uma região de transição entre os domínios do Cerrado e da Mata Atlântica, que apresenta uma grande diversidade de fisionomias vegetais, de florestas estacionais semidecíduais a campos rupestres. No Parque Estadual do Itacolomi esta família encontra-se representada por 224 táxons, o que faz desta área a maior do Brasil em número de espécies de Asteraceae.¹³

O outro destaque é o campo rupestre no Campus da UFOP (Universidade Federal de Ouro Preto), Morro do Cruzeiro, o qual é objeto de estudo. Um levantamento florístico realizado neste campo rupestre resultou na coleta de 137 espécies distribuídas em 36 famílias, sendo a mais rica a Asteraceae com 32 espécies.¹⁴

Eremanthus erythropappus, popularmente conhecida como candeia, pertence à família Asteraceae, e ao grupo ecológico das pioneiras, considerada precursora na invasão de campos, desenvolvendo-se rapidamente em campos abertos.¹⁵

A planta é utilizada para a produção de mourões de cerca e seu óleo essencial, com propriedades antiflogísticas, antibacterianas, antifúngicas e dermatológicas, é muito empregado na indústria de medicamentos e cosméticos, resultando num alto valor econômico.¹⁶ Por ser endêmica e possuir histórico etnobotânico foi escolhida para estudo de identificação de substâncias bioativas presentes em extratos de seus fungos endofíticos associados.

Tendo em vista a importância dos produtos naturais, que representam uma enorme fonte de estruturas químicas únicas, onde existe grande potencial para a obtenção de novos compostos biologicamente relevantes, este estudo parece-nos justificado.

Outras justificativas dizem respeito ao fato da cidade de Ouro Preto possuir duas grandes áreas de vegetação com um número elevado de espécies de Asteraceae, e ao grande potencial ainda não estudado de fungos endofíticos associados às espécies desta família, objetivando-se a bioprospecção de produtos naturais citotóxicos e antimicrobianos. Além disso, existe uma ausência de estudos e publicações envolvendo a avaliação do potencial alelopático do óleo essencial das folhas da planta em destaque.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiversidade

A ciência da biodiversidade é reconhecida como área prioritária de investigação científica, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento.³ No Brasil, a biodiversidade é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas, assim a sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos.²

O estudo da biodiversidade em todos os seus aspectos é prioridade global, como reconhecido na Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento UNCED – Rio de Janeiro, 1992.¹⁷ A biodiversidade é definida como a variedade e a variabilidade existentes entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nos quais eles ocorrem.¹⁸ Ela engloba todos os recursos vivos da terra sendo que para o ser humano, a sua importância retrata o patrimônio natural de uma nação, ou seja, um conjunto de riquezas.¹⁹

Segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil hospeda entre 15 e 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado como o maior do planeta em número de espécies endêmicas.² Porém, é estimado que não mais do que 25.000 espécies de plantas já foi objeto de alguma investigação científica.²⁰

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente, o Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território nacional. Ele compreende os estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além do Amapá, Roraima e Amazonas, contendo abundância de espécies endêmicas. Em termos de diversidade biológica, é reconhecida como a Savana mais rica do mundo abrigando 11.627 espécies de plantas nativas já catalogadas.²¹

No trabalho desenvolvido por Myers e colaboradores (2000),²² foi estimado que o Cerrado brasileiro aparece como possuidor de 10.000 espécies vegetais, sendo que 4400 destas são endêmicas, o que representa aproximadamente 1,5% do total de espécies endêmicas do planeta. Porém, a exploração incontrolada existe e é um fato alarmante uma vez que, muitas áreas de biodiversidade estão sendo reduzidas, ano por ano, e importantes espécies de vegetais e animais estão ameaçadas de extinção.

Minas Gerais é o estado de primeira posição que apresenta a maior quantidade de espécies em três categorias de risco de extinção (“ criticamente em perigo” (CR), “Em perigo” (EN) e “Vulnerável” (VU)), com maior número de espécies avaliadas e ameaçadas.²³ Alguns

exemplos podem ser citados como as espécies *Staurogyne warmingiana* da família Acanthaceae, *Pfaffia minarum* da família Amaranthaceae, bem como a *Anteremanthus hatschbachii* pertencente à família Asteraceae, dentre várias outras dispostas na Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção.²⁴

Nesse contexto, é necessário estudar urgentemente o potencial químico e biológico de espécies vegetais, além de reunir esforços para tentar preservar esta biodiversidade para futuras gerações.

2.2 Produtos naturais

Produtos naturais têm uma longa e bem sucedida história nos processos de descoberta e desenvolvimento de fármacos.²⁵ Eles representam uma rica fonte de compostos biologicamente ativos e são um exemplo de diversidade molecular, com potencial reconhecido na descoberta e no desenvolvimento de medicamentos.²⁶

A maioria dos fármacos em uso clínico, ou são de origem natural, ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais. Embora existam, nos dias atuais, diversas estratégias e metodologias disponíveis para que se possa sintetizar e descobrir novos fármacos a química de produtos naturais representa uma dessas alternativas de sucesso historicamente privilegiada.²

Os produtos naturais são bioprodutos obtidos a partir de micro-organismos, plantas e animais, sendo há muito tempo utilizados pela medicina tradicional. Estudos clínicos, farmacológicos e químicos de medicamentos tradicionais, derivados predominantemente de plantas, foram a base para muitos fármacos, tais como aspirina (**1**), digitoxina (**2**), morfina (**3**), quinina (**4**) e pilocarpina (**5**), (Figura 1, página 6).²⁷

A área de produtos naturais chama a atenção dos pesquisadores para a grande diversidade de estruturas e de propriedades físico-químicas e biológicas dos produtos naturais.²⁸ Tradicionalmente a pesquisa em produtos naturais tem se inserido na interface entre química e biologia.²⁹ Ela permite a descoberta de novos princípios ativos, ou ainda, a descoberta de novas atividades para extratos de plantas e princípios ativos naturais já conhecidos.³⁰

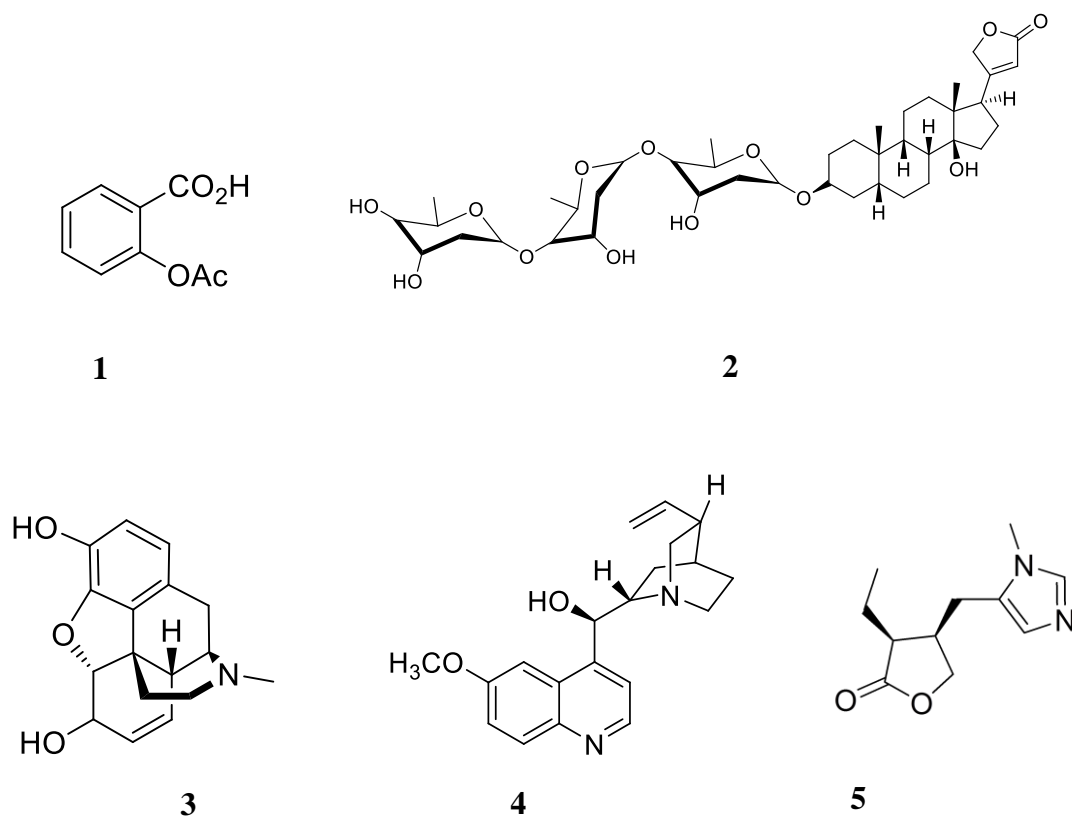


Figura 1 – Estruturas químicas de fármacos obtidos de plantas: aspirina (1), digitoxina (2), morfina (3), quinina (4) e pilocarpina (5).

A química de produtos naturais, atualmente conhecida como fitoquímica, se dedica principalmente à caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de espécies vegetais.³¹

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 20.000 espécies de plantas estão atualmente em uso para fins medicinais, sendo que o uso de plantas medicinais em todo o mundo e, especialmente, na América do Sul, contribui significativamente para a atenção primária à saúde, já que as plantas são fontes valiosas de produtos farmacêuticos.²⁷

Diante disso, o Brasil tem fornecido uma incrível variedade de plantas que tem atraído a atenção de etnofarmacologistas ao redor do mundo. Muitas plantas de biomas brasileiros, como o Cerrado (Savana) e Floresta Amazônica, têm sido usadas como medicamentos naturais pelas populações locais no tratamento de doenças tropicais, incluindo a leishmaniose, malária, esquistossomose, infecções fúngicas e bacterianas.⁵

As plantas produzem diversos metabólitos secundários que podem oferecer novas e excelentes oportunidades para diversificar o controle de pragas na agricultura, reduzindo ou eliminando a contaminação do ambiente, e conseqüentemente preservando os recursos naturais.³²

Aproximadamente 25% dos produtos naturais biologicamente ativos conhecidos foram obtidos a partir de fungos. Um exemplo notável de metabólitos provenientes de fungos com atividade farmacológica é a mevinolina (**6**) (mevacor = lovastatina), um agente redutor de colesterol, detentor de um mercado mundial em torno de US\$1 bilhão por ano. Outras substâncias de grande relevância como medicamento incluem ciclosporinas (**7**) e alcaloides ergotamina (**8**). Numerosos metabólitos de fungos vêm sendo descobertos como fármacos potenciais, incluindo asperlicina (antagonista de doenças gastrointestinais e SNC) (**9**), papulacandinas (**10**) (antifúngico), entre outros, (Figura 2).⁸

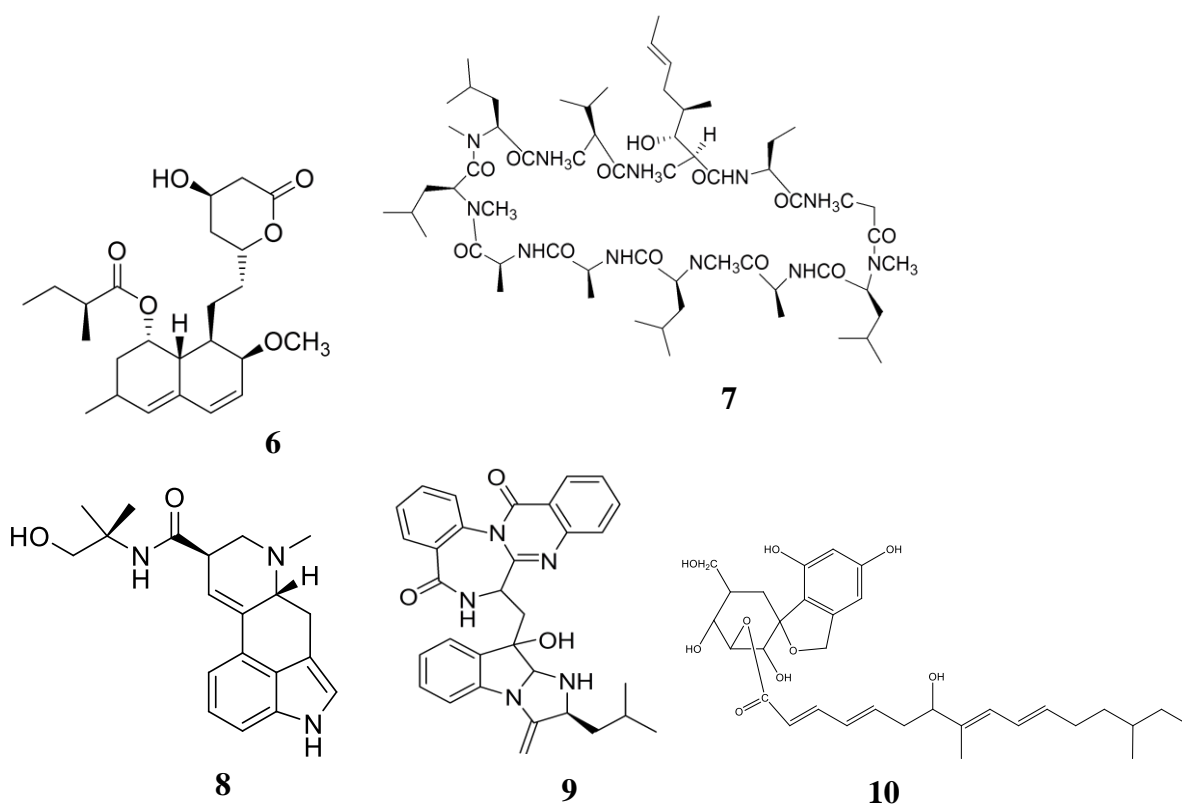


Figura 2 – Metabólitos provenientes de fungos: mevinolina (**6**), ciclosporina (**7**), alcaloide ergotamina (**8**), asperlicina (**9**) e papulacandina (**10**).

Ainda destacam-se os antibióticos β -lactâmicos das classes da penicilina (**11**) obtida do fungo *Penicillium notatum* e cefalosporina (**12**) através do fungo *Cephalosporium acremonium* (hoje renomeado *Acremonium chrysogenum*) (Figura 3), que juntos representam um mercado mundial de 15 bilhões de dólares.³³

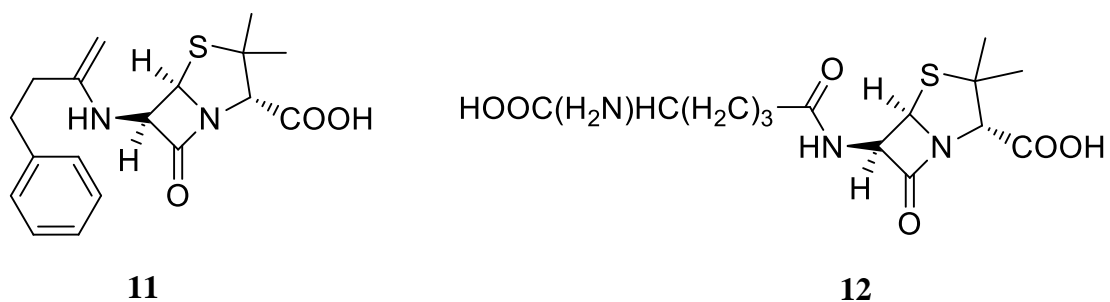


Figura 3 – Estrutura química da penicilina (**11**) e cefalosporina (**12**) obtidas de fungos.

Não apenas no tratamento humano, mas também no combate de pragas, substâncias isoladas de fungos possuem emprego no consumo de um grande percentual da produção agrícola mundial. Esses metabólitos atuam como agroquímicos naturais, tais como destruxinas (inseticidas), estrobilurinas (fungicidas), além de várias fitotoxinas (herbicidas). Como produto natural útil na agricultura pode-se citar a tetranactina (**13**) (Figura 4) um dos primeiros pesticidas úteis que, no início dos anos 70, foi isolado do fungo *Streptomyces aureus*. Esta substância apresenta significativa atividade inseticida contra a broca e ácaro carmim do feijão Azuki, inibe o crescimento de bactérias gram-positivas, além de ser ativa contra fungos fitopatogênicos.³⁴

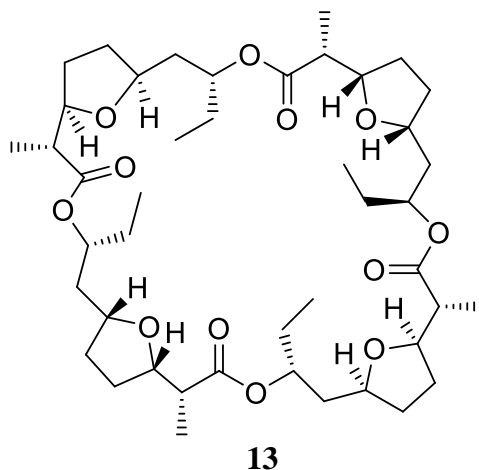


Figura 4 – Tetranactina, produto natural utilizado na agricultura.

2.3 Fungos endofíticos

Fisicamente, um fungo pode viver e interagir com seu hospedeiro, ocupando uma gama de locais. Micro-organismos que vivem externamente ao hospedeiro são denominados epifíticos, e os que vivem no seu interior recebem o nome de endofíticos. Os fungos endofíticos são aqueles que habitam com maior frequência o interior dos tecidos aéreos de seus hospedeiros, pelo menos durante uma fase do seu próprio ciclo de vida.³⁵ Referem-se a

um grupo diversificado de ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática nos tecidos vegetais.⁷

Eles podem desempenhar funções relevantes para a sanidade vegetal, protegendo as plantas contra pragas e patógenos, aumentando o crescimento, enraizamento, além de produzir compostos químicos como enzimas, alcaloides, hormônios e antibióticos. Estes compostos, por sua vez, podem apresentar considerável toxicidade, como é o caso de alcaloides produzidos por fungos endofíticos os quais são responsáveis pela proteção das plantas, especialmente gramíneas forrageiras, contra animais herbívoros.³⁶

Os fungos endofíticos além de contribuírem para a sua planta hospedeira, produzindo uma infinidade de substâncias que lhe fornece proteção, eles são capazes de produzir metabólitos e estes compostos, uma vez isolados e caracterizados, tem um grande potencial para uso na medicina moderna, agricultura e indústria.³⁷

Pelo fato de desempenharem variadas e estreitas relações ecológicas sem demonstrar sintomas visíveis, essa característica dificulta a avaliação desses organismos, havendo necessidade de isolamento e cultivo em laboratório.³⁵

De acordo com a estimativa de Strobel (2004),³⁷ existem na Terra cerca de 300 mil espécies de plantas, na qual cada uma hospeda no interior de seus tecidos um ou mais fungos endofíticos. Por outro lado, estima-se cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos no mundo, onde apenas 5% das espécies de fungos têm sido estudados cientificamente, e uma minoria delas tem sido estudada quimicamente.

Pesquisadores da Sandoz (uma empresa farmacêutica do Grupo Novartis), em um programa de triagem de produtos naturais oriundos de fungos, verificaram que, entre os fungos filamentosos, os endofíticos são o grupo mais produtivo quimicamente, apresentando uma produção de metabólitos secundários 73% maior que os outros fungos.³⁴

Eles representam uma fonte rica de produtos naturais novos e bioativos. Colonizam um habitat ecológico praticamente inexplorado e seus metabólitos secundários são particularmente ativos, possivelmente devido às interações metabólicas com seus hospedeiros.⁷

Tan e Zou (2001)³⁸ examinaram a diversidade dos metabólitos isolados de fungos endofíticos ressaltando seu potencial desempenho ecológico, e mostraram que seus metabólitos são sintetizados por várias vias metabólicas, ou seja, derivações de polipeptídeos, isoprenoides e aminoácidos. Eles relatam o isolamento de substâncias pertencentes a diversos grupos estruturais como esteroides, xantonas, fenois, isocumarinas, alcaloides, quinonas, furandionas, terpenoides, peptídeos, citocalasinas, lactonas, fenilpropanoides, ácidos fenólicos e compostos alifáticos.

Antibióticos, antimicóticos, imunossupressores, atividades hormonais, antitumorais, antivirais, citotóxicas, dentre outras, são apenas alguns exemplos do que foi encontrado após o isolamento e cultura de endófitos individuais seguidos por purificação e caracterização de alguns dos seus produtos naturais.³⁹ Porém, há perspectivas de encontrar novas substâncias que possam ser candidatos eficazes para o tratamento de doenças tanto em seres humanos, quanto em plantas e animais, além de também contar com novas outras aplicações dessas substâncias na indústria e na agricultura.³⁷

No estudo de Kongsaree e seus colaboradores (2003),⁴⁰ sobre compostos bioativos de micro-organismos, foi verificado que o extrato bruto de *Geotrichum* sp., um fungo endofítico isolado de *Crassocephalum crepidioides* (Asteraceae), foi ativo contra *Plasmodium falciparum*, o qual resultou no isolamento de três novas diidroisocumarinas (**14-16**) (Figura 5).

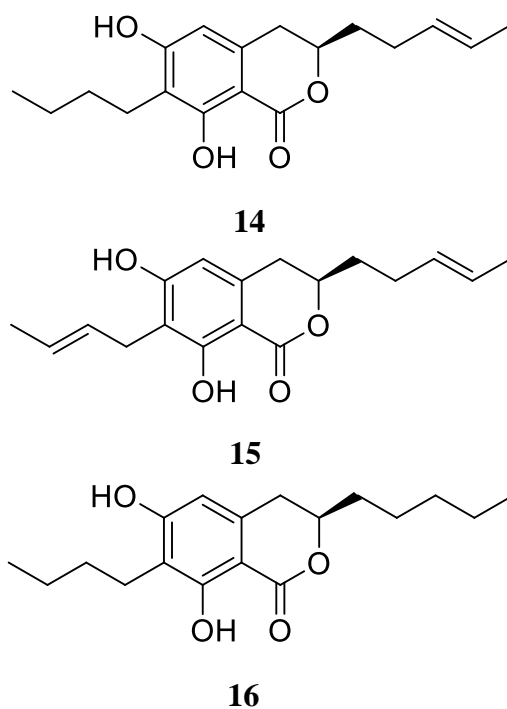


Figura 5 – Compostos bioativos isolados de fungo endofítico: 3-(R)-7-but-11-enil-6,8-dihidroxi-3-pent-11-enil-isocroman-1-ona (**14**); 7-(R)-but-15-enil-6,8-dihidroxi-3-pent-11-enil-isocroman-1-ona (**15**); 7-(R)-but-11-enil-6,8-dihidroxi-3-pentil-isocroman-1-ona (**16**).

Em um estudo realizado com o objetivo de encontrar novos produtos naturais contra células tumorais, o fungo endofítico *Rhinochadiella* sp. foi isolado da planta *Tripterygium wilfordii*, pertencente a família Celastraceae.⁴¹ O extrato desse fungo exibiu potente atividade contra as três linhagens de células tumorais humanas: A2780s (câncer de ovário), SW-620 (câncer de cólon) e HCT-116 (câncer de cólon). A partir do extrato desse fungo endofítico,

foram isoladas quatro substâncias, três novas citocalasinas (**17**), (**18**) e (**19**) e a citocalasina E (**20**) (Figura 6), previamente relatada.⁴² Ao serem testadas contra as três linhagens de células tumorais, a citocalasina E foi a que apresentou a maior atividade citotóxica (15-100 vezes) em relação as outras citocalasinas.⁴¹

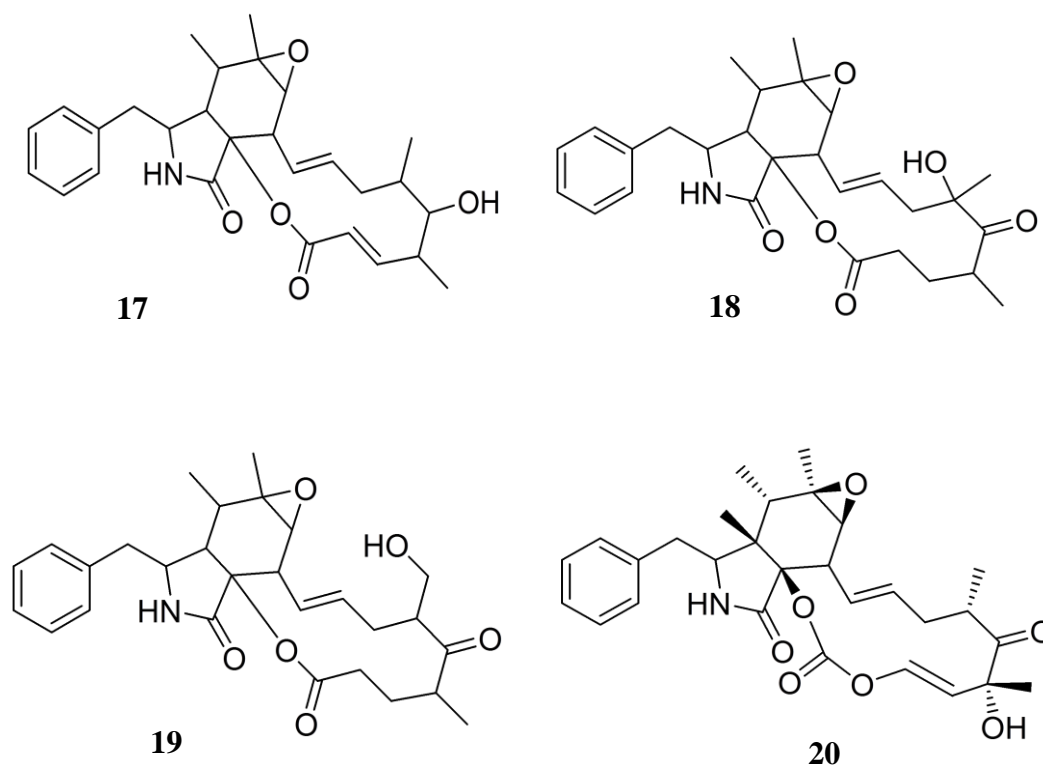


Figura 6 – Citocalasinas, substâncias anticâncer produzidas pelo endofítico *Rinocladiella* sp.

A triagem de fungos tem revelado que eles são fontes potenciais de agentes imunossupressores como, por exemplo, a ciclosporina A, FK506 e rapamicina. Porém estes agentes imunossupressores apresentam efeitos indesejáveis como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Neste contexto, os endofíticos têm sido alvos para a descoberta de novos imunossupressores.⁴³

A planta medicinal *Tripterygium wilfordii*, pertencente à família Celastraceae, está sendo extensivamente utilizada para tratamento de doença autoimune, assim como no tratamento de outras doenças como artrite, lúpus sistêmico eritematoso, dermatomicose, glomerulonefrites e doença inflamatória intestinal. Um total de 343 fungos foram obtidos desta planta, representando 60 morfotipos diferentes, entretanto, somente 15 isolados apresentaram atividade antiproliferativa.⁴³

Harper e colaboradores (2003)⁴⁴ isolaram duas substâncias bioativas, a pestacina (**21**) e a isopestacina (**22**) (Figura 7), obtidos através extrato do fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora*, isolado da planta *Terminalia morobensis*, que cresce na margem do Rio de Sepik na Papua-Nova Guiné. Ambas exibiram atividade antioxidante e antimicrobiana, porém a pestacina apresentou atividade antioxidante superior ao trolox, um derivado de vitamina E.

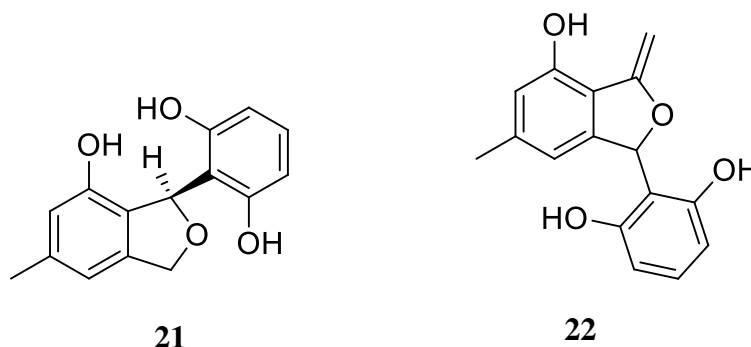


Figura 7 – Pestacina (**21**) e isopestacina (**22**), substâncias com atividades antioxidante e antimicrobiana, obtidas do fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora*.

O efeito benéfico da associação planta-endófito é muito maior que os prejudiciais e é devido a isso que estes micro-organismos vêm se tornando importante ferramenta para a agricultura moderna.³⁶

Contudo vale ressaltar que um dos maiores problemas no futuro dos endofíticos é a rápida diminuição das florestas, que representam a possível maior fonte para adquirir novos micro-organismos e seus produtos. Levando-se em consideração que muitas associações planta-microorganismo são específicas de hospedeiro, quando uma espécie vegetal desaparece, também irá desaparecer um conjunto inteiro de endofíticos associados a ela.³⁷

2.4 Metabólitos secundários obtidos da relação planta/endofítico

Os metabólitos secundários são úteis na defesa da própria espécie vegetal protegendo-a de outras plantas, de insetos, de herbívoros predadores e de micro-organismos causadores de infecções. Por muitos anos, o papel dos metabólitos secundários foi negligenciado pela ciência, julgando-os como desperdício, sem aparente função. Entretanto, sua importância aumentou devido ao potencial para aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos.⁴⁵

Muitos metabólitos secundários se notabilizaram como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos. No Brasil, as pesquisas de

descoberta de protótipos de fármacos ou fitofármacos, além de propiciarem um avanço da pesquisa básica multidisciplinar, podem contribuir também para o desenvolvimento tecnológico nacional, levando em conta que a diversidade molecular dos inúmeros biomas brasileiros é ainda muito pouco explorada como uma fonte de substâncias de interesse.⁴⁶

Uma das propriedades mais importantes dos micro-organismos, em especial dos fungos, está associada à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas.⁸

O número de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos é maior do que qualquer outra classe de micro-organismos endofíticos e este fato deve-se à alta frequência de isolamento desses micro-organismos de plantas.⁴⁷ Eles biossintetizam uma quantidade fantástica de metabólitos secundários, chegando, em casos especiais, a uma produção 73% superior a de outras classes de micro-organismos.⁴⁸

Vários endofíticos são capazes de produzir substâncias que matam insetos. O extrato do fungo endofítico *Muscodor vitigenus*, isolado da planta *Paullinia paullinoide* forneceu um novo diterpeno, o ácido nodulispórico (**23**) (Figura 8) que apresentou potente propriedade inseticida contra larvas de moscas.⁴⁹ O primeiro metabólito nodulispórico isolado foi do fungo endofítico *Nodulisporium* sp., da planta *Bontia daphnoides*. A partir dessa descoberta, iniciou-se uma busca intensiva para encontrar o fungo *Nodulisporium* sp. ou outros fungos que produziam análogos do ácido nodulispórico.⁵⁰

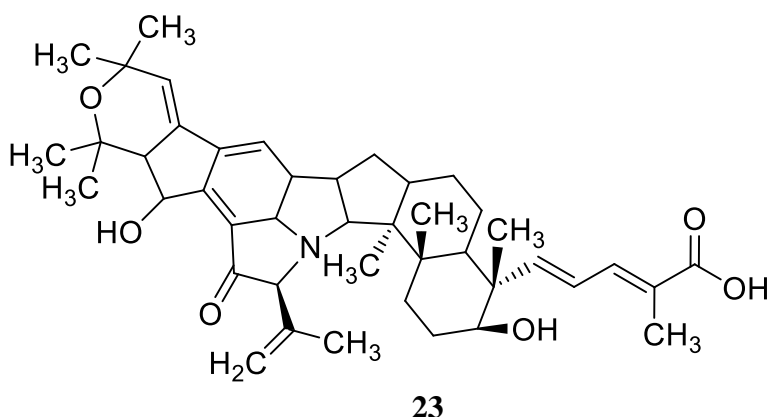


Figura 8 – Estrutura química do ácido nodulispórico obtido do fungo endofítico *Muscodor vitigenus*.

Diversos metabólitos bioativos podem ser sintetizados por muitos endófitos, os quais podem de forma direta ou indireta ser utilizados como agentes terapêuticos contra inúmeras doenças. Há descobertas de que os fungos endofíticos produzem os mesmos metabólitos

secundários ativos que a planta hospedeira, como o paclitaxel também conhecido como Taxol.⁵¹

O paclitaxel (**24**) produzido pelo fungo *Taxomyces andreanae*, (Figura 9), e alguns dos seus derivados representam o primeiro grande grupo de agentes anticâncer que é produzido por endófitos. Ele refere-se a um diterpenoide altamente funcionalizado, encontrado em cada planta de *Taxus baccata* conhecida pelo nome comum de teixo. O modo de ação do paclitaxel é de excluir moléculas de tubulina de despolimerização durante os processos de divisão celular. Este composto é o primeiro fármaco anticancerígeno bilionário do mundo, o qual é usado para tratar um número de outras doenças proliferativas de tecidos humanos.⁵²

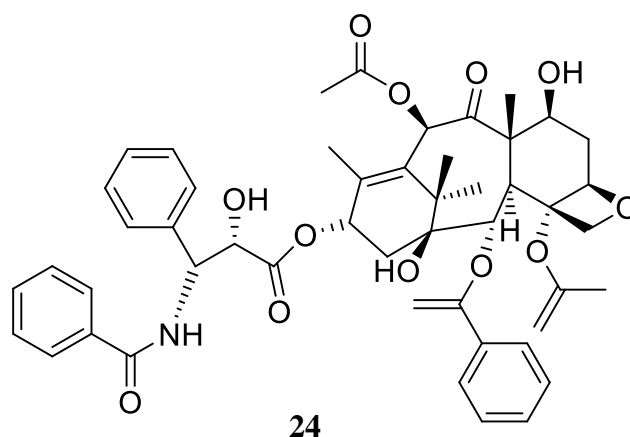


Figura 9 – Paclitaxel, metabólito secundário, produzido por fungo endofítico.

Assim, o isolamento e a determinação estrutural de substâncias orgânicas produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos representam importância fundamental para o desenvolvimento científico da própria química de produtos naturais e contribuem para o avanço de outras atividades científicas e tecnológicas.³¹

2.5 Família Asteraceae

Asteraceae, nosso objeto de estudo, retrata a maior família de Angiospermas, compreendendo 25.000 espécies pertencentes a 1.600 gêneros dispostos em 17 tribos e três subfamílias. No Brasil, está representada por aproximadamente 196 gêneros e cerca de 1.900 espécies.⁵³

Mais frequentemente chamada de “a família do girassol” ou “a família da margarida”, as plantas dessa família têm grande importância econômica, incluindo alimentos, plantas ornamentais, ervas medicinais e plantas com propriedades inseticidas.⁵⁴

Esta família possui ampla distribuição, sendo bem representada nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Todas as tribos estão representadas no Brasil, principalmente por espécies nativas e por algumas introduzidas.¹²

Plantas dessa família são extensivamente estudadas quanto a sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, como a artemisinina (**25**) (Figura 10), uma lactona sesquiterpênica isolada da planta medicinal *Artemisia annua*, ativa em casos de malária.^{10,55}

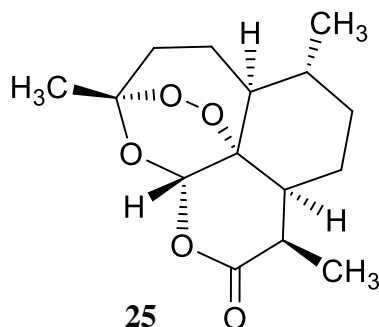


Figura 10 – Estrutura química da artemisinina, isolada da planta *Artemisia annua*.

Verdi (2005)¹⁰ ainda relata que dentre inúmeras plantas da família Asteraceae utilizadas na medicina caseira está a *Artemisia absinthium*, uma erva de sabor amargo conhecida popularmente como losna, com benéficas funções digestivas, usada também na fabricação da bebida absinto.

Inúmeros trabalhos científicos realizados com espécies da família Asteraceae apresentaram o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários com destaque às lactonas sesquiterpênicas, importantes marcadores quimiotaxonômicos.¹⁰

Entretanto, essas plantas são pouco estudadas quanto aos produtos naturais de seus micro-organismos endofíticos associados.

Na região de Ouro Preto-MG, o Parque Estadual do Itacolomi, uma área de elevada altitude (acima de 1200 m), referente a uma região de transição entre os domínios do Cerrado e da Mata Atlântica, apresenta uma grande diversidade de fisionomias vegetais, de florestas estacionais semidecíduais a campos rupestres. No Parque Estadual do Itacolomi, esta família encontra-se representada por 224 táxons, o que faz desta área a maior do Brasil em número de espécies de Asteraceae.¹³

Além disso, um levantamento florístico realizado em campo rupestre no Campus da UFOP, Morro do Cruzeiro, resultou na identificação de 137 espécies distribuídas em 36 famílias, sendo a mais rica a Asteraceae, com 32 espécies.¹⁴

2.6 *Eremanthus erythropappus*

O gênero *Eremanthus* pertence à tribo Vernonieae, compreende 27 espécies de árvores e arbustos distribuídos nos domínios dos Cerrados brasileiros, principalmente em Minas Gerais, Goiás e Bahia.¹⁵ Esse gênero é normalmente encontrado em ambientes de relevo acidentado, em solos rasos e ácidos.⁵⁷

Espécies de *Eremanthus* destacam-se entre os diferentes representantes da família Asteraceae por apresentarem maior número de indivíduos distribuídos entre três espécies distintas: *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish, *Eremanthus incanus* (Less.) Less. e *Eremanthus glomerulatus* Less., sendo *E. erythropappus* e *E. incanus* de maior importância econômica e de maior ocorrência em Minas Gerais.⁵⁸

Conhecida como candeia, *E. erythropappus* (Figura 11), é uma espécie arbórea nativa do Brasil e com grande ocorrência no estado de Minas Gerais, que cresce em solos rasos, pouco férteis e rochosos, geralmente em altitudes que variam de 1000 a 1700 m.⁵⁹



Figura 11 – Foto de *Eremanthus erythropappus*.

Ela fornece multiprodutos, como mourão de cerca de alta durabilidade natural e matéria-prima da qual se extrai um óleo essencial, cujo principal componente é o alfa-bisabolol. Esse componente com propriedades farmacológicas possui importante ação medicinal e grande aplicação na indústria de cosméticos e medicamentos.⁶⁰

E. erythropappus é uma espécie arbórea indicada para a recuperação de áreas degradadas, pelo fato de que sua ocorrência se dá naturalmente em solos pobres, arenosos e pedregosos.⁶¹

Para o isolamento de fungos endofíticos é de fundamental importância a escolha da planta, e esta deve ser baseada em histórico etnobotânico, endemismo, longevidade e áreas de maior biodiversidade.⁶² A espécie *E. erythropappus* foi escolhida para este estudo levando-se em consideração seu histórico etnobotânico e endemismo, além da escassez de trabalhos sobre seus fungos endofíticos associados.

2.7 Óleo essencial

Óleos essenciais (OE) são compostos de substâncias lipofílicas, que contenham componentes de aroma voláteis do material vegetal. Representam uma pequena fração da composição da planta, sendo composta principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos, e os seus oxigenados derivados, tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, éteres e ésteres.⁶³

Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, e, estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos. São originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides. Cientificamente, tem sido estabelecido que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas.¹¹

Possui grande aplicação na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas e comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol.⁶⁴

Mesmo todas as partes da planta podendo conter óleo essencial, como flores, folhas, cascas, rizomas e frutos, a sua composição pode variar de acordo com a parte da planta empregue como matéria-prima. Outros fatores, como o cultivo, o solo, as condições climáticas e época de colheita também podem determinar a composição e qualidade do óleo essencial.⁶³

A produção de OE tem o Brasil como lugar de destaque, ao lado da Índia, China e Indonésia, ponderado os quatro grandes produtores mundiais. A posição do Brasil deve-se aos OE de cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos. No passado, o país teve destaque como exportador de OE de pau-rosa, sassafrás e menta. Nos dois últimos casos, passou à condição de importador.⁶⁴

Hoje em dia, os óleos essenciais também são populares, devido à aromaterapia, que é um ramo da medicina alternativa que afirma que óleos essenciais e outros compostos aromáticos têm efeitos curativos. Além disso, nas últimas décadas, estudos científicos relacionaram propriedades biológicas (antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antibacterianos, estimuladores do sistema nervoso central, etc.) de várias plantas e ervas com alguns compostos presentes nos óleos essenciais. Por exemplo, ácido valerênico, um sesquiterpeno, e seus derivados (ácido acetoxivalerênico, ácido hidroxivalerênico, valeranona, valeranal) de extrato da planta valeriana são reconhecidos como relaxante e sedativo; extrato de lavanda é usado como antisséptico e anti-inflamatório para a pele ou pomadas para tratar a congestão nasal; timol, o principal componente do óleo essencial de tomilho é conhecido pela sua atividade antimicrobiana; limoneno e eucaliptol estão especificamente envolvidos na proteção do tecido pulmonar. Por conseguinte, os óleos essenciais tornaram-se um alvo para a recuperação de substâncias naturais bioativas.⁶³

2.7.1 Óleo essencial de *Eremanthus erythropappus*

Eremanthus erythropappus, comumente conhecido como candeia, é utilizado na medicina popular como um agente antiflogístico e antimicrobiano. De acordo com Sousa e colaboradores (2008),⁶⁵ o óleo essencial obtido a partir da madeira de *E. erythropappus* contém α -bisabolol, costunolídeo e eremantina. O α -bisabolol, presente em outros membros da família Asteraceae como *Chamomilla recutita*, exibe propriedades anti-inflamatórias e tem sido amplamente utilizado em produtos farmacêuticos e cosméticos.

Nos últimos 20 anos, devido ao alto teor anti-inflamatório do sesquiterpeno α -bisabolol, o óleo essencial alcançou um elevado valor econômico. Atualmente o OE é a principal fonte comercial de α -bisabolol, que é encontrado em diversos produtos em todo o mundo.⁶⁶

Porém na literatura há poucos estudos que tratam dos componentes provenientes do óleo essencial das folhas da candeia, dando mais ênfase ao composto α -bisabolol obtido da madeira da mesma.

No estudo de Sousa e colaboradores (2008)⁶⁵ com óleo essencial a partir de folhas de *E. erythropappus* foi visto que seu óleo essencial consistiu de monoterpenos (39,12%) e sesquiterpenos (60,20%) e que os compostos obtidos a partir da madeira do caule da candeia não são os mesmos das folhas. Contudo, o óleo essencial a partir das folhas é um candidato potencial para utilização como um agente analgésico e anti-inflamatório em novos compostos para a terapia de dores e doenças inflamatórias.

2.8 Atividades biológicas

2.8.1 Atividade antimicrobiana

Infecções humanas constituem um sério problema e micro-organismos tais como fungos e bactérias são os mais frequentes patógenos descritos como agentes etiológicos de doenças infecciosas.

Alguns agentes utilizados na terapêutica apresentam toxicidade, baixa solubilidade, baixa eficácia, e outras.⁶⁷⁻⁶⁹ Existe a questão da resistência microbiana, que está aumentando e a perspectiva para o uso de substâncias antimicrobianas no futuro ainda é incerta. Desta maneira, é grande o interesse na pesquisa por substâncias antimicrobianas.⁶⁷

Além disso, o interesse pela descoberta de extratos vegetais com diferentes atividades biológicas tem crescido muito nos últimos anos. Plantas que apresentam atividade antimicrobiana são de extrema importância devido ao fato de muitos micro-organismos apresentarem resistência, não somente aos antibióticos já pré-estabelecidos, como também aos de última geração, causando sérios problemas de saúde pública.⁷⁰

Os antimicrobianos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que, em pequenas concentrações, devem possuir atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, nas quais podem: prevenir o desenvolvimento de micro-organismos resistentes, ocasionar ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro, proporcionar estabilidade química, entre outras.²⁸

Atualmente muitos trabalhos vêm sendo realizados em busca de novas plantas com atividade antimicrobiana. Machado e colaboradores (2003)⁷¹ avaliaram 14 extratos de plantas medicinais brasileiras, utilizadas no tratamento de doenças infecciosas, quanto ao seu potencial antimicrobiano frente a micro-organismos resistentes de importância médica. O extrato de *Punica granatum* L. (romã) mostrou-se eficiente contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilina. O óleo essencial de *Artemisia annua* L. foi avaliado quanto a sua atividade antimicrobiana e inibiu o crescimento de uma bactéria Gram positiva *Enterococcus hirae* e dos fungos testados. O óleo essencial das folhas de *Syzygium cuminii* e *Syzygium travancoricum* Gamble foram testados para avaliar suas propriedades antibacterianas. A atividade do óleo essencial de *S. cuminii* foi considerada boa, enquanto do *S. travancoricum* foi moderada.

Desta maneira, a atividade antimicrobiana é um item relevante na caracterização de extratos vegetais, dada à importância e o número bastante grande de doenças infecciosas que acometem o homem.²⁸

2.8.2 Atividade antiproliferativa (citotóxica)

Outro problema de saúde pública é o câncer. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer, mortes decorrentes de câncer constituem 2–3% registradas anualmente em todo o mundo, representando aproximadamente 3.500 milhões de pessoas.⁷²

A importância da identificação de novos princípios ativos que inibem a proliferação celular torna-se evidente diante desta constatação. Investigações científicas multidisciplinares têm sido conduzidas com muitos esforços para combater os diversos tipos de tumores, mas a cura perfeita ainda não foi conseguida dentro do mundo da medicina moderna.⁷³

Durante o período de 1960 a 1986, no programa de avaliação de substâncias antitumorais de origem vegetal do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos foram investigados 108.330 extratos obtidos de 35.000 espécies vegetais: 4.149 (3,83%), correspondentes a 1410 gêneros envolvendo 2935 espécies, revelaram atividade biológica. Das 2.000 substâncias cristalinas isoladas e testadas, 95 (4,75%) foram selecionadas para investigações especiais e 11 aprovadas para testes contra diversos tumores. Entre tais substâncias foram indicadas a brucetina (**26**), a maitansina (**27**), o colubrinol (**28**), a indicina-N-óxido (**29**), o tripdiolído (**30**), e a homo-harringtonina (**31**) (Figura 12) além da bouvardina (um peptídeo cíclico de fórmula molecular $C_{40}H_{48}N_6O_{10}$).³¹

Os alcaloides vincristina (**32**) e vimblastina (**33**), (Figura 13), isolados da espécie *Catharanthus roseus*, destacam-se como dois dos mais importantes agentes quimioterapêuticos de uso clínico corrente contra o câncer.³¹

Atualmente, a atividade antiproliferativa de extratos brutos e substâncias isoladas de espécies de Asteraceae vêm sendo estudada, e os resultados são promissores.⁷⁴⁻⁷⁵

Neste contexto, com esta pesquisa, pretende-se contribuir para o conhecimento sobre o isolamento, cultivo, identificação de metabólitos secundários e bios prospecção de atividades antimicrobiana e citotóxica (antiproliferativa) de fungos endofíticos associados à planta *E. erythropappus*, coletada em Ouro Preto-MG.

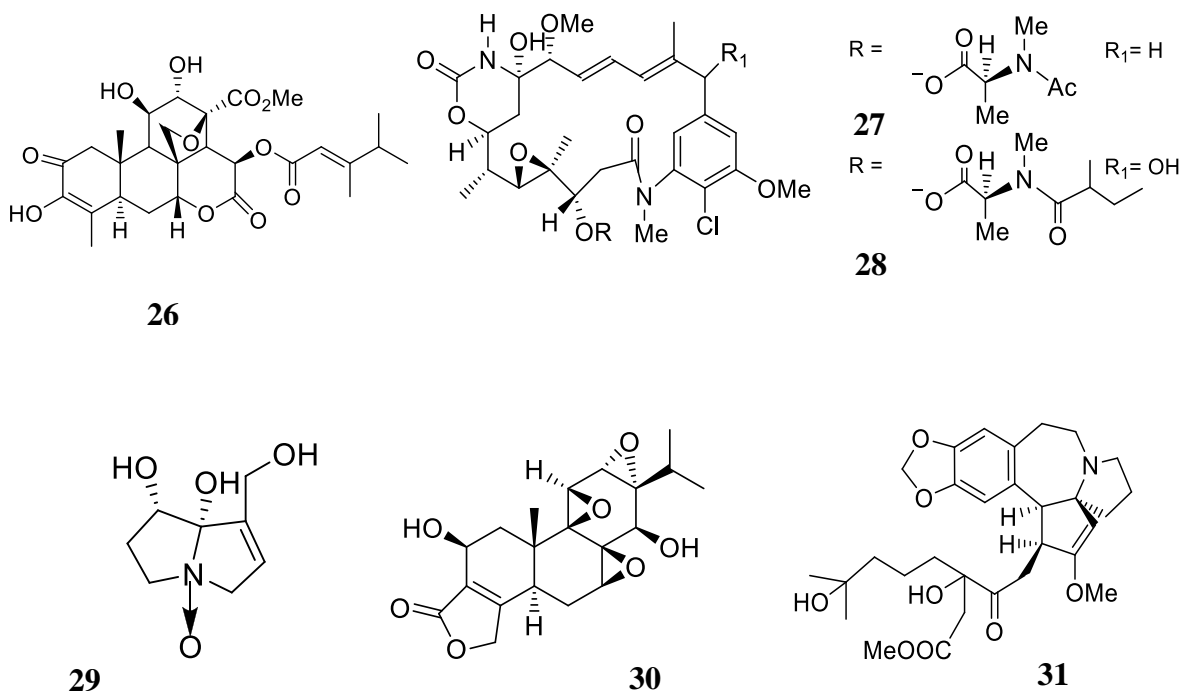


Figura 12 – Substâncias testes aprovadas, usadas contra diversos tumores.

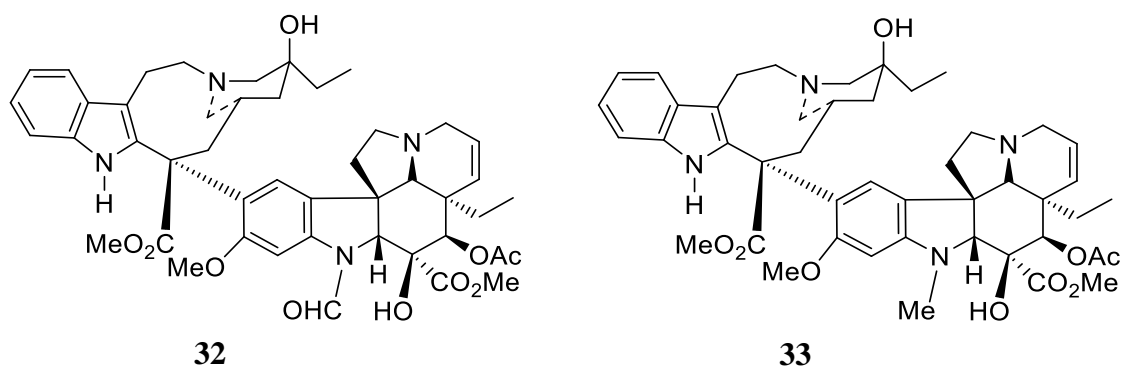


Figura 13 – Dois agentes quimioterapêuticos isolados da planta *Catharanthus roseus*.

2.8.3 Atividade alelopática

O termo alelopatia foi criado pelo pesquisador austríaco Hans Molisch (1937) pela união das palavras gregas *allelon* = de um para outro, *pathós* = sofrer, segundo ele, o conceito descreve a influência de um indivíduo sobre o outro, seja prejudicando ou favorecendo o segundo, e sugere que o efeito é realizado por biomoléculas (denominadas aleloquímicos) produzidas por uma planta e lançadas no ambiente.⁷⁶

Rice (1984)⁷⁷ definiu alelopatia como qualquer efeito direto ou indireto, danoso ou benéfico que uma planta (incluindo micro-organismos) exerce sobre outra pela produção de compostos químicos liberados no ambiente.

Para Souza-Filho (2009)⁷⁸ a alelopatia refere-se ao efeito direto e/ou indireto de determinada planta sobre outras em sua vizinhança, via produção e liberação de substâncias químicas para o ambiente, a qual é considerada um fenômeno de larga ocorrência em comunidades de plantas tanto nativas como cultivadas.

A definição de alelopatia aceita atualmente pela Sociedade Internacional de Alelopatia (IAS, 1996) é qualquer processo envolvendo metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias ou fungos que influenciam o crescimento e o desenvolvimento de sistemas biológicos.⁷⁹

Nesse contexto, a identificação de atividade alelopática em espécies de plantas, cultivadas ou nativas, assume papel relevante na interpretação do papel ecológico que elas desempenham em suas comunidades, sobretudo em relação ao seu potencial para controlar espécies de plantas daninhas, considerado um dos principais problemas limitantes ao desenvolvimento da atividade agrícola nas regiões tropicais.⁷⁸

Os aleloquímicos foram instituídos a desempenhar um papel importante na regulação da diversidade vegetal e na agricultura sustentável.⁸⁰ Eles são liberados no meio ambiente por volatilização, exsudação, lixiviação e/ou pela decomposição dos resíduos vegetais (Figura 14) As substâncias alelopáticas podem fornecer uma vantagem competitiva para as plantas hospedeiras através da inibição do crescimento de plantas concorrentes.⁸¹

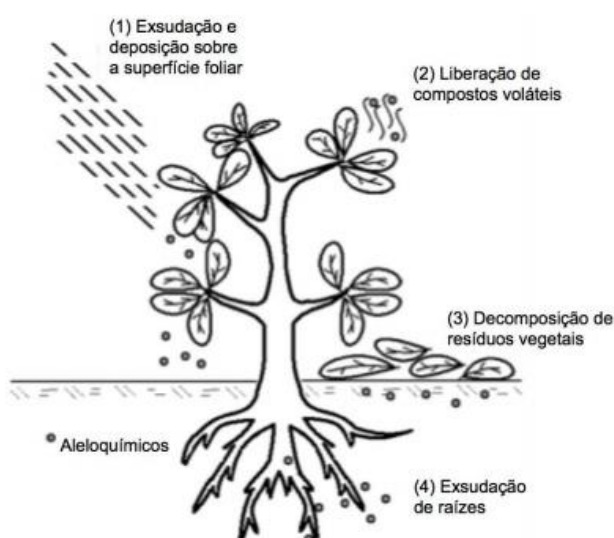


Figura 14 – Possíveis vias de liberação dos aleloquímicos das plantas no ambiente. Fonte: Adaptado de Albuquerque e colaboradores (2010).⁸²

A resistência ou tolerância aos metabólitos secundários que funcionam como aleloquímicos é mais ou menos específica, existindo espécies mais sensíveis que outras, como por exemplo *Lactuca sativa* (alface) e *Lycopersicon esculentum* (tomate), por isso mesmo muito usadas em biotestes de laboratório.⁷⁶

A atividade dos aleloquímicos tem sido usada como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas (defensivos agrícolas). A maioria destas substâncias provém do metabolismo secundário, porque na evolução das plantas representaram alguma vantagem contra a ação de micro-organismos, vírus, insetos, e outros patógenos ou predadores, seja inibindo a ação destes.⁷⁶

Os recentes avanços na química de produtos naturais, por meio de métodos modernos de extração, isolamento, purificação e identificação, têm contribuído para um conhecimento mais apurado.⁷⁶

Em passando recente, investigações sobre a importância dos óleos essenciais na atividade biológica das plantas mereceram especial atenção por parte dos pesquisadores da área de ecologia química. Em muitos trabalhos, foram relatados efeitos inibitórios potentes tanto da germinação de sementes como do desenvolvimento de diferentes espécies de plantas.⁷⁸

Scrivanti e colaboradores (2003)⁸³ investigaram o potencial alelopático do óleo essencial da espécie *Schinus molle*, e encontrou forte atividade inibidora no crescimento da raiz de mudas de *Zea mays* (milho). Em um bioensaio de laboratório, Batish e colaboradores (2004)⁸⁴ relataram que o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* inibiu a germinação do *Triticum aestivum* (trigo), *Zea mays*, *Raphanus sativus* (rabanete), *Cassia occidentalis* (café-negro), *Amaranthus viridis* (caruru) e *Echinochloa crus-galli* (capim-arroz).

Devido a todos estes relatos fez-se uso do óleo essencial das folhas da candeia (*E. erythropappus*) para avaliação de atividade alelopática.

2.8.3.1 Plantas daninhas

O estudo dos mecanismos pelos quais as espécies invasivas influenciam as comunidades naturais é importante na investigação científica, uma vez que, estas plantas são capazes de competição bem sucedida com espécies locais e de invasão em comunidades naturais. Isto representa uma ameaça real para a diversidade biológica e integridade da flora nativa, além de agravar os problemas ambientais da região.⁸⁵

As plantas daninhas que convivem com as culturas agrícolas podem competir diretamente por recursos limitados do meio, como água, luz, nutrientes e espaço. Além disso,

essas plantas podem utilizar-se de outros processos biológicos, como a alelopatia para influenciar negativamente nas culturas.⁸⁶

Entretanto é importante lembrar que os efeitos negativos causados pela presença das plantas daninhas não devem ser atribuídos exclusivamente à competição, mas sim a uma resultante total de pressões ambientais, que podem ser diretas (competição, alelopatia, interferência na colheita e outras) e indiretas (hospedar insetos, doenças e outras).⁸⁷

O termo alelopatia aplica-se quando uma planta daninha libera substâncias químicas no meio, prejudicando o desenvolvimento de outro, podendo ocorrer inclusive entre indivíduos da mesma espécie. Como exemplo, tem-se o capim-arroz (*Echinochloa crusgalli*), o capim-colchão (*Digitaria horizontalis*) e o capim-rabo-de-raposa (*Setaria faberil*) que se referem às plantas daninhas com capacidade alelopática que reduzem o desenvolvimento do milho.⁸⁷

O grau de interferência das plantas daninhas nas culturas depende da comunidade vegetal infestante (espécie, densidade e distribuição), da cultura (cultivo, espaçamento e densidade), do ambiente (solo, clima e manejo) e do período de convivência.⁸⁸

Os efeitos microclimáticos, as interações de natureza química (alelopáticas) entre as plantas daninhas e a cultura e o uso contínuo de determinados insumos – como adubos, corretivos e herbicidas – são os principais responsáveis pela composição da flora infestante.⁸⁸

A presente pesquisa trabalhou diretamente com três plantas daninhas para verificar a atividade alelopática do óleo essencial de *E. erythropappus*: *Brassica rapa* L. (mostarda), *Bidens pilosa* L. (picão-preto) e *Solanum palinacanthum* Dun (juá), além de contar com duas plantas-testes: *Lactuca sativa* (alface) e *Solanum lycopersicum* (tomate).

Abaixo, é apresentado um breve histórico sobre as plantas daninhas citadas acima, de acordo com Harri Lorenzi (1991/2000).⁸⁹⁻⁹⁰

1) *Brassica rapa* L.

É uma planta pertencente à família Brassicaceae, tem ocorrência anual, é herbácea, mede de 30-140 cm de altura, sua reprodução é por sementes, tendo origem na Europa.

Quanto a sua importância é uma planta daninha invernal muito frequente em cultivos de cereais de inverno. Ocorre também em beira de estradas e terrenos baldios, geralmente formando grandes infestações, facilmente notadas pela coloração amarela muito vistosa de suas flores (Figura 15). Em referência as suas propriedades medicinais, o decocto de sua raiz principal é fortificante e indicado para combater afecções da bexiga e tuberculose. As sementes são indicadas para sinapismo.



Figura 15 – Foto da planta *Brassica rapa* L.

2) *Bidens pilosa* L.

Pertence à família Asteraceae, tem ocorrência anual, é herbácea, tem de 40-120 cm de altura, sua reprodução é por sementes (Figura 16). É originária da América Tropical, entretanto hoje é considerada “planta daninha” em aproximadamente 40 países.

É uma das mais sérias infestações de lavouras anuais e perenes do centro-sul do país. Uma única planta chega a produzir 3000-6000 sementes, a maioria das quais germina prontamente após a maturação, o que garante 3-4 gerações por ano. Sementes enterradas profundamente no solo após 3 a 5 anos ainda apresentam 80% de germinação. É hospedeira de nematoides do gênero *Meloidogyne*.

Suas propriedades medicinais são: estimulante, antiescorbútica, antileucorreica, desobstruente do fígado, odontológica (raízes), sialagoga, vermífuga, antidisentérica e vulneraria.



Figura 16 – Foto da planta *Bidens pilosa* L.

3) *Solanum palinacanthum* Dun

Planta da família Solanaceae, também é anual e herbácea, com 50-80 cm de altura, é nativa do Brasil e propaga-se exclusivamente por sementes.

É uma planta daninha bastante frequente, infestando pastagens, cafezais, beira de estradas e terrenos baldios. Apresenta nítida preferência por locais de solos arenosos e bem ensolarados, sendo particularmente frequente em pastagens das regiões Sudeste e Centro-Oeste. Seus frutos são tóxicos aos animais bovinos, porém geralmente não são ingeridos (Figura 17).



Figura 17 – Foto da planta *Solanum palinacanthum* Dun

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Isolar, identificar e avaliar as atividades citotóxica e antimicrobiana de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados às folhas de *Eremanthus erythropappus*, além de caracterizar quimicamente o óleo essencial obtido de suas folhas, bem como avaliar sua propriedade alelopática.

3.2 Objetivos específicos:

- Isolar e identificar fungos endofíticos associados à planta *E. erythropappus*;
- Obter extratos brutos dos fungos endofíticos em pequena escala;
- Verificar as propriedades citotóxicas e antimicrobianas dos extratos brutos obtidos;
- Obter em escala ampliada a cultura dos fungos endofíticos cujos extratos brutos apresentaram atividade citotóxica e antimicrobiana, para adquirir maior quantidade de material para isolamento e identificação de metabólitos secundários;
- Isolar os metabólitos secundários dos extratos brutos ativos e realizar sua identificação estrutural;
- Avaliar as atividades citotóxica e antimicrobiana dos metabólitos secundários isolados;
- Obter e caracterizar quimicamente o óleo essencial de folhas da espécie *E. erythropappus*;
- Avaliar a propriedade alelopática deste óleo essencial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da coleta

Folhas da planta *E. erythropappus*, família Asteraceae, foram coletadas, em época de floração, no campo rupestre, na Canga do Degeo (Departamento de Geologia) do Campus da UFOP, Morro do Cruzeiro, em Ouro Preto-MG, em 24/09/14. Uma exsicata da planta está depositada no Herbário José Badini, na Universidade Federal de Ouro Preto, com o número OUPR 28379.

4.2 Isolamento e preservação dos fungos endofíticos

Cinco folhas de cinco espécimes da planta *E. erythropappus* (candeia), foram coletadas. O material coletado (folhas) foi selecionado e inspecionado quanto aos aspectos saudáveis da planta. Após a coleta, as amostras foram conservadas individualmente em sacos plásticos estéreis, previamente identificados e transportados para o Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais, sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a Andréa M. do Nascimento.

O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 horas, após a coleta. O material foi lavado com solução detergente por 3 minutos para retirar o excesso de epifíticos. Em seguida, em ambiente asséptico, ou seja, na cabine de segurança biológica, as folhas de cada indivíduo foram desinfetadas fazendo-se uso da metodologia descrita por Rodrigues (2010),⁹¹ como se segue: cada folha foi desinfetada com álcool 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio 2,5% por 3 minutos e água destilada estéril por 30 segundos. Como controle de efetividade do processo de desinfecção, alíquotas da água da última lavagem foram esgotadas no meio Batata, Dextrose e Ágar (BDA) para checar se o procedimento de assepsia foi efetivo.

Após a assepsia, pequenos fragmentos medindo aproximadamente 5 mm (milímetros) foram plaqueados (três fragmentos de folhas, de cada espécime por placa) em meio BDA, suplementado com antibiótico (cloranfenicol) a 100 mg/L (miligramas por litro), para evitar contaminação bacteriana, e incubados a 28°C.

O crescimento fúngico foi observado todos os dias. Após o aparecimento das hifas dos fungos endofíticos nas extremidades dos fragmentos das folhas, foram realizados repiques de todos os isolados para novas placas contendo meio BDA, agora sem cloranfenicol, totalizando 11 isolados fúngicos. Após separação, as culturas foram incubadas a 28°C para crescimento.

Para preservação dos fungos endofíticos obtidos, discos de meio de cultura de 5 mm de diâmetro de todos os isolados foram mantidos submersos em 10 mL de água destilada estéril em frascos lacrados, à temperatura ambiente e em duplicata seguindo o método de Castellani.⁹²

As etapas para o isolamento e preservação dos fungos endofíticos estão descritas na Figura 18.

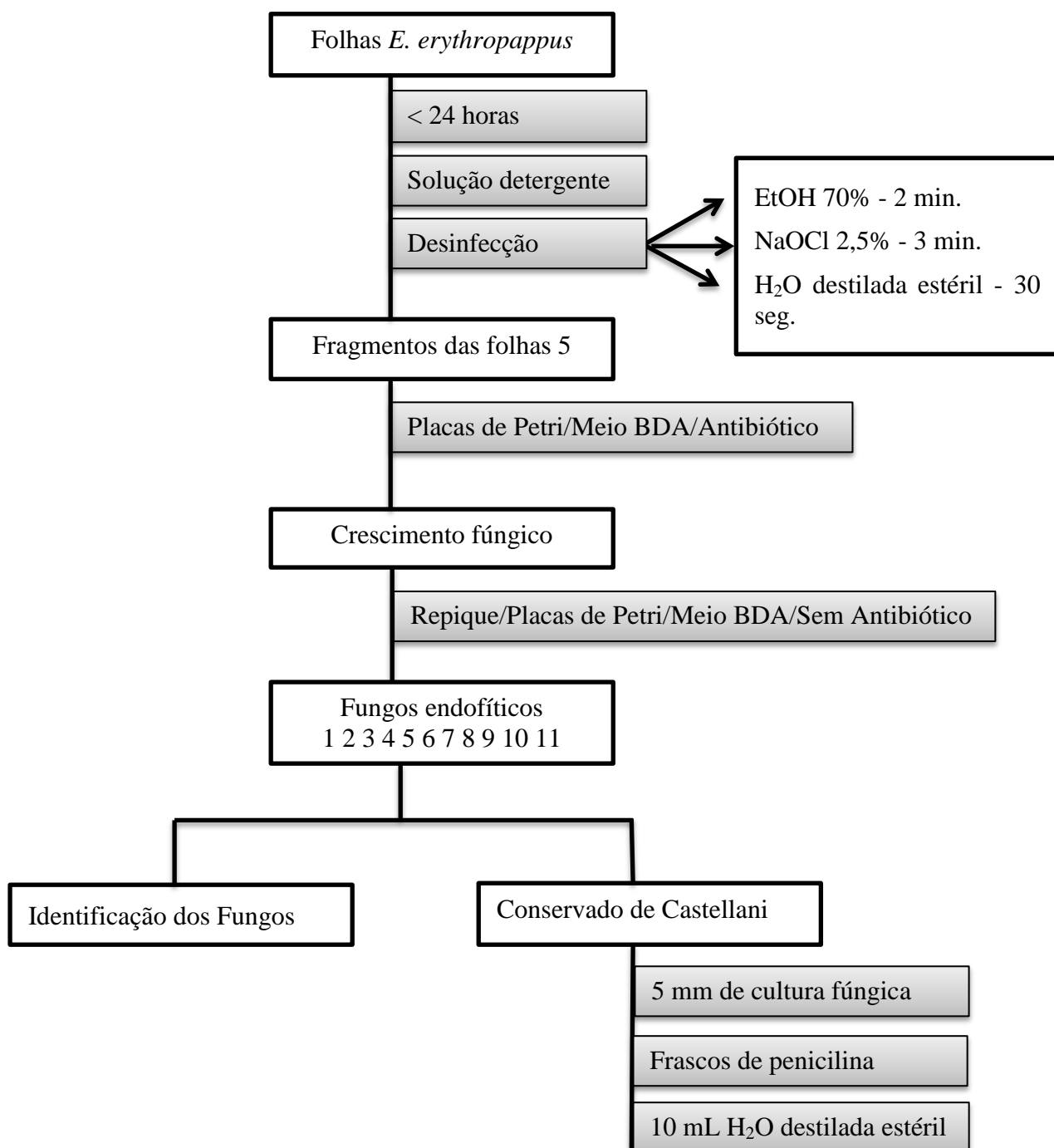


Figura 18 – Fluxograma do isolamento, identificação e preservação dos fungos endofíticos.

4.3 Identificação dos fungos endofíticos

Os fungos endofíticos foram identificados, por métodos moleculares (sequência de DNA), no Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob a supervisão do Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa.

A técnica usada foi a amplificação da região ITS do rDNA (ácido desoxirribonucléico ribossômico) por PCR (reação em cadeia da polimerase). A região ITS está localizada entre os genes 18S e 28S do rDNA e pode ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos.⁹³ O ITS é dividido em ITS1, localizado entre os genes 18S e o 5.8S, e o ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S.⁹³⁻⁹⁴

O DNA (ácido desoxirribonucleico) dos fungos endofíticos foi extraído de acordo com o protocolo estabelecido por Rosa e colaboradores (2009),⁹⁵ A região genômica ITS1–5.8S–ITS2 foi amplificada do DNA genômico usando os iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').⁹⁶ As amplificações do PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo tampão de PCR 1X (Fermentas), 0,2 mmol/L da mistura de dNTP, 0,2 µmol/L de cada iniciador (ITS1 e ITS4), 1,5 mmol/L de MgSO₄, e 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Califórnia). O programa consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, 30 segundos de anelamento a 50°C, 90 minutos de extensão a 72°C, e uma extensão final de 7 min a 72°C. As reações de PCR foram realizadas em utilizando o termociclador M&J PTC-225. Após amplificação, uma alíquota foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão Tris–acetato–EDTA. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta (UV), e os produtos foram comparados com marcador de peso molecular 1 kb DNA *ladder* (Invitrogen). Os produtos de PCR amplificados foram extraídos usando um kit MinElute Purification de PCR (Invitrogen) e foram sequenciados em um sequenciador de DNA automatizado (modelo ABI 3730XL; Applied Biosystems, Foster City, Califórnia). As sequências de DNA foram analisadas por meio de comparação com informações contidas no banco de dados do GenBank. Os seguintes critérios foram usados para interpretar as sequências do banco de dados do GenBank: identidades de sequência > 98%, o gênero e a espécie foram aceitos; identidades de sequência entre 95% e 97%, apenas o gênero foi aceito; identidades de sequência < 95%, os isolados foram rotulados como espécie desconhecida e identificados com base em família, classe ou ordem do sistema hierárquico.⁹⁷ No entanto, os táxons que exibiram identidades < 97% ou nível taxonômico inconclusivo foram submetidos à inferências filogenéticas, que foram estimadas usando o programa MEGA versão 5.0.⁹⁸ Um modelo baseado na máxima verossimilhança foi utilizado para estimar a

distância evolutiva considerando-se valores calculados a partir de 1000 repetições. Algumas sequências de referência das espécies depositadas no GenBank foram adicionadas para precisão de análise filogenética. Informações sobre os níveis hierárquicos taxonômicos dos fungos segue o bancos de dados MycoBank (www.mycobank.org) e índice Fungorum (www.indexfungorum.org).

4.4 Condições de cultura dos fungos e preparação dos extratos brutos

4.4.1 Cultura sólida para preparação dos extratos brutos em pequena escala

As culturas dos fungos endofíticos foram repicadas em Placas de Petri contendo meio BDA. Após o período necessário de 7 dias para o desenvolvimento dos micro-organismos, dois fragmentos do ágar contendo micélio de cada um dos 11 fungos, foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 500 mL previamente autoclavados durante 40 minutos, contendo 90 g (gramas) de arroz parboilizado e 90 mL de água destilada, e em seguida, incubados durante 21 dias a 28°C, em uma estufa de determinação de Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO). Após esse período foram adicionados 150 mL de etanol 95% em cada frasco de Erlenmeyer e sequencialmente submetidos a maceração por 2 dias. E para obtenção do extrato bruto, foi realizada a filtração de cada um dos 11 fungos e em seguida o material foi colocado em frasco de vidro e pesado.

Experimentos controle, sem adição do fungo, o “Branco”, foi realizado para se obter extrato do meio de cultura apenas, para posterior comparação com os extratos oriundos dos meios que foram inoculados.

As etapas do cultivo em pequena escala estão demonstradas através da Figura 19, na página 32.

Em seguida, cada extrato etanólico bruto foi submetido a uma triagem química (item 4.5, página 33), assim como 25 mg (miligramas) de cada extrato foi submetido para avaliação da atividade citotóxica e antimicrobiana, conforme metodologia descrita nos itens 4.6.1, página 34 e 4.6.2, página 35.

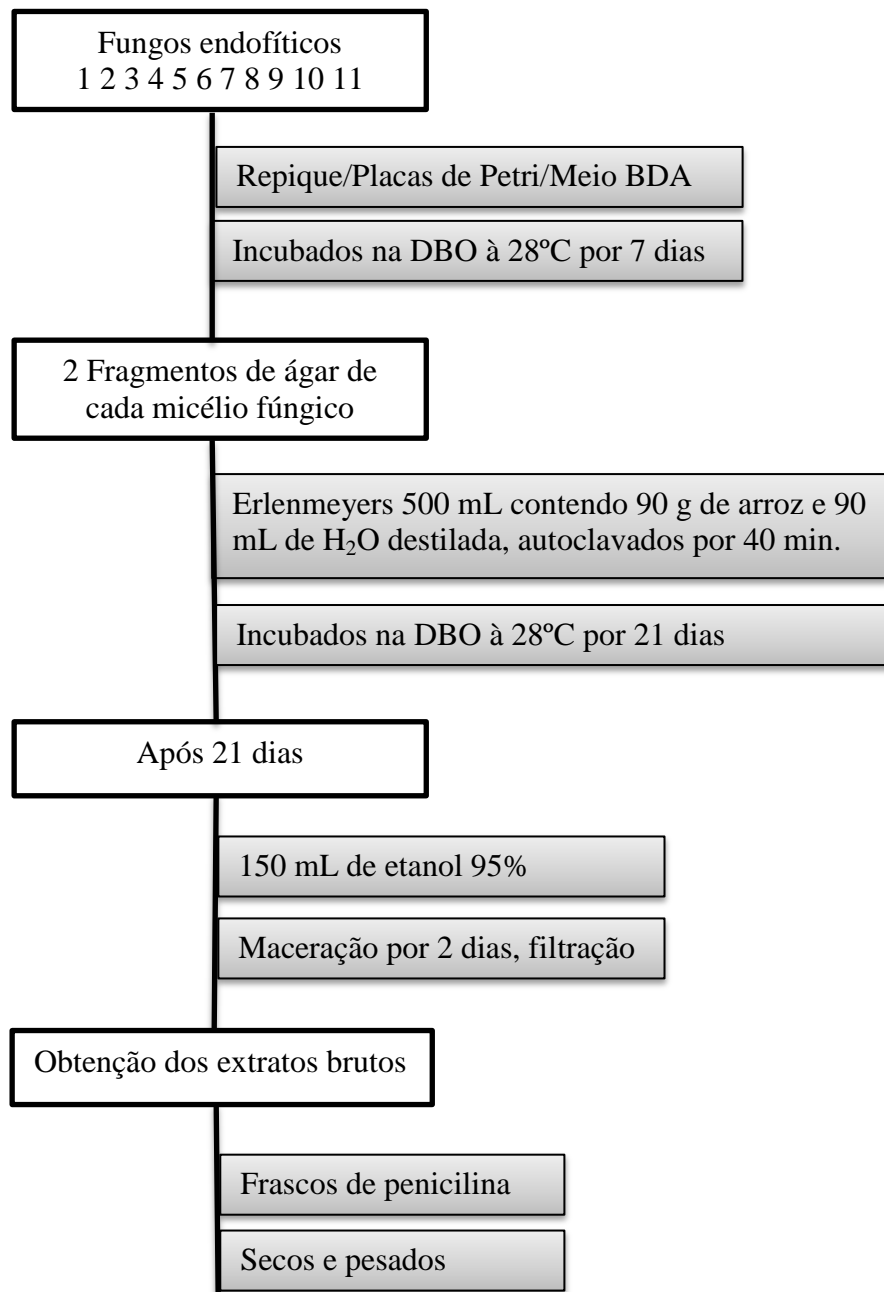


Figura 19 – Fluxograma da cultura em pequena escala para obtenção dos extratos brutos.

4.4.2 Cultura sólida para preparação dos extratos brutos citotóxicos e antimicrobianos em larga escala

Em função dos resultados positivos obtidos nos testes de avaliação das atividades citotóxica e antimicrobiana, o procedimento descrito anteriormente no item 4.4.1 foi repetido em maior escala a fim de se obter maior quantidade de extratos brutos ativos para os fracionamentos cromatográficos.

Em seguida, cada extrato etanólico ativo, foi submetido a partição líquido-líquido utilizando-se hexano e acetato de etila como solventes extratores, sendo obtidas as frações hexano e acetato de etila, respectivamente.

4.5 Triagem química dos extratos etanólicos dos fungos endofíticos associados à *E. erythropappus*

Foi realizada uma triagem química de todos os extratos etanólicos brutos dos onze fungos endofíticos isolados, para determinar as classes de constituintes químicos presentes. Foram realizados testes para detecção de terpenoides, saponinas, taninos, flavonoides e alcaloides, usando-se procedimentos padrão descritos na literatura,⁹⁹⁻¹⁰¹ conforme abaixo:

a) Teste para detecção de terpenoide

Aproximadamente 5 a 10 mg do extrato foram dissolvidos em 2 mL de clorofórmio. Em seguida adicionaram-se 3 mL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico) concentrado para formar uma camada. Uma coloração vermelha-castanho na interface entre as duas camadas, representou resultado positivo para a presença de terpenoides

b) Teste para detecção de saponinas

Primeiramente 5 a 10 mg do extrato foram dissolvidos em 5 mL de H₂O (água) e o material foi agitado por 15 segundos em um tubo de penicilina. Esperou-se 30 segundos e a formação de uma espuma persistente na superfície, indicou a presença de saponinas.

c) Teste para detecção de taninos

Aproximadamente 5 a 10 mg do extrato foram dissolvidos e agitado em 2 mL de H₂O. Foi adicionado ao material uma solução de FeCl₃ (cloreto de ferro III) 5%. A formação de um precipitado preto azulado, verde ou verde azulado indicou a presença de taninos.

d) Teste para detecção de flavonoides

Aproximadamente 5 a 10 mg do extrato foram dissolvidos em 2 mL de NaOH (hidróxido de sódio) 2%. O aparecimento de uma coloração amarela intensa indicou a presença de flavonoides.

e) Teste para detecção de alcaloides

Amostras de 5 a 10 mg de cada extrato foram dissolvidas e aplicadas em placas de CCDC (Cromatografia em Camada Delgada Comparativa), juntamente com o padrão positivo

de alcaloide (quinina). A revelação foi realizada com aplicação do reagente específico para alcaloide, no caso, o reagente de Dragendorff, seguido de aquecimento a 100°C. O aparecimento de mancha vermelho-alaranjado no teste de Dragendorff foi considerado resultado positivo para a presença de alcaloides.

4.6 Ensaios de atividades biológicas

4.6.1 Ensaio de atividade antiproliferativa (citotóxica)

Os ensaios de atividade citotóxica *in vitro* foram realizados no Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob a supervisão do Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira.

a) Extratos etanólicos brutos

A citotoxicidade dos extratos foi determinada através do ensaio colorimétrico do MTT. A análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (NCI), que testa mais de 10.000 amostras a cada ano.¹⁰² É um método rápido, sensível e barato. Foi descrito primeiramente por Mosman (1983),¹⁰³ tendo a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O estudo citotóxico pelo método do MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação.¹⁰⁴

A metodologia utilizada foi a descrita por Nascimento e colaboradores (2012),¹⁰⁵ utilizando-se três linhagens celulares tumorais humanas: PC3 (próstata-humano), HCT-116 (côlon-humano) e SF-295 (glioblastoma-humano), as quais foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos, mantidas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂).

As células foram plaqueadas na concentração de 0,1 x 10⁶ cél/mL para as linhagens PC3 e SF-295 e 0,7 x 10⁵ cél/mL para a linhagem HCT-116, juntamente com os extratos diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido), na concentração de 50 µg/mL. As placas foram incubadas por 72 horas nas mesmas condições citadas acima. Ao término deste, os mesmos foram centrifugados e os sobrenadantes, removidos. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 horas. A

absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO em espectrofotômetro de placa a 595 nm (nanômetro). O controle positivo foi realizado com a substância doxorubicina (0,3 µg/mL).

Os experimentos foram analisados segundo a média ± desvio padrão da média (DPM) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*[®]. Cada amostra foi testada em triplicata, em dois experimentos independentes. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas.¹⁰⁵

(SA) = amostras sem atividade;

(PA) = pouca atividade, inibição de crescimento celular de 1 a 50%;

(MO) = atividade moderada, inibição de crescimento celular de 50 a 75%;

(MA) = muita atividade, inibição de crescimento celular de 75 a 100%.

b) Frações hexânica e acetato de etila oriundas das partições

As frações hexânica e acetato de etila, oriundas das partições, dos fungos que apresentaram atividade antiproliferativa foram enviadas para uma análise de modo a verificar os percentuais de inibição para ambas frações.

4.6.2 Ensaio de atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados no Instituto de Biologia, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a supervisão do Prof. Dr. Marcos José Salvador.

A atividade antimicrobiana foi realizada *in vitro* frente a bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e leveduras, cepas padrão (Tabela 1). As bactérias foram cultivadas por 24 horas a 37 ± 2°C em ágar tripticase de soja e as leveduras foram cultivadas por 24 horas a 30 ± 2°C em ágar Sabouraud dextrose. Todas as cepas das indicadoras foram mantidas como culturas puras no Laboratório de Princípios Ativos Naturais, Biociências e Biotecnologia do DBV-IB-UNICAMP.

A ação antibacteriana e antifúngica foi determinada pelo método de difusão em ágar pela técnica de poço em camada dupla e pelo método de microdiluição,¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ seguindo a adequação de metodologia.¹¹⁰⁻¹¹²

Micro-organismos	Cepas
<i>Staphylococcus aureus</i> ^a	ATCC14458
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^a	ATCC 12228
<i>Escherichia coli</i> ^b	ATCC 35218
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^b	ATCC 27853
<i>Candida albicans</i> ^c	ATCC 10231
<i>Candida parapsilosis</i> ^c	ATCC 22019
<i>Candida dubliniensis</i> ^c	ATCC 778157
<i>Candida glabrata</i> ^c	ATCC 30070

^aGram-positivas, ^bGram-negativas, ^cleveduras.

Tabela 1 – Micro-organismos utilizados para a análise do ensaio antimicrobiano

a) Extratos etanólicos brutos

No plaqueamento, para as bactérias, a camada base foi obtida pela adição de 20,0 mL de Müller Hinton Medium (Difco)-MH e Brain Heart Infusion agar (Difco)-BHIIa, em placas de 20 x 150 mm. Após a solidificação 5,0 mL de MH foram adicionados, a cerca de 50°C, inoculado com as cepas padrão obtendo-se, assim, a camada *seed*. Em seguida, foram confeccionados poços com 5,0 mm de diâmetro. No caso dos fungos, para o plaqueamento utilizou-se uma mistura contendo 20,0 mL de ágar base glicosado duas vezes concentrado e 20,0 mL da solução contendo meio RPMI 1640 (Gibco - BRL) duas vezes concentrado e tampão MOPS, a cerca de 50°C, inoculados ($5 \cdot 10^6$ ufc/mL), independentemente, com as cepas de leveduras em placas de 20 x 150 mm. A seguir foram confeccionados poços com 5,0 mm de diâmetro.

Em cada poço foram aplicados 20 µL das soluções controle (positivo e negativo) e drogas-teste, soluções estas, preparadas em propilenoglicol/RPMI-1640 (1:19) nas concentrações de 5,00 mg/mL para os extratos brutos etanólicos no *screening*. Como controle positivo foram utilizados cloranfenicol para as linhagens de bactérias e cetoconazol (100,0 µg/mL) para as linhagens de levedura, e como controles negativos propilenoglicol/RPMI-1640 (1:19) e RPMI-1640 esterilizado. Para as amostras que se mostraram ativas na triagem, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM). Foi considerada como CIM a menor concentração onde foi observada a presença de inibição de 50% do desenvolvimento microbiano.^{110,113} Quando em dúvida quanto à presença de inibição total, material do poço

contendo a substância-teste foi coletado e inoculado em placas contendo meio MHb ou ASD para a verificação se o efeito é biocida ou não.

As placas-teste, foram mantidas à temperatura ambiente por cerca de 2 horas e depois incubadas a 37°C por cerca de 24 horas para as bactérias e 48 horas para as leveduras.

Decorrido o período de incubação, as zonas de inibição do desenvolvimento microbiano foram mensuradas em termos de diâmetro (halo) e aro da borda do poço a início do desenvolvimento, em milímetros e CIM ($\mu\text{g}/\text{mL}$). Os experimentos foram realizados em duplicata, para cada cepa indicadora utilizada.

b) Frações hexânica e acetato de etila oriundas das partições

Para as frações hexânica e acetato de etila, oriundas das partições, dos fungos que apresentaram atividade antimicrobiana, foi usada uma nova metodologia, descrita abaixo.

O método de antimicrobiano de microdiluição em placa de 96 poços foi realizado de acordo com metodologia descrita na ANVISA (2008; 2003).¹¹⁴⁻¹¹⁵ Em cada poço foram pipetados 40 μL de meio de cultura líquido TSB (Caldo Trypticase de Soja) para as bactérias e SDB (Caldo Sabouraud Dextrose) para as leveduras + 10 μL do inóculo da suspensão de micro-organismos ($1,5 \times 10^8$ Bactérias/mL e 5×10^6 Células/mL para as leveduras) + 50 μL das amostras-teste em diferentes concentrações e como solução controle (positivo e negativo) das amostras-teste, foi utilizado como controle positivo a bacitracina (0,2 UI/mL) para as bactérias e cetoconazol (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para as leveduras e como controle negativo propilenoglicol esterilizado/água destilada esterilizada (1:19 v/v).

A incubação foi a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas para as leveduras e $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas para as bactérias. Decorrido o período de incubação, procedeu-se a leitura visual da turvação nos poços e, quando da presença de inibição total, o material foi inoculado (estrias com o conteúdo de uma alçada de alça de platina) em placas contendo meio TSA (Agar Trypticase de Soja) para bactérias e meio ASD (Agar Sabouraud Dextrose) para fungos e as placas incubadas a $37/30 \pm 2^\circ\text{C}$ por cerca de 24/48 horas para verificar se o efeito foi biocida ou não. Adicionalmente, ao conteúdo remanescente de cada poço foram pipetados 10 μL de solução a 10% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio e as placas foram incubadas a $30/37^\circ\text{C}$ por 2-4 horas, avaliando-se a inibição do crescimento microbiano por análise colorimétrica com leitura em leitora de microplaca no comprimento de onda de 620 nm.

Os resultados foram expressos em termos de presença ou ausência de inibição nas diferentes concentrações estudadas (2,50; 1,25, e 0,625) em mg/mL. Os experimentos foram realizados em duplicata para cada cepa indicadora estudada.

4.6.3 Ensaio de atividade alelopática

A avaliação da atividade alelopática foi realizada na Escola de Farmácia, da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), no Laboratório de Farmacognosia, sob a supervisão de Janaína Brandão Seibert, aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

A metodologia utilizada foi a descrita por Seibert (2015),¹¹⁶ a partir do método de bioensaios de germinação sobre sementes de alface (*Lactuca sativa*), já que esta é considerada uma planta indicadora de atividade alelopática, e sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*), também muito utilizada em biotestes de laboratório, ambas adquiridas em comércio local. Além dessas, foram utilizadas sementes das seguintes plantas daninhas, mencionadas no item 2.8.3.1, página 23: mostarda (*Brassica rapa* L.), coletada no Horto Botânico “Jorge Luiz da Silva” no *campus* da UFOP, sementes de picão-preto (*Bidens pilosa* L.) e juá (*Solanum palinacanthum* Dun.), ambas coletadas no *campus* da UFOP. As exsiccatas encontram-se depositadas no Herbário José Badini da UFOP, sob os números OUPR 29075, OUPR 29076 e OUPR 29077, respectivamente para mostarda, picão-preto e juá.

Nos testes de atividade fitotóxica, normalmente são utilizadas plantas sensíveis que, em curto espaço de tempo apresentam respostas eficazes, mesmo na presença de baixa concentração de aleloquímicos, o que justifica a escolha das espécies: alface e tomate.

Para os ensaios foram utilizadas placas Petri descartáveis e estéreis de 6 cm, adicionando-se um papel de filtro autoclavado de mesmo diâmetro. Este sistema foi umedecido com 1 mL dos controles e das amostras. O controle positivo foi uma solução aquosa de ZnCl₂ a 5% e o controle negativo apenas água destilada.

A análise de atividade alelopática foi realizada somente com o óleo essencial obtido das folhas de *E. erythropappus*, e a caracterização química do óleo encontra-se na página 41.

O óleo essencial foi diluído de forma seriada 1:2 em éter etílico P.A. de modo a obtê-lo nas concentrações de 200 a 1,56 µL/mL, as quais foram adicionadas nas placas. Em seguida, aguardou-se a evaporação do solvente orgânico e o volume evaporado foi substituído por água destilada. Dessa forma, houve dissolução e impregnação do óleo no papel de filtro de forma homogênea sem a posterior interferência do éter etílico nos resultados.

Posteriormente, as sementes, previamente esterilizadas, imersas em solução de hipoclorito de sódio a 20% durante 10 minutos, foram secas e adicionadas nas placas. O teste foi realizado em triplicata e em cada placa foram adicionadas 20 sementes de alface (pelo fato de serem menores) e, no caso do tomate, mostarda, picão-preto e juá foram adicionadas 10 sementes. O material foi então deixado à temperatura ambiente de acordo com o tempo de

germinação para cada espécie, 5, 7, 8, 9 e 10 dias para alface, mostarda, picão-preto, tomate, e juá respectivamente, e regado quando necessário. Após esse período, as médias do número de sementes germinadas e do tamanho das raízes das plantas foram determinadas, seguido dos cálculos da porcentagem de variação da germinação (VG) e do crescimento da raiz (VCR), conforme as fórmulas abaixo:

$$\% \text{VG} = [(N_{\text{amostra}} - N_{\text{controle}})/N_{\text{controle}}] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde, N_{amostra} é o número de sementes germinadas nas amostras e N_{controle} é o número de sementes germinadas no controle negativo, com apenas água destilada.

$$\% \text{VCR} = [(CM_{\text{amostra}} - CM_{\text{controle}})/CM_{\text{controle}}] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde, CM_{amostra} é o comprimento médio das raízes nas amostras e CM_{controle} é o comprimento médio das raízes no controle negativo, com apenas água destilada.

Os resultados foram expressos através da curva *x versus y* realizada no programa GraphPad Prism[®], a partir do cálculo da $CI_{50\%}$, ou seja, a concentração de cada amostra capaz de inibir 50% da germinação e do crescimento médio da raiz para cada espécie.¹¹⁷⁻¹¹⁹

4.7. Triagem química das frações hexânica e acetato de etila dos fungos endofíticos com atividade citotóxica e antimicrobiana

Novas triagens químicas foram realizadas com as frações em hexano e acetato de etila, oriundas das partições dos extratos etanólicos dos fungos endofíticos que apresentaram atividade citotóxica e antimicrobiana, para determinação das mesmas classes de constituintes químicos já descritos na metodologia no item 4.5.

4.8 Isolamento e purificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos brutos ativos

Para o isolamento e purificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos brutos ativos foram utilizados processos cromatográficos:

a) Para as cromatografias em coluna (CC) foram utilizadas colunas de vidro, com diferentes diâmetros, empregando-se como fases sólidas: poliamida (Macherey Nagel código Aet-Nr. 81561, <0,07 mm), e a relação 1:8 entre amostra e adsorvente; e sílica gel 60 (Vetec código 1095, 0,063-0,200 mm, 70-230 mesh), e a relação 1:20 entre amostra e adsorvente. A eluição

das colunas utilizando-se poliamida como fase sólida foram realizadas com eluentes e misturas de eluentes em ordem decrescente de polaridade (água, etanol, acetato de etila e hexano). A eluição das colunas utilizando-se sílica como fase sólida foram realizadas com eluentes e misturas de eluentes em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e etanol).

b) Para as CCDC (cromatografia em camada delgada comparativa) foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel GF₂₅₄ sobre alumínio de 20x20 cm (Macherey-Nagel, Germany).

c) Para as cromatografias de permeação em gel foi utilizado Sephadex LH-20 como fase estacionária e etanol como eluente. E, como suporte, utilizou-se uma coluna de vidro com as seguintes dimensões: 31,5 cm de comprimento e 2,0 cm de diâmetro.

d) Como reveladores das placas cromatográficas, foram utilizados: radiação UV ($\lambda = 254$ e 365 nm, Boitton Equipamentos) e nebulização com o reagente vanilina sulfúrica, seguido de aquecimento a 100°C . O reagente foi preparado utilizando-se 0,5 g de vanilina, 50 mL de etanol e 5,0 mL de H_2SO_4 .

e) Os solventes utilizados foram de grau P.A. (pró-análise), das marcas Vetec, Fmaia e Synth.

f) Para a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas das frações hexânicas dos fungos 4, 5, 9 e 11 e do óleo essencial obtido das folhas de *E. erythropappus*, foi utilizado o equipamento Shimadzu, modelo QP-2010 com coluna Phenomenex Zebron ZB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μm de espessura de filme), do laboratório de Química Orgânica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP). A amostra foi injetada sob o seguinte protocolo: gás de arraste hélio (99,999%) mantido a uma vazão de 1,1 mL/min; volume de amostra injetado foi de 1,00 μL , com o injetor no modo *split* relação 1:40, a 240°C ; impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; 280°C a temperatura íon-fonte. A programação da temperatura utilizada foi: inicial 100°C (isoterma por 5 minutos), elevando com uma rampa de $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até 250°C (isoterma por 5 minutos), seguido de uma rampa de $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até 280°C (isoterma por 15 minutos). Os compostos das frações em hexano dos fungos 4, 5, 9 e 11 e fração F11-A4 foram identificados através da comparação com espectros de padrões existentes no banco de dados do equipamento (NIST e WILEY). Para o óleo essencial a identificação dos compostos foi feita pela mesma comparação com espectros de padrões existentes no banco de dados do equipamento e

comparação dos índices de retenção com aqueles preconizados na literatura. Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma curva de calibração de uma série de *n*-alcanos injetados nas mesmas condições cromatográficas da amostra, empregando a equação de Van den Dool & Kratz (1963).¹²⁰

4.9 Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados

Para a determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados, foram utilizados métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C. Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram registrados em espectrômetros Bruker DPX 400 e 500 MHz, operando em 400 e 500 MHz para o ¹H e 100 e 125 MHz para o ¹³C, respectivamente. Os espectros foram obtidos utilizando-se solventes deuterados da marca Aldrich e Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

4.10 Obtenção e caracterização do óleo essencial das folhas de *E. erythropappus*

O óleo essencial foi obtido através de dois processos de hidrodestilação. Para o primeiro processo de obtenção do óleo, foi utilizado o aparelho de Clevenger, onde se fez uso de uma manta aquecedora (marca Nova Orgânica, modelo 2000) e um balão de 2000 mL. O óleo extraído por esse processo foi usado para caracterização de seus compostos. Para o segundo processo foi usado um hidrodestilador (Linax) pertencente ao Laboratório de Farmacognosia da Escola de Farmácia da UFOP. O óleo extraído por esse processo foi usado para a realização da atividade alelopática.

Para o primeiro processo de obtenção do óleo, as folhas de *E. erythropappus* foram coletadas no dia 02 de dezembro de 2015 no campo rupestre, na Canga do Degeo (Departamento de Geologia) do *campus* da UFOP em Ouro Preto-MG. Foram utilizados 300,2366 g de folhas, em 1000 mL de água destilada, por um período de 5 horas.

O óleo foi então recolhido e pesado para cálculo do rendimento. O acondicionamento foi realizado em vidro de penicilina devidamente lacrado, envolvido em papel alumínio e mantido a baixa temperatura em geladeira para posterior utilização.

Para o segundo processo de obtenção do óleo, as folhas frescas da espécie vegetal foram coletadas no mês de março de 2016, no mesmo local acima citado. Após a coleta, as folhas frescas foram fragmentadas a fim de se reduzir o seu tamanho e obter uma maior superfície de contato e, em seguida, foram pesadas (1.311,77 g) e acondicionadas em um compartimento denominado dorna. O óleo essencial, assim que obtido, foi colocado em um

tubo de ensaio para centrifugação (Centrífuga Excelsa Baby I[®]) para que houvesse uma melhor separação da água através da diferença de densidade e imiscibilidade das fases. O óleo foi então recolhido com uma pipeta e pesado em balança analítica para cálculo do rendimento.

O acondicionamento foi realizado em vidro de penicilina devidamente tampado, envolvido em papel alumínio e mantido a baixa temperatura em geladeira.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Local da coleta

As folhas da planta *E. erythropappus*, família Asteraceae, foram coletadas no campo rupestre, na Canga do Degeo (Departamento de Geologia) do *campus* da UFOP, Morro do Cruzeiro, em Ouro Preto-MG, no dia 24/09/14 (Figura 20). Esta área está localizada na região Sudeste do Brasil, em Minas Gerais, e compreendendo os municípios de Ouro Preto, Mariana, Congonhas, Nova Lima, Belo Horizonte, Sabará, Caeté, Santa Bárbara e Ponte Nova, a região conhecida com Quadrilátero Ferrífero possui aproximadamente 7.200 km².¹²¹

O termo “Canga” é utilizado para nomear depósitos hematíticos superficiais que ocorrem no Quadrilátero Ferrífero e na Serra dos Carajás, no Pará.¹²²⁻¹²³

Bastante característicos da região do Quadrilátero Ferrífero, os campos rupestres sobre Canga são pouco conhecidos e destacam-se como ambientes ricos em espécies endêmicas, principalmente devido às particularidades fisiológicas e morfológicas necessárias para o crescimento-desenvolvimento em condições tão específicas.¹⁴

Desta maneira, a espécie *E. erythropappus* foi escolhida para este estudo levando-se em consideração seu histórico etnobotânico e endemismo, além da escassez de trabalhos sobre seus fungos endofíticos associados.



Figura 20 – Foto da área de coleta da planta *E. erythropappus*, na Canga do Degeo-UFOP, em Ouro Preto-MG.

5.2 Isolamento e preservação dos fungos endofíticos

As folhas coletadas de cada indivíduo foram conservadas individualmente em sacos plásticos estéreis (Figura 21), previamente identificados e transportados para o Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais.



Figura 21 – Foto das folhas de *E. erythropappus* em saco plástico.

O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 horas após a coleta. As folhas de cada indivíduo foram desinfetadas em ambiente asséptico (cabine de segurança biológica), (Figura 22), fazendo-se uso da metodologia descrita no item 4.2.



Figura 22 – Foto da cabine de segurança biológica, contendo os materiais utilizados para desinfecção.

Onze cepas de fungos endofíticos foram isoladas das folhas de *E. erythropappus*, (Figura 23).

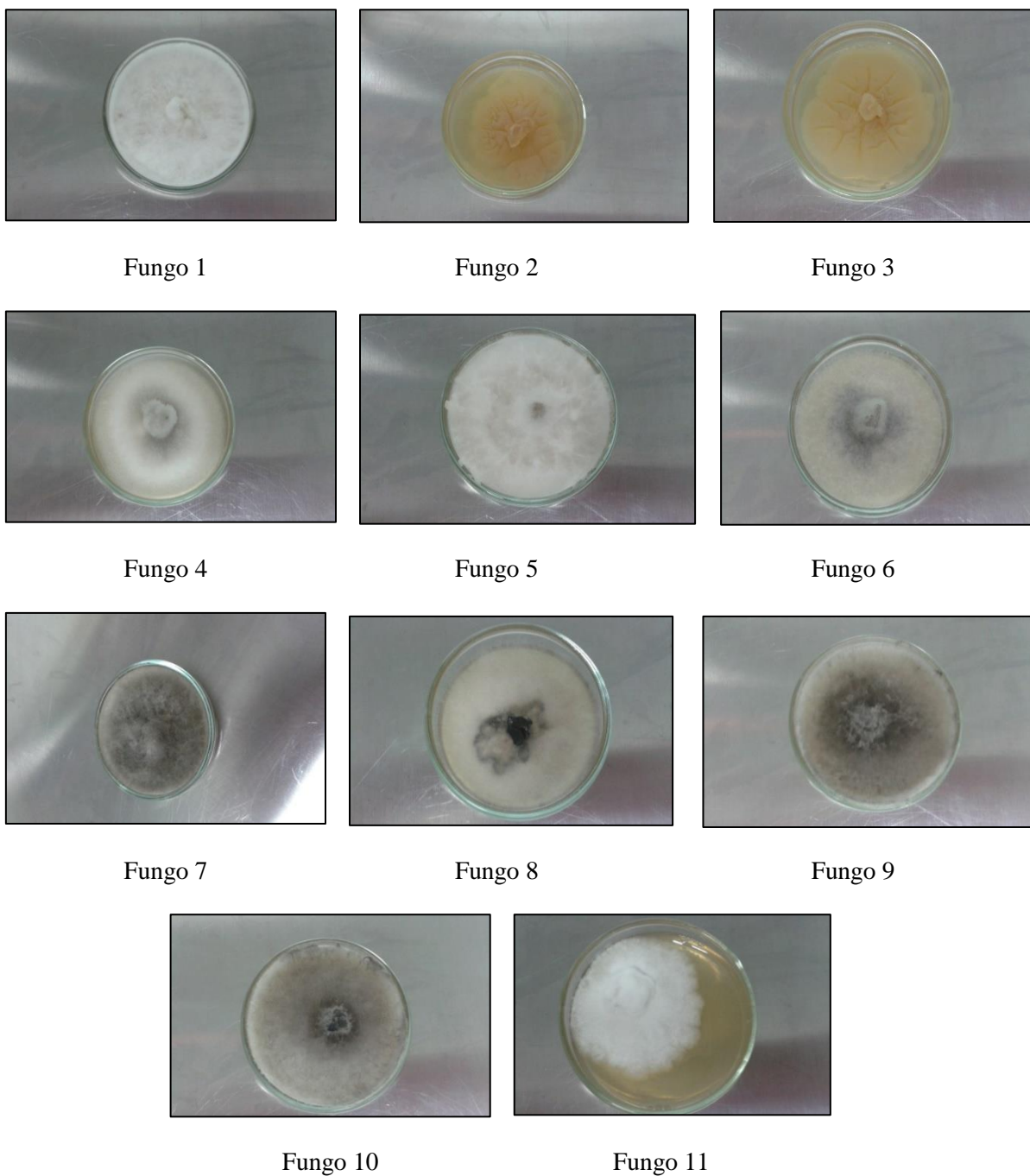


Figura 23 – Fotos de placas de Petri contendo os fungos endofíticos de 1 a 11 isolados de folhas de *E. erythropappus*.

5.3 Identificação dos fungos endofíticos

Um total de onze cepas fúngicas foram isoladas das folhas de *E. erythropappus* (Figura 23), entretanto, quatro cepas não sobreviveram (1, 2, 3 e 10), mesmo após serem preservadas em água estéril, método de Castellani.⁹² O fragmento de ágar contendo o micélio foi retirado da água estéril e colocado em placa de Petri contendo meio BDA, e depois foi incubado em uma estufa de DBO a 28°C. Este procedimento foi repetido várias vezes e não

foi observado crescimento fúngico. Desta maneira, foi verificado que se faz necessário mais de um meio de conservação para os fungos endofíticos, de modo a evitar perdas.

As sete cepas de fungos endofíticos restantes foram identificadas por sequenciamento de DNA e os resultados estão descritos na Tabela 2.

Código	Resultados da pesquisa Top BLAST [GenBank n° de acesso]	Cobertura (%)	Identidade (%)	N° de bp analisado	Ordem e classe proposto pelo [GenBank acc.n °]
F4	<i>Flavomyces fulophazii</i> CBS 135761 (KP184001) ^{ITS}	84	91	533	<i>Pleosporales</i> sp.
	<i>Didymosphaeria rubi-ulmifolii</i> MFLUCC 14-0023 (KJ939277) ^{BT}	62	79	254	
F5	<i>Neopestalotiopsis natalensis</i> CBS 138.41 (KM199377) ^{ITS}	100	87	525	<i>Xylariales</i> sp.
	<i>Arthrinium xenocordella</i> CBS 478.86 (KF145013) ^{BT}	56	95	364	
F6	<i>Arthrinium xenocordella</i> CBS 478.86 (NR120274) ^{ITS}	92	90	468	<i>Xylariales</i> sp.
	<i>Pestalotiopsis anacardiacearum</i> IFRDCC 2397 (KC247155) ^{BT}	61	94	333	
F7	<i>Neopestalotiopsis natalensis</i> CBS 138.41 (KM199377) ^{ITS}	99	86	527	<i>Xylariales</i> sp.
	<i>Arthrinium xenocordella</i> CBS:478.86 (KF145013) ^{BT}	57	94	349	
F8	<i>Pseudopestalotiopsis cocos</i> CBS 272.2 (KM199378) ^{ITS}	100	87	524	<i>Xylariales</i> sp.
	<i>Pestalotiopsis anacardiacearum</i> IFRDCC 2397 (KC247155) ^{BT}	61	95	329	
F9	<i>Neopestalotiopsis natalensis</i> CBS 138.41 (KM199377) ^{ITS}	100	86	526	<i>Xylariales</i> sp.
	<i>Pestalotiopsis arceuthobii</i> CBS 434.65 (KM199427) ^{BT}	42	95	330	
F11	<i>Collodiscula leigongshanensis</i> GZUH0107 (KR002587) ^{BT}	97	85	328	<i>Sordariomycetes</i> sp.

ITS = sequenciamento da região ITS; BT = sequenciamento da região da Beta-tubulina.

Tabela 2 – Identificação molecular dos fungos endofíticos associados à *E. erythropappus*

Visto que as espécies não foram classificadas até o presente momento, os dados obtidos são preliminares e referem-se somente à ordem (para os fungos 4, 5, 6, 7, 8 e 9) e classe (fungo 11), (Tabela 2). As sequências de DNA foram analisadas e as mesmas estão apresentando baixa cobertura e identidade, quando comparadas com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, por esse motivo foi determinado somente a ordem e classe.

O sequenciamento será repetido a fim de se obter dados mais específicos para possibilitar a identificação das espécies dos fungos isolados.

Os fungos endofíticos não apresentam tanta especificidade quanto às plantas hospedeiras. Além disso, uma única espécie de endofítico pode se estabelecer em vários órgãos da mesma planta, sendo capaz de utilizar diferentes substâncias da hospedeira.¹²⁴

Até o momento, existe em relação a fungos endofíticos associados à *E. erythropappus*, o estudo de Magalhaes e colaboradores (2008)¹²⁵ o único encontrado na literatura. Esses pesquisadores realizaram um estudo para saber a taxa de colonização de fungos endofíticos em três diferentes tecidos da planta bem como identificar os gêneros dispostos sobre tais tecidos. Como resultado foi visto que para as três partes da planta: sementes, folhas e fragmentos de caule, a taxa de colonização dos fungos endofíticos foi de 9, 35 e 115, respectivamente. Já para a identificação foi visto que os gêneros *Xylaria* e *Phomopsis* foram considerados gerais, pois foram encontrados em todos os tecidos analisados. Demonstraram especificidade os gêneros: *Alternaria* e *Fusarium*, presentes em sementes; *Nigrospora* e *Aspergillus* em folha e *Dothiorella* em caule.

No nosso trabalho os sete fungos endofíticos isolados das folhas de *E. erythropappus*, foram classificados em duas ordens: *Pleosporales* sp para o fungo 4 e *Xylariales* sp. para os fungos 5, 6, 7, 8 e 9, e uma classe: *Sordariomycetes* sp. referente ao fungo 11.

Não se pode fazer uma correlação entre os gêneros de fungos endofíticos encontrados no estudo de Magalhaes e colaboradores (2008)¹²⁵ e aqueles encontrados nas folhas de *E. erythropappus* no presente estudo, uma vez que, neste caso a identificação não chegou até gênero e espécie dos fungos (Tabela 2).

5.4 Condições de cultura dos fungos e preparação dos extratos brutos

5.4.1 Cultura sólida para preparação dos extratos brutos em pequena escala

As culturas em meio sólido dos fungos endofíticos realizadas em arroz acrescido de etanol 95% são representadas nas fotos da Figura 24, página 48.



Figura 24 – Fotos de frascos de Erlenmeyer contendo cultura dos fungos endofíticos em meio sólido (arroz), acrescido de etanol 95%.

Após maceração, filtração e secagem foram obtidas as massas dos 11 extratos etanólicos brutos dos fungos isolados, mais a massa do extrato etanólico do branco, em pequena escala (Tabela 3).

O extrato que apresentou a maior massa foi o extrato etanólico do fungo 8 (4,8294g) e o que apresentou a menor massa foi o extrato do fungo 7 (2,2415 g).

Fungo	Massa do extrato etanólico bruto (g)	Fungo	Massa do extrato etanólico bruto (g)
1	3,0390	7	2,2415
2	3,4768	8	4,8294
3	3,6013	9	2,9971
4	3,1908	10	2,5573
5	2,7917	11	3,2776
6	2,9718	Branco	2,5519

Tabela 3 – Extratos etanólicos brutos obtidos dos fungos endofíticos isolados de folhas de *E. erythropappus*.

5.4.2 Cultura sólida para preparação dos extratos brutos citotóxicos e antimicrobianos em larga escala

Os fungos 9 e 11 foram os que apresentaram melhor resultado de atividade citotóxica (Tabela 7, página 51), assim como os fungos 4 e 5, que obtiveram melhor resultado de atividade antimicrobiana (Tabela 8, página 52).

Diante disso, tais fungos foram cultivados em larga escala obtendo-se as massas apresentadas abaixo (Tabela 4). Para cada fungo endofítico foram utilizados 10 frascos de Erlemeyer de 500 mL contendo o meio de cultura (arroz).

Fungos	Massa do extrato etanólico bruto (g)
9	14,2419
11	13,8997
4	15,3132
5	17,4228

Tabela 4 – Extratos etanólicos brutos obtidos em larga escala dos fungos com atividades citotóxicas e antimicrobianas

Em seguida, com as massas dos extratos etanólicos brutos, foi realizada uma partição líquido-líquido utilizando hexano e acetato de etila como solventes, obtendo-se então as frações hexânica e acetato de etila respectivamente (Tabela 5).

Através da tabela de partição, observa-se que tanto para fração hexânica quanto para a fração em acetato de etila, os fungos que obtiveram massas significativas foram os fungos 9 e 4.

Fungos	Partição com hexano - Fração hexânica (g)	Partição com acetato de etila - Fração acetato de etila (g)
9	1,1894	2,9201
11	0,8739	0,9021
4	2,2413	1,2989
5	0,7440	0,8136

Tabela 5 – Extratos fúngicos com atividades citotóxicas e antimicrobianas obtidos a partir da partição líquido-líquido

5.5 Triagem química dos extratos etanólicos dos fungos endofíticos associados à *E. erythropappus*

A triagem química dos extratos etanólicos brutos dos fungos endofíticos associados à candeia (*E. erythropappus*), foi realizada para detectar a presença de terpenoides, saponinas, taninos, flavonoides e alcaloides. Os resultados estão representados na Tabela 6.

Classes de compostos orgânicos					
Fungo	Terpenoide	Saponina	Tanino	Flavonoide	Alcaloide
1	-	+	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	+	-	-	-
5	+	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-
7	+	-	-	-	-
8	+	+	-	+	+
9	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	+
11	+	-	-	-	-
Branco	-	-	-	-	-

+ = presente; - = não detectado.

Tabela 6 – Triagem química dos 11 extratos etanólicos brutos e o branco (sem adição de fungo)

Seis dos onze extratos avaliados obtiveram resultado positivo para terpenoides (fungos 5, 6, 7, 8, 10 e 11). Quatro extratos obtiveram resultado positivo para saponinas (fungos 1, 4, 6 e 8). Um extrato foi positivo para flavonoide (fungo 8) e dois positivos para alcaloide (fungos 8 e 10). A presença de taninos não foi detectada a nenhum extrato fúngico.

O fungo 8 foi o que apresentou resultado positivo para quatro das cinco classes de compostos testados. Pode-se supor que o fato deste fungo sintetizar maior número de classes de compostos seja um dos fatores responsáveis pela maior massa do extrato bruto obtida na preparação dos extratos etanólicos brutos em pequena escala.

5.6 Ensaio de atividades biológicas

5.6.1 Ensaio de atividade antiproliferativa (citotóxica)

a) Extratos etanólicos brutos

Os ensaios de atividade citotóxica *in vitro* para os onze fungos endofíticos isolados foram realizados através do ensaio colorimétrico do MTT, utilizando a metodologia descrita no item 4.6.1.

Os resultados da avaliação da atividade citotóxica dos extratos etanólicos brutos estão apresentados na Tabela 7, na forma de percentuais de inibição do crescimento celular.

Extrato Etanólico	Inibição da Proliferação Celular (%)		
	HCT-116	PC-3	SF-295
FUNGO 1	0,00 ± 0,00	62,42 ± 1,78	56,16 ± 15,20
FUNGO 2	25,09 ± 0,00	18,11 ± 7,55	44,46 ± 9,95
FUNGO 3	29,72 ± 8,38	39,73 ± 3,11	49,03 ± 12,91
FUNGO 4	46,39 ± 16,89	25,40 ± 2,93	27,53 ± 12,91
FUNGO 5	56,57 ± 3,93	34,01 ± 4,62	11,08 ± 11,16
FUNGO 6	41,85 ± 0,00	35,77 ± 2,67	46,93 ± 2,69
FUNGO 7	30,14 ± 2,42	34,89 ± 1,07	43,51 ± 2,69
FUNGO 8	23,98 ± 21,61	30,56 ± 10,40	41,32 ± 12,24
FUNGO 9	65,32 ± 33,46	55,70 ± 18,75	53,30 ± 14,39
FUNGO 10	22,55 ± 3,34	33,51 ± 2,13	39,04 ± 6,32
FUNGO 11	51,30 ± 2,62	53,50 ± 1,42	60,63 ± 0,54
BRANCO	29,35 ± 17,28	26,60 ± 0,89	43,98 ± 2,56
DOXORRUBICINA	96,80 ± 4,60	100,00 ± 0,70	83,60 ± 3,00

Valores são média ± DPM (Desvio Padrão da Média). Doxorubicina foi usada como controle positivo. Amostra com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e alta atividade (inibição de crescimento variando de 75 a 100%). Em verde: extratos que apresentaram atividade moderada.

Tabela 7 – Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) dos extratos etanólicos brutos na concentração única de 50 µg/mL

Dos 11 extratos etanólicos brutos avaliados, 4 (fungos 1, 5, 9 e 11) apresentaram moderada atividade antiprolifetativa (50 a 75%), representando 36,4%, frente à pelo menos uma linhagem tumoral testada. Nenhum extrato bruto apresentou alta atividade antiprolifetativa (> 75%).

Dois extratos brutos avaliados (fungos 9 e 11) apresentaram atividade antiprolifetativa moderada para as três linhagens celulares tumorais humanas: PC3 (próstata-humano), HCT-116 (côlon-humano) e SF-295 (glioblastoma-humano) e foram escolhidos para serem cultivados em larga escala. O fungo 9 inibiu 65,32% para a linhagem celular HCT-116, 55,70% para a linhagem PC3 e 53,30% para a linhagem SF-295, enquanto que o fungo 11, para a linhagem HCT-116 teve uma inibição de 51,30%, para linhagem PC3 a inibição foi de 53,50% e para a linhagem SF-295 a inibição foi de 60,63%.

b) Frações hexânica e acetato de etila oriundas das partições

As 2 linhagens escolhidas, fungos 9 e 11, foram cultivadas em larga escala e depois submetidas à partição líquido-líquido utilizando-se hexano e acetato de etila como solventes extratores.

Os resultados da avaliação da atividade antiproliferativa das frações hexano e acetato de etila desses fungos não foram obtidos até o momento.

5.6.2 Ensaio de atividade antimicrobiana

a) Extratos etanólicos brutos

Foi considerada como concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração dos extratos com inibição total do desenvolvimento microbiano (Tabela 8).

Micro-organismos	CIM dos Extratos de Fungos Endofíticos (µg/mL)						
	Branco	F1	F2	F3	F4	F5	C +
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC14458) ^a	>1000	250	250	250	250	250	25,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) ^a	>1000	250	250	250	250	250	50,0
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) ^a	–	–	–	–	–	–	50,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) ^a	–	–	–	–	–	–	>500,0
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) ^a	–	–	–	–	–	–	12,5
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019) ^a	–	–	–	–	–	–	12,5
<i>Candida dubliniensis</i> (ATCC 778157) ^a	–	–	–	–	–	–	12,5
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 30070) ^a	–	–	–	–	–	–	12,5

Micro-organismos	CIM dos Extratos de Fungos Endofíticos (µg/mL)						
	F6	F7	F8	F9	F10	F11	C +
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC14458) ^a	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	25,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) ^a	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	50,0
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) ^a	–	–	–	–	–	–	50,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) ^a	–	–	–	–	–	–	>500,0
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) ^a	–	–	–	–	–	–	12,5
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019) ^a	–	–	–	–	–	–	12,5
<i>Candida dubliniensis</i> (ATCC 778157) ^a	–	–	–	–	–	–	12,5
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 30070) ^a	–	–	–	–	–	–	12,5

a: cepa padrão; –: não ativo até a concentração de 1000 µg/mL; C +: controle positivo, cloranfenicol para as linhagens bacterianas e cetoconazol para as linhagens de levedura.

Tabela 8 – Atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos brutos em termos de concentração inibitória mínima (CIM)

Dos 11 extratos fúngicos testados, todos apresentaram atividade antibacteriana para todas as bactérias Gram-positivas usadas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*), sendo que os valores de CIM variaram entre 250 e 1000 µg/mL. Cinco extratos brutos (45,5%) apresentaram atividade antibacteriana na concentração de 250 µg/mL e foram considerados os mais ativos (linhagens 1, 2, 3, 4 e 5). Os fungos 1, 2 e 3 não cresceram no conservado de Castellani⁹² e por esse motivo os fungos 4 e 5 foram escolhidos para serem cultivados em larga escala.

b) Frações hexânica e acetato de etila oriundas das partições

As 2 linhagens escolhidas acima (fungos 4 e 5) foram cultivadas em larga escala e depois foram submetidas à partição líquido-líquido utilizando-se hexano e acetato de etila como solventes.

A atividade antimicrobiana das frações hexano e acetato de etila dos fungos endofíticos 4 e 5 foi avaliada pelo método de microdiluição nas concentrações de 2,50; 1,25, e 0,625 mg/mL, de acordo com metodologia descrita na ANVISA (2008; 2003),¹¹⁴⁻¹¹⁵ (Tabela 9).

Micro-organismos	Amostras (mg/mL)					
	Fungo 4-Hexânica			Fungo 4-AcOEt		
	2,50	1,25	0,625	2,50	1,25	0,625
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC14458) ^a	±	–	–	±	–	–
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) ^a	±	±	–	±	–	–
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) ^a	+	–	–	+	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) ^a	+	–	–	+	–	–
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) ^a	+	±	–	+	–	–
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019) ^a	–	–	–	–	–	–
<i>Candida dubliniensis</i> (ATCC 778157) ^a	+	±	–	+	–	–
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 30070) ^a	–	–	–	–	–	–

Micro-organismos	Amostras (mg/mL)					
	Fungo 5-Hexânica			Fungo 5-AcOEt		
	2,50	1,25	0,625	2,50	1,25	0,625
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC14458) ^a	–	–	–	–	–	–
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) ^a	–	–	–	–	–	–
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 35218) ^a	–	–	–	+	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) ^a	±	–	–	–	–	–
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) ^a	±	–	–	+	–	–
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019) ^a	–	–	–	–	–	–
<i>Candida dubliniensis</i> (ATCC 778157) ^a	±	–	–	+	–	–
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 30070) ^a	–	–	–	–	–	–

–: Inibição do crescimento microbiano não detectada; ±: inibição parcial ou atividade bacteriostática; +: inibição total do crescimento microbiano; AcOEt: acetato de etila.

Tabela 9 – Atividade antimicrobiana das frações em hexano e acetato de etila dos fungos 4 e 5

À partir dos resultados verificou-se que as frações hexano e acetato de etila do fungo 4 induziram atividade sobre o crescimento das bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) na concentração mais alta de 2,50 mg/mL. Entretanto, frente às bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*), na mesma concentração, o efeito foi de caráter bacteriostático.

Para o fungo 5, a atividade antibacteriana foi menor, apresentando efeito para a fração acetato de etila, na maior concentração, frente a uma única bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*). Para a fração hexânica, o efeito foi de caráter bacteriostático para a outra bactéria Gram-negativa (*Pseudomonas aeruginosa*).

A atividade antimicrobiana frente às espécies de leveduras foi variável. As frações em hexano e em acetato de etila do fungo 4 mostraram efeito nas espécies de *C. albicans* e *C. dubliniensis*, porém a fração hexânica abrangeu duas concentrações (2,50 e 1,25 mg/mL), indicando que os compostos responsáveis pela atividade tem características apolares.

Para o fungo 5, as frações hexano e acetato de etila mostraram efeito sobre as mesmas leveduras acima citadas, na concentração mais alta, entretanto, a fração acetato de etila inibiu totalmente o crescimento das leveduras, enquanto a fração hexânica mostrou uma inibição parcial.

5.6.3 Ensaio de atividade alelopática

Nas Figuras 25 a 28 estão correlacionadas a concentração do óleo essencial das folhas de *E. erythropappus* versus porcentagem de inibição da germinação (A) e do crescimento da raiz (B) sobre as espécies sensíveis: alface (Figura 25) e tomate (Figura 26); e plantas daninhas: mostarda (Figura 27) e picão-preto (Figura 28).

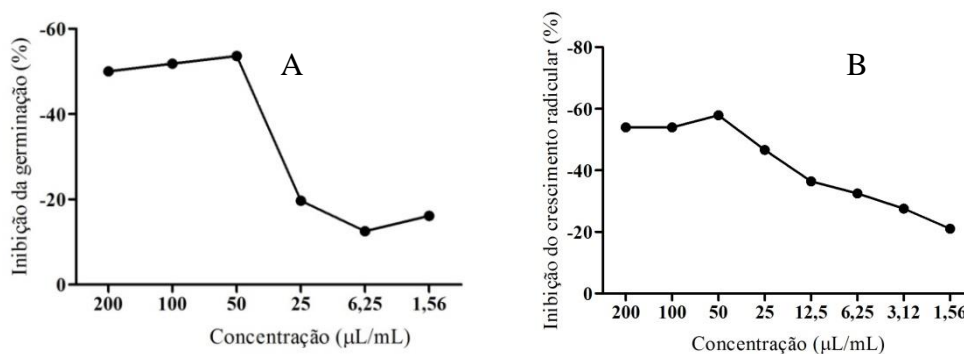


Figura 25 – Representação da atividade alelopática do óleo essencial de folhas de *E. erythropappus* sobre sementes de alface (*Lactuca sativa*). A) % de inibição da germinação. B) % de inibição do crescimento radicular.

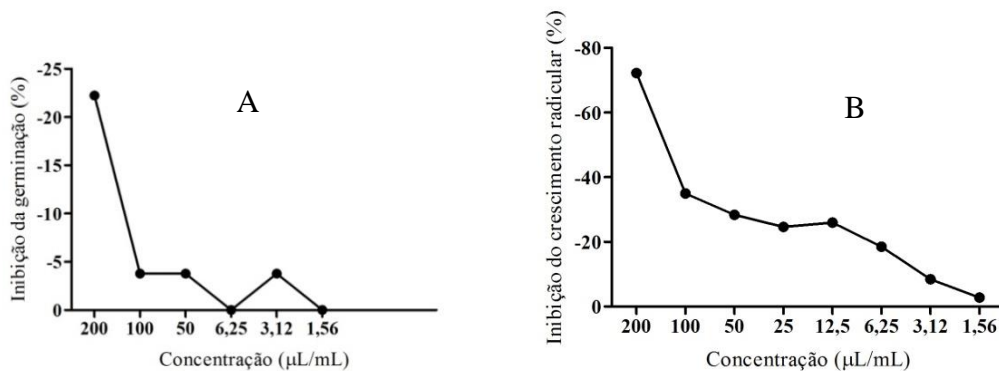


Figura 26 – Representação da atividade alelopática do óleo essencial de folhas de *E. erythropappus* sobre sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum*). A) % de inibição da germinação. B) % de inibição do crescimento radicular.

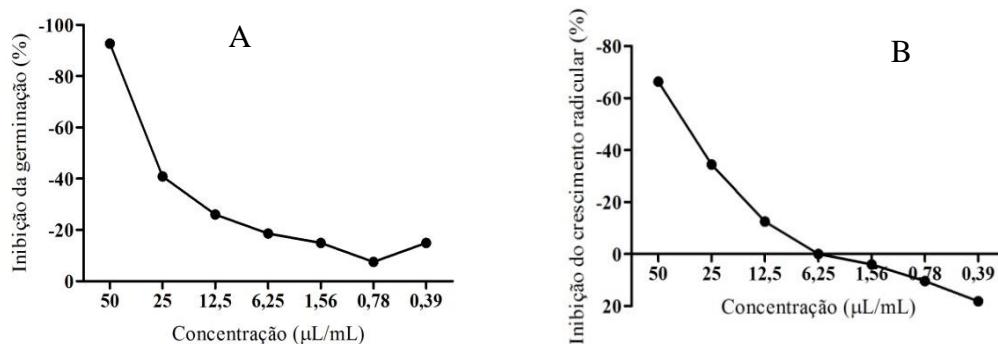


Figura 27 – Representação da atividade alelopática do óleo essencial de folhas de *E. erythropappus* sobre sementes de mostarda (*Brassica rapa L.*). A) % de inibição da germinação. B) % de inibição do crescimento radicular.

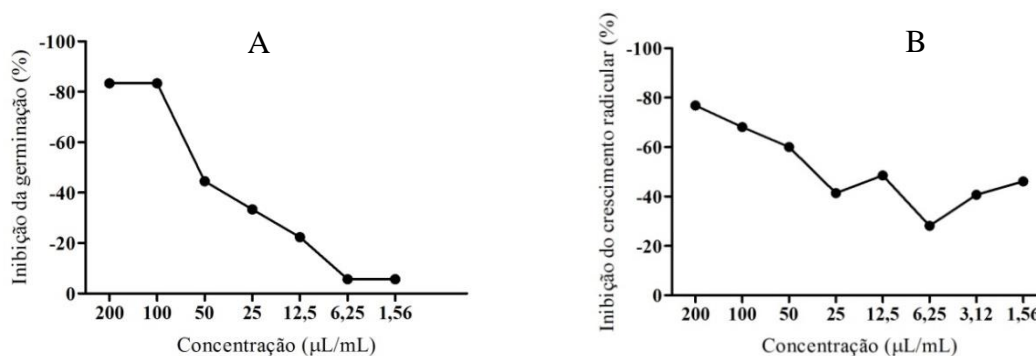


Figura 28 – Representação da atividade alelopática do óleo essencial de folhas de *E. erythropappus* sobre sementes de picão-preto (*Bidens pilosa L.*). A) % de inibição da germinação. B) % de inibição do crescimento radicular.

O juá, espécie considerada como planta daninha, foi a única semente que não germinou, e sua não germinação e crescimento radicular pode-se justificar pela falta de

controle de qualidade que certifique sua potencialidade de crescimento, ou a falta de informação das condições ideais para seu crescimento.

O cálculo da regressão linear para cada amostra gerou a equação da reta e o coeficiente de correlação linear (R^2) conforme a Tabela 10.

Sementes	Equações correspondentes à faixa de linearidade	
Alface (<i>Lactuca sativa</i>)		
% de inibição da germinação	$y = 0,3918x + 11,97$	$R^2 = 0,9787$
% de inibição do crescimento radicular	$y = 0,6964x + 25,525$	$R^2 = 0,9296$
Tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)		
% de inibição da germinação	$y = 0,0948x + 3,8293$	$R^2 = 0,8594$
% de inibição do crescimento radicular	$y = 0,2759x + 14,097$	$R^2 = 0,9531$
Mostarda (<i>Brassica rapa</i>)		
% de inibição da germinação	$y = 1,6909x + 5,1153$	$R^2 = 0,9860$
% de inibição do crescimento radicular	$y = -1,6048x + 10,625$	$R^2 = 0,9756$
Picão-preto (<i>Bidens pilosa</i>)		
% de inibição da germinação	$y = 0,7529x + 8,6554$	$R^2 = 0,9662$
% de inibição do crescimento radicular	$y = 0,2281x + 46,285$	$R^2 = 0,9784$

Tabela 10 – Equações correspondentes à faixa de linearidade na determinação da porcentagem de inibição da germinação e do crescimento radicular para o óleo essencial de folhas de *E. erythropappus* sobre sementes de alface, tomate, mostarda e picão-preto

Os valores da concentração inibitória de 50% ($CI_{50\%}$) das sementes trabalhadas encontram-se representados na Tabela 11.

Sementes	$CI_{50\%}$ ($\mu\text{L/mL}$)	
	Germinação	Crescimento radicular
Alface	97,06	35,14
Tomate	>200	130,13
Mostarda	26,54	24,53
Picão-preto	54,91	16,28

Tabela 11 – Determinação da $CI_{50\%}$ da germinação e do crescimento radicular para o óleo essencial de folhas de *E. erythropappus* sobre sementes de alface, tomate, mostarda e picão-preto

Consideram-se os valores da concentração inibitória de 50% da germinação e do crescimento radicular como um nível satisfatório para refletir a potencialidade de uma planta como fornecedora de compostos com atividade alelopática.¹¹⁶ No presente trabalho, o nível da $CI_{50\%}$ da germinação foi atingido para o óleo das folhas de *E. erythropappus* nas concentrações de 97,06 $\mu\text{L/mL}$ para alface, 26,54 $\mu\text{L/mL}$ para mostarda e 54,91 $\mu\text{L/mL}$ para picão-preto. E os valores da $CI_{50\%}$ para o crescimento radicular foram 35,14 $\mu\text{L/mL}$, 130,13 $\mu\text{L/mL}$, 24,53 $\mu\text{L/mL}$ e 16,28 para alface, tomate, mostarda e picão-preto, respectivamente (Tabela 11).

Como pôde-se observar no gráfico da germinação (A) da Figura 26 e na Tabela 11 de $CI_{50\%}$, não foi possível determinar exatamente a concentração capaz de inibir 50% da germinação para a semente de tomate, uma vez que, esta ultrapassa a maior concentração testada (200 $\mu\text{L/mL}$). Sendo assim, sugere-se que o óleo não teve atividade alelopática para esta semente, visto que seria necessários uma concentração superior a 200 $\mu\text{L/mL}$.

Ainda, de acordo com os valores da $CI_{50\%}$, nota-se que o óleo essencial das folhas de *E. erythropappus* inibiu de forma satisfatória a germinação e crescimento radicular das plantas daninhas (mostarda e picão-preto) sem prejudicar o alface e tomate.

Estudos vêm sendo realizados, focados no manejo e no controle das ervas daninhas, na tentativa de diminuir o uso de herbicidas comerciais, seja através da utilização da alelopatia, seja por meio da rotação de culturas, além da utilização de sistemas agroecológicos, etc.¹²⁶

A atividade alelopática raramente é resultado de um único componente. Em geral, pode estar unida a um grupo de compostos. A diferença do potencial alelopático do óleo essencial sobre estas ervas daninhas pode estar associada com a presença de monoterpenos, um grupo de compostos químicos que se destacam por apresentarem potencial alelopático, influenciando a germinação das sementes e o vigor de mudas.¹²⁷

Segundo Hillen e colaboradores (2012),¹²⁸ o potencial herbicida dos óleos voláteis, inibindo a germinação de sementes e o crescimento de plântulas, pode ser atribuído a um dos componentes do óleo ou à ação conjunta (efeito sinérgico) dos componentes presentes no mesmo, uma vez que os terpenóides geraniol, limoneno, β -ocimeno, linalol, geranyl acetato e β -cariofileno são compostos comprovadamente alelopáticos.

Este é o primeiro estudo realizado sobre o potencial alelopático do óleo essencial das folhas de *E. erythropappus* sobre sementes de alface, tomate, mostarda e picão-preto. Há um estudo descrito na literatura sobre a atividade alelopática do óleo essencial da candeia, entretanto, o estudo foi realizado com sementes de feijão, milho e soja. Estes pesquisadores verificaram que o óleo essencial de candeia apresentou efeito alelopático diferenciado sobre a

germinação das sementes, influenciando diferentemente a germinação e a sanidade das sementes de milho, soja e feijão.¹²⁸

O grau de inibição proporcionado por determinado aleloquímico é dependente do limite de resposta da espécie receptora, o qual não é constante e está intimamente relacionado à sensibilidade da espécie receptora, bem como, da sua concentração, ao passo que, em baixas concentrações, os aleloquímicos podem não ser inibitórios para determinadas espécies ou até mesmo apresentar efeitos estimulatórios, por outro lado, altas concentrações podem ser extremamente inibitórias.¹²⁹

Já em relação aos efeitos de constituintes voláteis de óleos essenciais no desenvolvimento da radícula, Nishida e colaboradores (2005)¹³⁰ relataram que a exposição ao α -pinene, β -pineno, 1,8-cineol e cânfora inibiu o crescimento da raiz de *Brassica campestris* por impedir a proliferação de células em meristemas apicais. Singh e colaboradores (2006)¹³¹ ao estudarem o efeito do α -pinene, sobre o crescimento da raiz em cinco espécies de plantas: *Cassia occidentalis*, *Amaranthus viridis*, *Triticum aestivum*, *Pisum sativum* e *Cicer arietinum*, descobriram que o α -pineno inibe o crescimento precoce da raiz e provoca danos oxidativos nos tecidos.

Do ponto de vista prático, o óleo essencial da presente espécie *E. erythropappus* tem propriedades para ser incorporado como um bioerbicida de plantas daninhas no controle de gerenciamento. Obviamente, estudos de campo de longo prazo e outros ensaios de fitotoxicidade incluindo produtos agrícolas e espécies de plantas daninhas são necessários para apoiar esta proposição.

5.7 Triagem química das frações hexânica e acetato de etila dos fungos endofíticos com atividade citotóxica e antimicrobiana

A triagem química para as frações hexânica e acetato de etila dos fungos 4, 5, 9 e 11 foi realizada conforme metodologia detalhada no item 4.5. Os resultados estão representados na Tabela 12. Para os fungos 9 e 4 observa-se que tanto para a fração hexânica quanto para a fração acetato de etila foram detectadas as mesmas classes de compostos (terpenoides e alcaloides para a fração hexânica e terpenoides, saponinas, flavonoides e alcaloides para a fração acetato de etila). Para o fungo 11, a fração hexânica apresentou resultado positivo somente para terpenoide, e a fração acetato de etila apresentou saponina e flavonoide. O fungo 5 apresentou terpenoides e alcaloides para a fração hexânica e terpenoides, saponinas, e flavonoides para a fração acetato de etila. Para ambas frações dos fungos trabalhados (4, 5, 9 e 11) não foi detectada a presença de tanino.

Fungo 4	Fração hexânica	Fração acetato de etila
Terpenoide	+	+
Saponina	-	+
Tanino	-	-
Flavonoide	-	+
Alcaloide	+	+
Fungo 5	Fração hexânica	Fração acetato de etila
Terpenoide	+	+
Saponina	-	+
Tanino	-	-
Flavonoide	-	+
Alcaloide	+	-
Fungo 9	Fração hexânica	Fração acetato de etila
Terpenoide	+	+
Saponina	-	+
Tanino	-	-
Flavonoide	-	+
Alcaloide	+	+
Fungo 11	Fração hexânica	Fração acetato de etila
Terpenoide	+	-
Saponina	-	+
Tanino	-	-
Flavonoide	-	+
Alcaloide	-	-

Tabela 12 – Triagem química das frações em hexano e acetato de etila dos fungos 4, 5, 9 e 11

5.8 Isolamento e purificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos brutos ativos

5.8.1 Estudos das frações hexânicas dos fungos 4 e 5

Os fungos 4 e 5 foram escolhidos para serem cultivados em larga escala, pois apresentaram melhores resultados para atividade antimicrobiana, (Tabela 8 da página 52). Depois deste cultivo foram submetidos à partição líquido-líquido utilizando-se hexano e acetato de etila como solventes extratores.

Foi realizada uma análise em equipamento de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) das frações hexânicas desses fungos.

Os resultados da análise da fração hexânica do fungo 4 estão representados na Figura 29 e na Tabela 13.

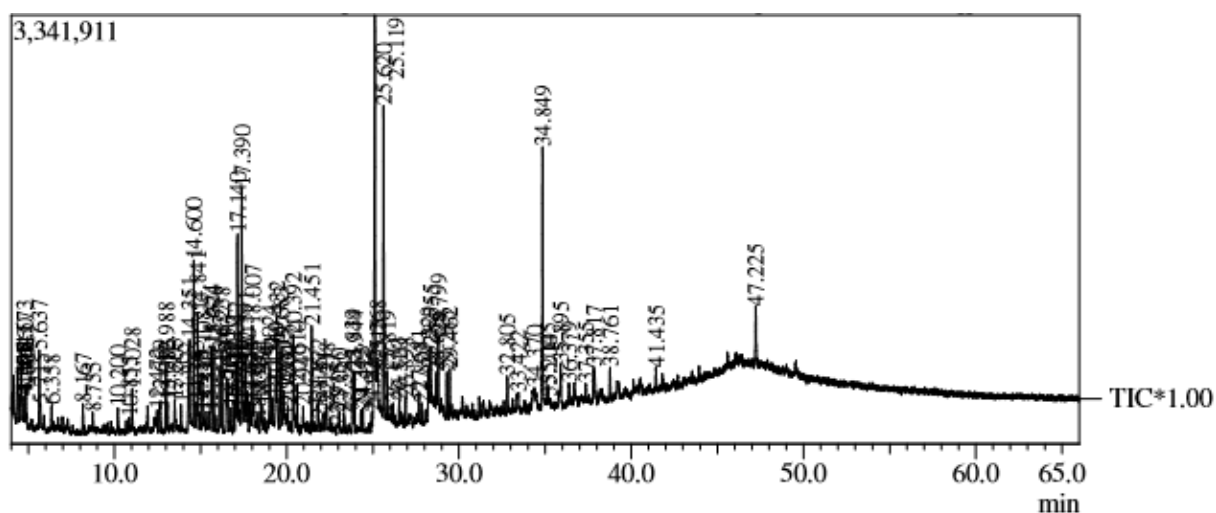


Figura 29 – Cromatograma obtido por CG para a fração hexânica do fungo 4.

Número de Pico	Componentes	TR	Área	Área %
1	D,L-2,3-butanodiol diacetato	4,045	376313	0,30
2	3-Octen-2-ol	4,141	862565	0,68
3	3-Ciclopropil carbonil oxi-pentadecano	4,360	1477309	1,17
4	1,3-Dimetilciclopentanol	4,505	714416	0,57
5	3-Metil-1,2-ciclopentanodiona	4,573	1829662	1,45
6	4,4-Dimetil-1-heptano	4,751	759660	0,60
7	Etil (±)-3-acetoxibutirato	4,861	528769	0,42
8	3-Metil-1,2-ciclopentanodiona	5,637	2149696	1,70
9	Ácido 4-acetilbutirico	5,715	353294	0,28
10	Ácido octanoico	6,358	362508	0,29
11	Nonano-1,3-diol acetato	8,167	601981	0,48
12	3-Metil-7-oxa-biciclo[4.1.0]heptano	8,735	394295	0,31
13	Deca-(2E,4E)-dienal	10,200	390844	0,31
14	3-Acetonil-2-pentil-ciclopentanona	10,855	165808	0,13
15	Éster metílico do ácido 2-oxo-hexadecanoico	11,028	780273	0,62
16	1,4,4-Trimetilciclo-hexa-2-en-1-ol	12,472	407002	0,32
17	1,5-Dimetil-naftaleno	12,669	166286	0,13
18	1,7-Dimetil-naftaleno	12,988	1441115	1,14
19	2,6-Dimetil-naftaleno	13,086	587914	0,46
20	2,3-Dimetil-naftaleno	13,503	499231	0,39
21	1,3-Dimetilnaftaleno	13,865	481136	0,38
22	Ácido 9-oxo-nonanoico	14,351	2522241	1,99
23	3-Metil-1,1-bifenil,	14,600	3455598	2,73
24	2,2-Dimetil-bifenil	14,765	381286	0,30
25	<i>para</i> -Fenil-tolueno	14,841	2616950	2,07
26	Não identificado	14,955	271594	0,21
27	1,4,5-Trimetil-naftaleno	15,108	1345187	1,06
28	1,4,6-Trimetil-naftaleno	15,337	302558	0,24
29	Não identificado	15,530	629245	0,50
30	1,6,7-Trimetil-naftaleno	15,624	1790802	1,42
31	Não identificado	15,774	1691017	1,34
32	2,3,6-Trimetil-naftaleno	16,127	1590255	1,26

33	Não identificado	16,238	1714944	1,36
34	Não identificado	16,491	730290	0,58
35	Não identificado	16,550	376980	1,45
36	2-Etil-1,1-bifenil	16,766	418200	0,33
37	Não identificado	16,920	544602	0,43
38	4,4-Dimetil-1,1-bifenil	17,042	1589979	1,26
39	3,4'-Dimetil-1,1-bifenil	17,140	4562321	3,61
40	4-Etil-bifenil	17,240	782612	0,62
41	3,3'-Dimetil-1,1-bifenil	17,390	5533567	4,38
42	2-Isopropil-naftaleno	17,519	676286	0,53
43	Não identificado	17,591	2048381	1,62
44	1,1-metileno bis[4-metil-di- <i>p</i> -toluil metano]-benzeno	17,740	1254578	0,99
45	1-Metil-7-(1-metil-etil)-naftaleno	17,850	616752	0,49
46	2,4'-Dimetil-1,1'-bifenil	18,007	2819000	2,23
47	Não identificado	18,095	638736	0,51
48	1,2,3,4-Tetrametil-naftaleno	18,310	263204	0,21
49	7-Etil-1,4-dimetil-azuleno	18,494	528762	0,42
50	1-Metil-7-(1-metil-etil)-naftaleno	18,564	322623	0,26
51	Não identificado	19,024	1079815	0,85
52	1-Metil-3-[(4-metil-fenil)metil]-benzeno	19,154	394072	0,31
53	Não identificado	19,369	949414	0,75
54	3,5-Dimetil-1-(metil-fenil)-benzeno	19,432	1862381	1,47
55	3-(1-metil-etil)-1,1'-bifenil	19,683	2599948	2,06
56	1-Metil-9H-fluoreno	19,815	997139	0,79
57	Não identificado	19,930	286651	0,23
58	Camazuleno	20,064	389400	0,31
59	Não identificado	20,392	1913280	1,51
60	Não identificado	20,610	853690	0,68
61	Ácido tetradecanoico	20,949	281174	0,22
62	Fenantreno	21,451	2441881	1,93
63	<i>n</i> -Pentadecano	21,822	591560	0,47
64	Não identificado	21,875	178832	0,14
65	2,3-Dimetil-9H-fluoreno	22,151	505684	0,40
66	Não identificado	22,318	723976	0,57
67	Éster bis (2-metilpropil) do ácido 1,2 benzenodicarboxílico	22,915	329063	0,26
68	Fenantrol	23,050	346993	0,27
69	Antrona	23,322	302081	0,24
70	9-Metil-antraceno	23,839	1714707	1,36
71	1-Metil-antraceno	23,944	1307776	1,03
72	1-Metil-fenantreno	24,312	445372	0,35
73	Não identificado	24,425	425302	0,34
74	Não identificado	24,936	269265	0,21
75	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico (ácido palmítico)	25,119	14104560	11,16
76	9,10-Antracenediona	25,268	1793290	1,42
77	Não identificado	25,315	550015	0,44
78	Éster etílico do ácido <i>n</i> -hexadecanoico	25,620	6144679	4,86
79	Não identificado	25,819	878192	0,69

80	2,5-Dimetil-fenantreno	26,170	354377	0,28
81	Não identificado	26,520	648449	0,51
82	Não identificado	26,898	537395	0,43
83	Não identificado	27,681	570302	0,45
84	2-Metil-9,10-antracenediona,	27,827	446960	0,35
85	Ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (ácido linoleico)	28,229	1071672	0,85
86	Ácido 9-hexadecenoico	28,355	1246108	0,99
87	Éster etílico do ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (éster etílico do ácido linoleico)	28,675	707791	0,56
88	Éster etílico do ácido 9-(E)-octadecenoico	28,799	1749526	1,38
89	Éster etílico do ácido octadecanoico (etil-estearato)	29,285	908983	0,72
90	<i>n</i> -Octadecano	29,462	880253	0,70
91	Não identificado	32,805	748834	0,59
92	Não identificado	33,422	919693	0,73
93	2-Metil-6-propil-dodecano	34,370	721151	0,57
94	Éster bis (2-etilexil) do ácido 1,2- benzenodicarboxílico	34,849	6049485	4,78
95	2,6,10-Trimetil-dodecano	35,145	453526	0,36
96	Não identificado	35,200	28459	0,02
97	<i>n</i> -Eicosano	35,895	615575	0,49
98	Não identificado	36,379	377753	0,30
99	2,6,10,14-Tetrametil-hexadecano,	37,355	273746	0,22
100	<i>n</i> -Triacontano	37,817	1209298	0,96
101	Não identificado	38,761	606878	0,48
102	Não identificado	41,435	472346	0,37
103	Estigmast-4-en-3-ona	47,225	1372640	1,09

Tabela 13 – Compostos químicos presentes na fração hexânica do fungo 4 identificados por CG-EM

Os resultados da análise da fração hexânica do fungo 5 estão representados no cromatograma (Figura 30) e na Tabela 14.

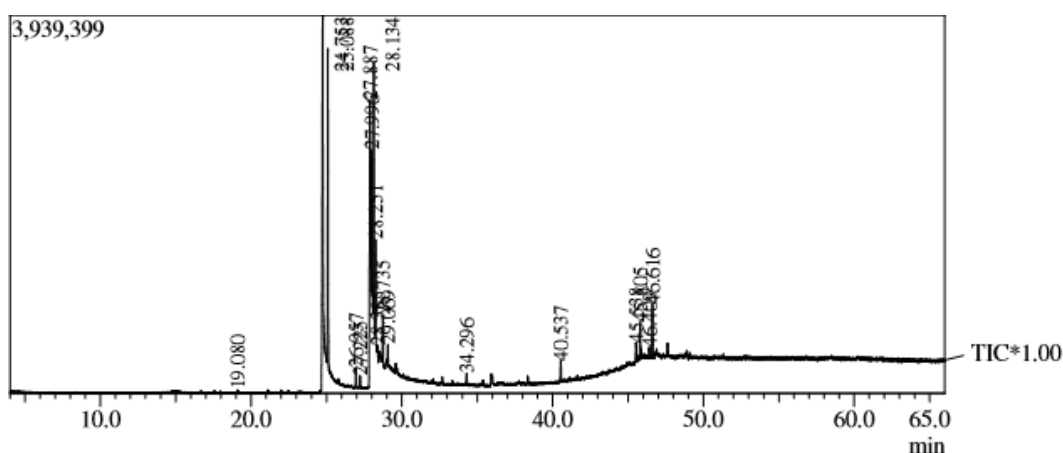


Figura 30 – Cromatograma obtido por CG para a fração hexânica do fungo 5.

Número de Pico	Componentes	TR	Área	Área %
1	2-Heptadecanone	19,080	108873	0,15
2	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico (ácido palmítico)	24,753	18107002	24,57
3	Éster etílico do ácido <i>n</i> -hexadecanoico	25,088	8591378	11,66
4	Não identificado	26,957	497156	0,67
5	Ácido tetradecanoico (ácido 2-mirístico)	27,225	283664	0,38
6	Ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (ácido linoleico)	27,887	14375228	19,51
7	Ácido (9Z)-octadecenoico (ácido oleico)	27,996	9681740	13,14
8	Éster etílico do ácido (9E)-octadecenoico	28,134	10466061	14,20
9	Éster metílico do ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico	28,251	4610274	6,26
10	Não identificado	28,385	737215	1,00
11	Cloreto de (9Z,12Z)-octadecadienoico	28,735	1225516	1,66
12	Ácido 1,2-benzeno dicarboxílico	29,069	403148	0,55
13	Di (<i>n</i> -octil) ftalato	34,296	249488	0,34
14	9(11)-Benzoato dehidroergosterol	40,537	631119	0,86
15	4,14-Dimetil-9,19-cicloergost-24(28)-en-3-ol	45,538	712417	0,97
16	Não identificado	45,805	999941	1,36
17	Manool	46,409	253529	0,34
18	Estigmast-4-en-3-ona	46,616	1752380	2,38

Tabela 14 – Compostos químicos presentes na fração hexânica do fungo 5 identificados por CG-EM

A análise em CG-EM da fração hexânica do fungo 4 mostrou 103 componentes, sendo os principais constituintes o ácido *n*-hexadecanoico (ácido palmítico) (11,16%), seguido do éster etílico do ácido *n*-hexadecanoico (4,86%) e o éster bis (2-etilexil) do ácido 1,2-benzenodicarboxílico (4,78%).

Para o fungo 5, a análise em CG-EM da fração hexânica revelou 18 componentes, tendo o ácido *n*-hexadecanoico (ácido palmítico) (24,57%) como constituinte principal, seguido do ácido (9Z,12Z) octadecadienoico (ácido linoleico) (19,51%), éster etílico do ácido (9E)-octadecenoico (14,20%), ácido (9Z)-octadecenoico (ácido oleico) (13,14%) e o éster etílico do ácido *n*-hexadecanoico com (11,66%).

Um alto teor de ácidos graxos está presente nas frações hexânicas dos fungos 4 (13,79%) e 5 (38,09%), principalmente. Destes ácidos graxos presentes, a maior proporção encontra-se no grupo do ácido monocarboxílico saturado, o ácido *n*-hexadecanoico, encontrado nos extratos hexânicos dos fungos 4 e 5, seguido dos ácidos monocarboxílicos insaturados, o ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico e o ácido (9Z)-octadecenoico (13,14), encontrados no extrato hexânico do fungo 5.

No estudo de Novy e colaboradores (2015)¹³¹ sobre a composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Euphrasia rostkoviana* Hayne, a análise feita por CG-EM revelou 70 componentes sendo que o mais abundante foi o ácido palmítico com 18,47%. Esse mesmo componente está presente nas frações hexânicas de ambos os fungos por nós

estudados, e em maior porcentagem no extrato do fungo 5 (24,57%), inclusive, com um percentual superior ao do óleo descrito na literatura. Quanto a atividade antimicrobiana do óleo, no estudo de Novy e colaboradores (2015)¹³¹, esta foi realizada frente a sete micro-organismos, sendo que o mesmo apresentou atividade para seis, sendo as bactérias Gram-positivas mais sensíveis do que as Gram-negativas. Mesmo o ácido palmítico sendo o principal constituinte neste estudo acima é difícil identificar os constituintes responsáveis pelo efeito antimicrobiano.

Moradali e colaboradores (2008)¹³² investigando a atividade antimicrobiana de ácidos graxos isolados de fungos constataram que o ácido palmítico é o principal composto de frações ativas frente às bactérias Gram-negativas, mas não para Gram-positivas. Esta informação corrobora a apresentada no nosso estudo, onde a atividade antimicrobiana realizada com a fração hexânica do fungo 4 inibiu dois micro-organismos dessa classe Gram-negativa (Tabela 9, página 53), e no cromatograma deste extrato está presente o ácido palmítico (11,16%). Quanto à fração hexânica do fungo 5, esta apresentou atividade antibacteriana somente de caráter bacteriostático para uma bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli*), apesar de apresentar uma maior concentração do ácido palmítico (24,57%). A maior atividade antimicrobiana apresentada pela fração hexânica do fungo 4, apesar de possuir menor porcentagem de ácido palmítico, pode ser explicada por um possível sinergismo deste ácido com o grande número de constituintes presentes na fração (103 compostos), ao contrário da fração hexânica do fungo 5 constituída por 18 compostos.

No estudo de Amiran e colaboradores (2015)¹³³ sobre identificação e atividade antimicrobiana de extrato hexânico de sementes de *Prunus armeniaca*, conhecida como damasco, foram identificados por CG-EM, 93% dos componentes. Os principais componentes desse extrato de hexano foram o ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (ácido linoleico), ácido *n*-hexadecanoico (ácido palmítico) e ácido octadecanoico (ácido esteárico). Dois desses compostos (ácido linoleico e palmítico) também estão presentes nas frações hexânicas dos fungos 4 e 5. O extrato hexânico de *P. armeniaca* foi testado contra quatro bactérias Gram-positivas, três Gram-negativas e três fungos. Os resultados mostraram que o extrato hexânico exibiu atividade antimicrobiana moderada contra todos os fungos testados sendo um deles *Candida albicans* e bactérias, com exceção de duas que se mostraram resistentes *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. É concebível que a propriedade antimicrobiana do extrato hexânico de *Prunus armeniaca* possa ser atribuída ao seu elevado teor de ácidos graxos, sendo que tal estudo corrobora com o deste trabalho.

No trabalho de Afieroho e colaboradores (2014)¹³⁴ com extrato hexânico de cogumelos (fungos) de *Lentinus tuber-regium*, o extrato dos escleródios desse cogumelo foi

analisado utilizando CG-EM, onde ácidos graxos: ácido *n*-hexadecanoico (ácido palmítico), ácido heptadecanoico, ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (ácido linoleico), ácido (9Z)-octadecenoico (ácido oleico), e ácido octadecanoico foram identificados, mostrando que *Lentinus tuber-regium* é uma promissora fonte de ácidos graxos mono e poli-insaturados.

5.8.2 Estudos das frações hexânicas dos fungos 9 e 11

Para as frações hexânicas dos fungos 9 e 11 também realizou-se uma análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), uma vez que estes dois fungos obtiveram melhores resultados para atividade citotóxica, conforme visto na Tabela 7 da página 51. Os resultados da análise da fração hexânica do fungo 9 estão apresentados na Figura 31 e na Tabela 15.

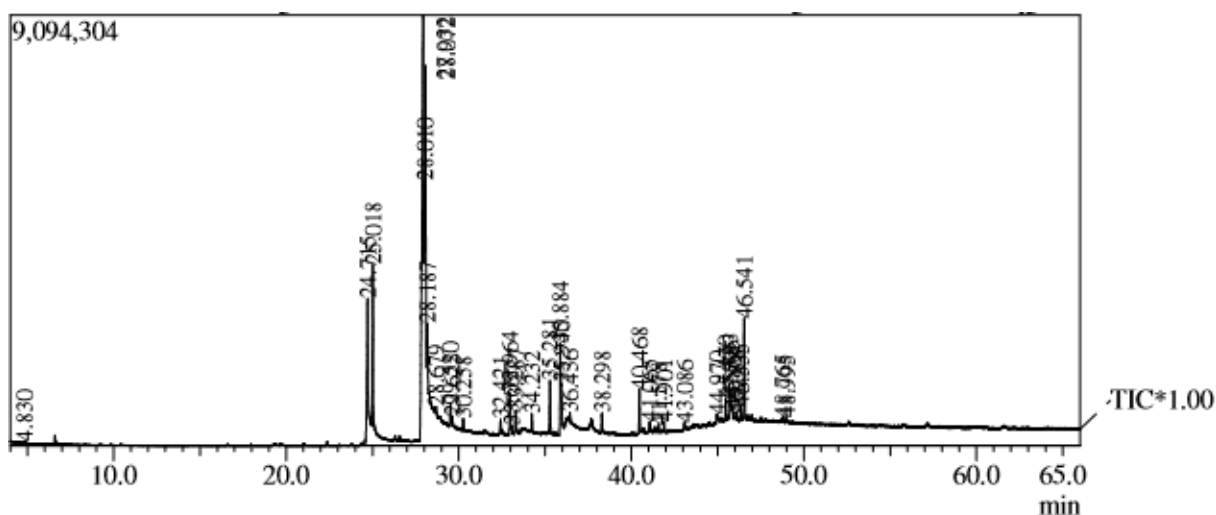


Figura 31 – Cromatograma obtido por CG para a fração hexânica do fungo 9.

Número de Pico	Componentes	TR	Área	Área %
1	Álcool fenetílico	4,830	134948	0,08
2	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico (ácido palmítico)	24,715	12403918	7,12
3	Éster etílico do ácido pentadecanoico (palmitato de etila)	25,018	8673388	4,98
4	Ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (ácido linoleico)	27,932	57384785	32,92
5	Ácido <i>cis</i> -13-docosenoico (ácido erúxico)	28,010	15947354	9,15
6	Éster etílico do ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (éster etílico do ácido linoleico)	28,072	26379972	15,13
7	Éster etílico do ácido (9E)-octadecenoico	28,187	9394960	5,39
8	Éster etílico do ácido octadecanoico (estearato de etila)	28,679	248621	0,14
9	Éster isopropílico do ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (linoleato de isopropila)	29,520	1368818	0,79
10	Não identificado	29,625	677994	0,39
11	Não identificado	30,258	640485	0,37

12	Não identificado	32,421	780745	0,45
13	Não identificado	32,964	2616205	1,50
14	Não identificado	33,057	530504	0,30
15	Não identificado	33,287	1667629	0,96
16	Ácido 1,2-benzeno dicarboxílico	34,232	1006725	0,58
17	Não identificado	35,281	3413490	1,96
18	Não identificado	35,884	6962720	3,99
19	Não identificado	35,940	3185167	1,83
20	Não identificado	36,436	446687	0,26
21	Não identificado	38,298	1082404	0,62
22	9,11-Dehidroergosterol benzoato	40,468	2861222	1,64
23	Não identificado	41,065	461879	0,26
24	Não identificado	41,578	385139	0,22
25	Ergosta-5,7,9(11),22-tetraen-3 β -ol	41,901	521240	0,30
26	Não identificado	43,086	468303	0,27
27	Não identificado	44,970	595397	0,34
28	Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ona	45,470	1666148	0,96
29	Não identificado	45,733	1569099	0,90
30	Lanosta-8,24-dien-3 β -ol	45,795	973287	0,56
31	Não identificado	45,865	940066	0,54
32	Não identificado	46,078	367369	0,21
33	Não identificado	46,335	919279	0,53
34	Não identificado	46,541	6945697	3,98
35	Não identificado	48,765	376980	0,22
36	4- α -metil-colesta-8,24-dien-3 β -ol	48,995	300377	0,17

Tabela 15 – Compostos químicos da fração hexânica do fungo 9 identificados por CG-EM

Os resultados da análise da fração hexânica do fungo 11 estão apresentados no cromatograma (Figura 32) e na Tabela 16.

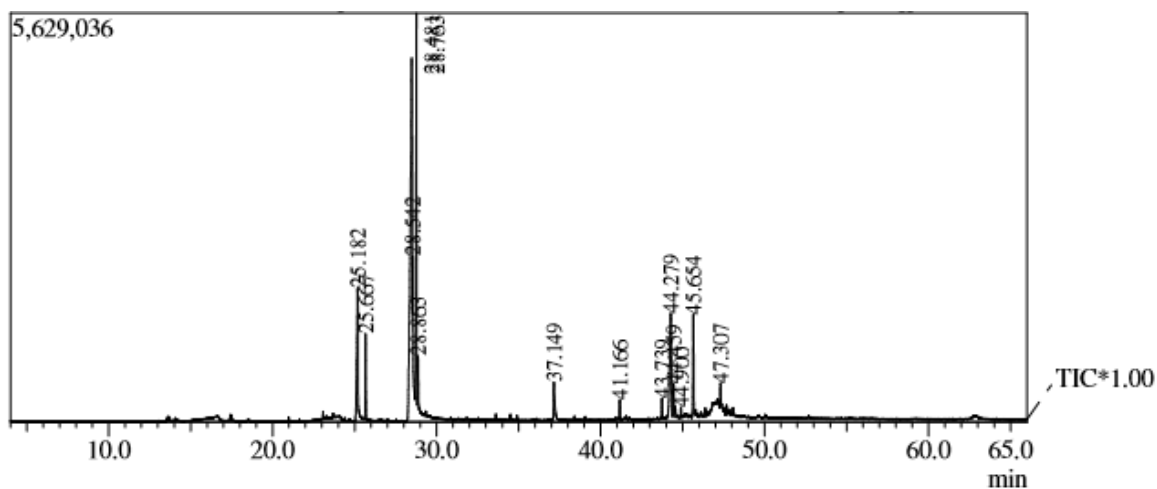


Figura 32 – Cromatograma obtido por CG para a fração hexânica do fungo 11.

Número de Pico	Componentes	TR	Área	Área %
1	Ácido <i>n</i> -hexadecanoico (ácido palmítico)	25,182	8712243	9,27
2	Éster etílico do ácido nonadecanoico	25,667	3004746	3,20
3	Éster metílico do ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (éster metílico do ácido linoleico)	28,481	36523683	38,87
4	Ácido (9Z)-octadecenoico (ácido oleico)	28,542	7832042	8,33
5	Ácido (9Z,12Z) octadecadienoico (ácido linoleico)	28,763	15510719	16,51
6	Não identificado	28,863	2243039	2,39
7	Cloreto do ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico	37,149	2223371	2,37
8	Não identificado	41,166	716411	0,76
9	Dehidroergosterol 3,5-dinitrobenzoato	43,739	801589	0,85
10	Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol	44,279	9604207	10,22
11	5,6-Dihidro-3 α -ergosterol	44,459	1139667	1,21
12	Não identificado	44,900	367234	0,39
13	β -sitosterol	45,654	4315315	4,59
14	Estigmast-4-en-3-ona	47,307	972705	1,04

Tabela 16 – Compostos químicos da fração hexânica do fungo 11 identificados por CG-EM

A análise por CG-EM da fração hexânica do fungo 9 revelou a presença de 36 componentes, sendo o (9Z,12Z)-ácido octadecadienoico o constituinte principal com 32,92%, seguido do éster etílico do ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (éster etílico do ácido linoleico) com 15,13%, ácido *cis*-13-docosenoico (ácido erúxico) com 9,15%, ácido *n*-hexadecanoico com 7,12% e éster etílico do ácido (9E)-octadecenoico com 5,39%. Já a análise por CG-EM do fungo 11 confirmou a presença de 14 componentes, sendo o éster metílico do ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (38,87%) seu constituinte principal, seguido do ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico (16,51%), ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (10,22%), ácido *n*-hexadecanoico (ácido palmítico) (9,27%) e por fim o ácido (9Z)-octadecenoico (ácido oleico) com 8,33%.

Assim como para as frações hexânicas dos fungos 4 e 5, as frações hexânicas dos fungos 9 e 11 apresentaram uma grande quantidade de ácidos graxos (49,19 % para o fungo 9 e 34,11% para o fungo 11). Há também uma predominância de éteres etílicos (25,64% para o fungo 9 e 3,20% para o fungo 11) e éteres metílicos de ácido graxos (38,87% para o fungo 11).

Em extratos apolares é comum a detecção de ácidos graxos, como retratado no trabalho de Leandro (2011),¹³⁵ onde vários extratos brutos de cascas e folhas de duas espécies (*Eperua duckeana* e *Eperua glabriflora*) foram investigados. O extrato hexânico oriundo das cascas de uma das espécies apresentou quatorze substâncias detectadas por CG-EM, sendo seis delas ácidos graxos: ácido *n*-hexadecanóico, ácido (9Z,12Z)-octadecadienóico, ácido (9Z)-octadecenoico, ácido octadecanóico, ácido tetracosanóico e ácido hexacosanóico.

Lee e colaboradores (2002)¹³⁶ isolaram alguns compostos a partir do extrato em cloreto de metileno das partes aéreas da planta *Cirsium setidens* Nakai, que pertence à família Asteraceae, e realizou teste de atividade citotóxica. Cinco terpenos, três ácidos graxos, dois esteróis e um monogalactosildiacil glicerol foram isolados, sendo os ácidos 9,12,15-octadecatrienoico, (9Z,12Z)-octadecadienoico e *n*-hexadecanoico os três ácidos graxos. De cada composto foi realizada a atividade citotóxica *in vitro* frente à cinco células tumorais humanas: A549 (adenocarcinoma de pulmão de células não pequenas), SK-OV-3 (células de carcinoma de ovário), SK-MEL-2 (melanoma), XF498 (células de câncer do SNC) e HCT15 (células de câncer de cólon). Os ácidos graxos apresentaram atividade citotóxica para todas as linhagens de células testadas.

No estudo de Harada e colaboradores (2002)¹³⁷ sobre a atividade citotóxica do óleo essencial de *Ceratonia siliqua* foi relatado que o ácido palmítico, um composto presente neste óleo, tem efeito citotóxico forte sobre células leucêmicas humanas. A citotoxicidade desse óleo essencial pode ser explicada pelo rico teor deste composto e/ou pelos efeitos sinérgicos desta substância química ativa com outros constituintes do óleo essencial. Este ácido também foi identificado nos extratos hexânicos dos fungos 9 (7,12%) e 11 (9,27%), e pode ser uma dos responsáveis pela moderada atividade antiproliferativa apresentada pelos extratos etanólicos brutos iniciais destes 2 fungos (item 5.6.1, página 50).

No estudo de Nascimento e colaboradores (2012)¹⁰⁵ o extrato em hexano do fungo *Fusarium oxysporum*, cultivado em meio sólido (arroz), foi submetido à análise por CG-EM, por apresentar alta atividade citotóxica para três linhagens de células tumorais humanas: MDA-MB435 (melanoma), HCT-8 (cólon) e SF295 (cérebro). Da análise por CG-EM, o principal componente do extrato hexânico foi uma mistura de ésteres metílicos de ácido graxos (éster metílico do ácido *n*-hexadecanoico, éster metílico do ácido (9Z)-octadecenoico e éster metílico do ácido (9Z,12Z)-octadecadienoico), representando 68,88% do extrato. Presumivelmente, esta mistura foi a responsável pela alta atividade citotóxica desse extrato.

No nosso estudo das frações hexânicas dos fungos 9 e 11, foi encontrada uma mistura de ácido palmítico e ésteres etílicos para o fungo 9 e de ácido palmítico, ésteres etílicos e metílicos para o fungo 11. Estas misturas podem ser as responsáveis pela atividade citotóxica moderada apresentada pelos extratos etanólicos brutos, proveniente de um possível sinergismo entre seus componentes.

5.8.3 Estudos das frações acetato de etila dos fungos 4, 9 e 11

As frações acetato de etila dos fungos 4, 9 e 11 foram escolhidas para serem trabalhadas e os motivos estão descritos a seguir. A fração acetato de etila do fungo 4 foi escolhida, quando comparada com a fração acetato de etila do fungo 5, por apresentar melhor resultado de atividade antibacteriana, conforme dados dispostos na letra b do item 5.6.2. Com relação à atividade antiproliferativa, a fração acetato de etila do fungo 9 não pôde ser comparada com a fração em acetato de etila do fungo 11, uma vez que os resultados para esta atividade biológica não foram obtidos até o presente momento. Desta maneira, optou-se em trabalhar as duas frações em acetato de etila dos fungos 9 e 11.

5.8.3.1 Estudo do Fungo 4

➤ Fracionamento da fração acetato de etila

Do fracionamento da fração acetato de etila do fungo 4 (massa usada = 0,5891 g), por cromatografia em coluna (CC), relação de 1:8 entre amostra e adsorvente (poliamida), foram obtidas 23 frações (Tabela 17).

Eluentes	Frações	Volume Total (mL)
Etanol / H ₂ O 1:1	1 – 16	45
Etanol / H ₂ O 8:2	17 – 20	22
Etanol	21 – 23	20

Tabela 17 – Frações recolhidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 4

Após análise, por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), as 23 frações foram reunidas em 11, conforme observado na Tabela 18.

Código da Fração	Frações Reunidas	Massa (g)	Código da Fração	Frações Reunidas	Massa (g)
F4-P1	1	0,0537	F4-P7	13 – 15	0,0034
F4-P2	2 – 4	0,3472	F4-P8	16	0,0002
F4-P3	5	0,0224	F4-P9	17 – 19	0,0010
F4-P4	6 – 8	0,0304	F4-P10	20 – 22	0,0248
F4-P5	9 – 10	0,0053	F4-P11	23	0,0007
F4-P6	11 – 12	0,0029			

Tabela 18 – Frações reunidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 4

- **Purificação das frações obtidas do fracionamento da fração acetato de etila**
- **Purificação da fração F4-P10**

A fração F4-P10 (0,0248 g) foi purificada por cromatografia de permeação em gel utilizando Sephadex LH-20 como fase sólida e etanol como eluente. Foram obtidas 22 frações, estas foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa, e depois foram reunidas em 5 sub-frações (Tabela 19).

Código das Sub-frações	Frações Reunidas	Massa (g)
F4-P10–Se 1	1 – 5	0,0097
F4-P10–Se 2	6 – 7	0,0023
F4-P10–Se 3	8 – 10	0,0020
F4-P10–Se 4	11 – 17	0,0020
F4-P10–Se 5	18 – 22	0,0004

Tabela 19 – Sub-frações reunidas da CC de Sephadex da fração F4-P10

Após essa purificação a sub-fração F4-P10–Se 4 (0,0020 g) foi submetida à análise por RMN.

5.8.3.2 Estudo do Fungo 9

- **Fracionamento da fração acetato de etila**

Do fracionamento de parte do extrato acetato de etila do fungo 9 (massa usada = 0,5623 g), por cromatografia em coluna (CC), relação de 1:8 entre amostra e adsorvente (poliamida), foram obtidas 30 frações (Tabela 20).

Eluentes	Frações	Volume Total (mL)
Etanol / H ₂ O 1:1	1 – 10	44
Etanol / H ₂ O 8:2	11 – 15	30
Etanol	16 – 20	30
Etanol / AcOEt 1:1	21 – 24	30
Etanol / AcOEt 2:8	25 – 28	30
AcOEt	29 – 30	20

Tabela 20 – Frações recolhidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 9

Após análise, por cromatografia em camada delgada comparativa, as 30 frações foram reunidas em 11 (Tabela 21).

Código da Fração	Frações Reunidas	Massa (g)	Código da Fração	Frações Reunidas	Massa (g)
F9-P1	1	0,0377	F9-P7	13 – 15	0,0266
F9-P2	2 – 3	0,3223	F9-P8	16 – 19	0,0035
F9-P3	4	0,0632	F9-P9	20	0,0004
F9-P4	5 – 9	0,0380	F9-P10	21 – 26	0,0013
F9-P5	10	0,0029	F9-P11	27 – 30	0,0003
F9-P6	11 – 12	0,0043			

Tabela 21 – Frações reunidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 9

➤ **Purificação das frações obtidas do fracionamento da fração acetato de etila**

As frações obtidas do fracionamento da fração acetato de etila do fungo 9 foram submetidas à cromatografias diversas, porém nenhuma substância foi isolada.

5.8.3.3 Estudo do Fungo 11

➤ **Fracionamento da fração acetato de etila**

Do fracionamento da fração acetato de etila do fungo 11 (massa usada = 0,9253 g), por cromatografia em coluna (CC), relação de 1:20 entre amostra e adsorvente (sílica), foram obtidas 75 frações (Tabela 22).

Eluentes	Frações	Volume Total (mL)
Hexano / AcOEt 6:4	1 – 2	18
Hexano / AcOEt 3:7	3 – 10	70
AcOEt	11 – 20	100
AcOEt / Etanol 8:2	21 – 28	100
AcOEt / Etanol 7:3	29 – 34	50
AcOEt / Etanol 1:1	35 – 46	100
AcOEt / Etanol 3:7	47 – 53	60
AcOEt / Etanol 2:8	54 – 62	70
Etanol	63 – 75	130

Tabela 22 – Frações recolhidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 11

Após análise, por cromatografia em camada delgada comparativa, as 75 frações foram reunidas em 16 (Tabela 23).

Código da Fração	Frações Reunidas	Massa (g)	Código da Fração	Frações Reunidas	Massa (g)
F11-A1	1 – 6	0,0003	F11-A9	37 – 42	0,0293
F11-A2	7 – 12	0,0014	F11-A10	43 – 46	0,0160
F11-A3	13 – 15	0,0019	F11-A11	47 – 48	0,0074
F11-A4	16 – 18	0,0013	F11-A12	49 – 53	0,0438
F11-A5	19 – 23	0,0020	F11-A13	54 – 55	0,0960
F11-A6	24	0,0036	F11-A14	56 – 59	0,1439
F11-A7	25	0,0045	F11-A15	60 – 65	0,0421
F11-A8	26 – 36	0,0200	F11-A16	66 – 75	0,0617

Tabela 23 – Frações reunidas da CC do extrato acetato de etila do fungo 11

➤ **Purificação das frações obtidas do fracionamento da fração acetato de etila**

Das frações obtidas do fracionamento da fração acetato de etila do fungo 11, a fração F11-A4 (0,0013 g) apresentou-se como mancha única quando submetida à CCDC, e devido a baixa massa obtida, foi analisada por CG-EM.

5.9 Determinação estrutural dos metabólitos secundários isolados

5.9.1 Determinação estrutural de F4-P10–Se4

Foram isolados 2 mg da sub-fração F4-P10–Se4, que apresentou aspecto sólido e coloração marrom. Realizada a CCD da referida substância com o etanol/acetato de etila (9:1, v/v) foi observada uma mancha única com fluorescência sob luz ultravioleta em 365 nm. Após revelação com o reagente vanilina sulfúrica, a mancha apresentou coloração marrom.

Na análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 33, página 77) foram observados sinais em:

- δ_{H} 1,90 singleto (3H) que, por estar em uma região de desblindagem, foi atribuído a uma metila ligada à anel aromático, mas está mais blindada que a metila correspondente ao sinal δ_{H} 2,17, podendo ser vizinha de grupo elétron doador;¹³⁸
- δ_{H} 2,17 singleto (3H) que, por estar em uma região de desblindagem, foi atribuído a uma metila ligada à anel aromático;¹³⁸

- δ_H 2,36 singlete (3H) que, por estar em uma região de desblindagem foi atribuído a uma metila ligada a carbonila ou próxima a carbono sp^2 ;¹³⁸
- δ_H 2,54 singlete (1H) que, por estar em uma região de desblindagem, foi atribuído a um grupo metínico ligada a carbonila;¹³⁸
- δ_H 3,78 singlete (3H) atribuído a hidrogênios de uma metila ligada à oxigênio de um grupo éster;¹³⁸
- δ_H 5,74 dublete (1H), $J_{meta} = 2,28$ Hz, foi atribuído a hidrogênio de anel aromático, e por estar blindado pode ser vizinho de grupo elétron doador;¹³⁸
- δ_H 6,24 dublete (1H), $J_{meta} = 2,04$ Hz, foi atribuído a hidrogênio de anel aromático, e por estar blindado pode ser vizinho de grupo elétron doador;¹³⁸
- δ_H 6,43 singlete (1H) atribuído a hidrogênio olefínico.¹³⁸

Por meio do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 34, página 78) verificou-se a presença de sinais correspondentes a 19 átomos de carbono, sendo dois associados à carbonilas (δ_C 167,74 e δ_C 194,04), 11 a carbono quaternário, incluindo os da carbonila, 4 metílicos (CH_3) e 4 metínicos (CH).¹³⁸

Os dados do espectro de RMN de ^{13}C juntamente com os dados do espectro de DEPT 135° (Figura 35, página 79) permitiram identificar quatro grupos metílicos (CH_3) com deslocamentos em: δ_C 12,09; δ_C 12,28, δ_C 19,35 e δ_C 51,68, bem como a presença de quatro grupos metínicos (CH) com deslocamentos em: δ_C 40,11; δ_C 97,68; δ_C 101,60 e δ_C 109,91. Através dos dados do espectro de DEPT 135°, ficou evidente a ausência de grupos metilenos (CH_2) na substância isolada.¹³⁸

Através do espectro de correlação de HSQC (Figura 36, página 80) foi possível atribuir as conexões entre carbonos e hidrogênios. Através da ampliação 1 do espectro de HSQC (Figura 37, página 81), foi possível observar os grupos metílicos (CH_3) por meio das seguintes correlações: δ_H 2,36 com δ_C 12,09; δ_H 1,90 com δ_C 12,28; δ_H 2,17 com δ_C 19,35 e δ_H 3,78 com δ_C 51,68. Esta ampliação também permite mostrar a correlação de um grupo metínico (CH): δ_H 2,54 com δ_C 40,11. A ampliação 2 do espectro de HSQC (Figura 38, página 82) permitiu verificar a correlação dos outros carbonos metínicos (CH): δ_H 5,74 com δ_C 97,68; δ_H 6,43 com δ_C 101,60 e δ_H 6,24 com δ_C 109,91.¹³⁸

A partir dos espectros de HMBC (Figura 39, página 83) e de suas ampliações (Figuras 40, 41 e 42, páginas 84, 85 e 86, respectivamente) foi possível determinar a correlação a longa distância entre hidrogênio e carbono, através de 3 e 4 ligações e estabelecer as conectividades. Na Figura 43 é apresentada a estrutura **34**, que correlaciona hidrogênio da metila em δ_H 3,78 (δ_C 51,68) com o carbono da carbonila de éster em δ_C 167,74. A estrutura **35** mostra outras correlações: δ_H 5,74 (δ_C 97,68) com o carbono δ_C 109,91; δ_H 6,24 (δ_C 109,91) com os

carbonos em δ_C 19,35 e δ_C 97,68. Ambos os átomos de hidrogênio δ_H 5,74 e δ_H 6,24 possuem uma constante de acoplamento de $J = 2$ Hz, indicando que estes hidrogênios estão em posição meta no anel. E, hidrogênios da metila em δ_H 2,17 (δ_C 19,35) correlacionam com o carbono em δ_C 109,91. Na estrutura **36** estão destacadas: as correlações do hidrogênio em δ_H 2,36 (δ_C 12,09) com os carbonos em δ_C 40,11 e δ_C 194,04; a correlação do hidrogênio de δ_H 2,54 (δ_C 40,11) com o carbono em δ_C 12,09; e a correlação do hidrogênio de δ_H 6,43 (δ_C 101,60) com o carbono da carbonila de cetona em δ_C 194,04.¹³⁸ Essas correlações estão representadas na Figura 43.

Para os outros carbonos quaternários têm-se as seguintes correlações:

- carbono δ_C 115,78 com os hidrogênios em δ_H 2,17; δ_H 5,74 e δ_H 6,24;
- carbono δ_C 121,14 com os hidrogênios em δ_H 1,90 e δ_H 6,43;
- carbono δ_C 129,02 com o hidrogênio em δ_H 1,90;
- carbono δ_C 133,85 com os hidrogênios em δ_H 1,90 e δ_H 6,43;
- carbono δ_C 137,88 com o hidrogênio em δ_H 2,17;
- carbono δ_C 151,93 com os hidrogênios em δ_H 1,90 e δ_H 6,43;
- carbono δ_C 156,60 com o hidrogênio em δ_H 5,74;
- carbono δ_C 159,08 com o hidrogênio em δ_H 5,74.

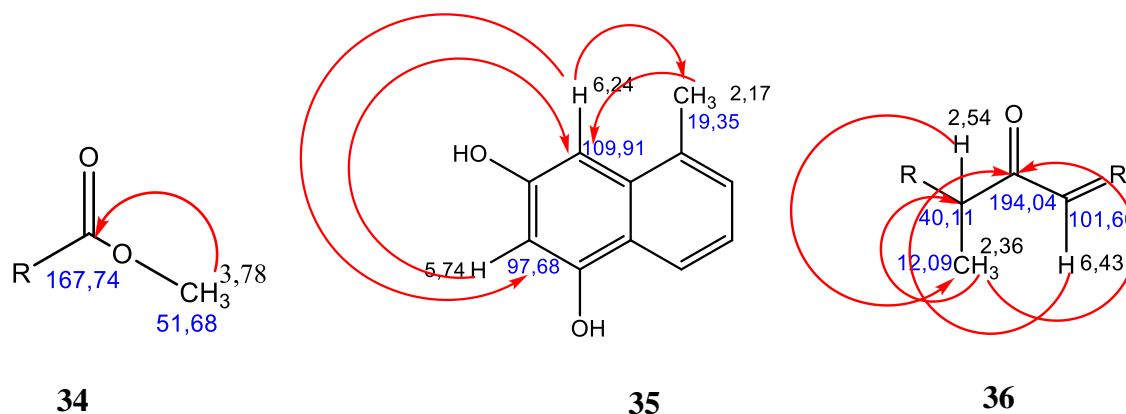


Figura 43 – Acoplamentos observados no espectro de correlação HMBC da substância F4-P10–Se4

Os deslocamentos químicos e correlações dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , HSQC e HMBC estão listados na Tabela 24.

Posição	δ_H	δ_C (HSQC)	HMBC
1	2,36 <i>s</i> (3H)	12,09	---
2	1,90 <i>s</i> (3H)	12,28	---
3	2,17 <i>s</i> (3H)	19,35	H-6,24
4	2,54 <i>s</i> (1H)	40,11	H-2,36
5	3,78 <i>s</i> (3H)	51,68	---
6	5,74 <i>d</i> (2,28) (1H)	97,68	H-6,24
7	6,43 <i>s</i> (1H)	101,60	---
8	6,24 <i>d</i> (2,04) (1H)	109,91	H-2,17 e H-5,74
9	---	115,78	H-2,17; H-5,74 e H-6,24
10	---	121,14	H-1,90 e H-6,43
11	---	129,02	H-1,90
12	---	133,85	H-1,90 e H-6,43
13	---	137,88	H-2,17
14	---	151,93	H-1,90 e H-6,43
15	---	156,60	H-5,74
16	---	159,08	H-5,74
17	---	167,74	H-3,78
18	---	180,85	---
19	---	194,04	H-2,36 e H-6,43

Tabela 24 – Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C e de correlações da substância F4-P10–Se 4 (400 e 100 MHz, DMSO- d_6 , δ (ppm), multiplicidade, J = Hz)

Com os dados dos espectros unidimensionais de RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT 135° e os bidimensionais de correlação (HSQC e HMBC) foi possível atribuir deslocamentos químicos correspondentes a cada carbono e hidrogênio, o que possibilitou propor a seguinte estrutura para a substância F4-P10–Se4 (**37**) (Figura 44), um derivado do naftaleno: (*E*)-metil-2-hidróxi-5-(3,6,8-triidróxi-1,2-dimetilnaftalen-4-il)-4-oxo-hex-2-enoato.

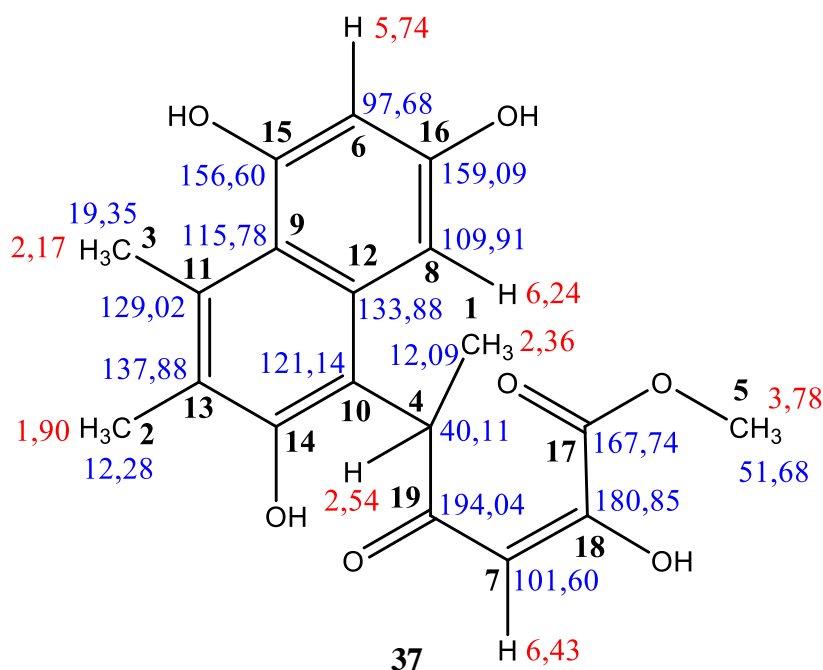


Figura 44 – Estrutura proposta para a substância F4-P10–Se4.

A estrutura proposta não é definitiva, uma vez que o espectro de RMN de ¹³C encontra-se com muitos ruídos, dificultando a análise correta de quantos e quais são os carbonos que pertencem à estrutura.

Esta amostra será submetida à uma análise por ionização por “*electrospray*” (HR-ESI-MS) para obtenção do espectro de massas de alta resolução. O equipamento usado será um espectrofotômetro UltrOTOFTM Bruker-Daltonics (Billerica, USA), operando no modo positivo ou negativo. Esta técnica permitirá determinar a fórmula molecular para F4-P10–Se4, através do íon pseudomolecular, o que proporcionará resultados satisfatórios para confirmar a estrutura proposta.

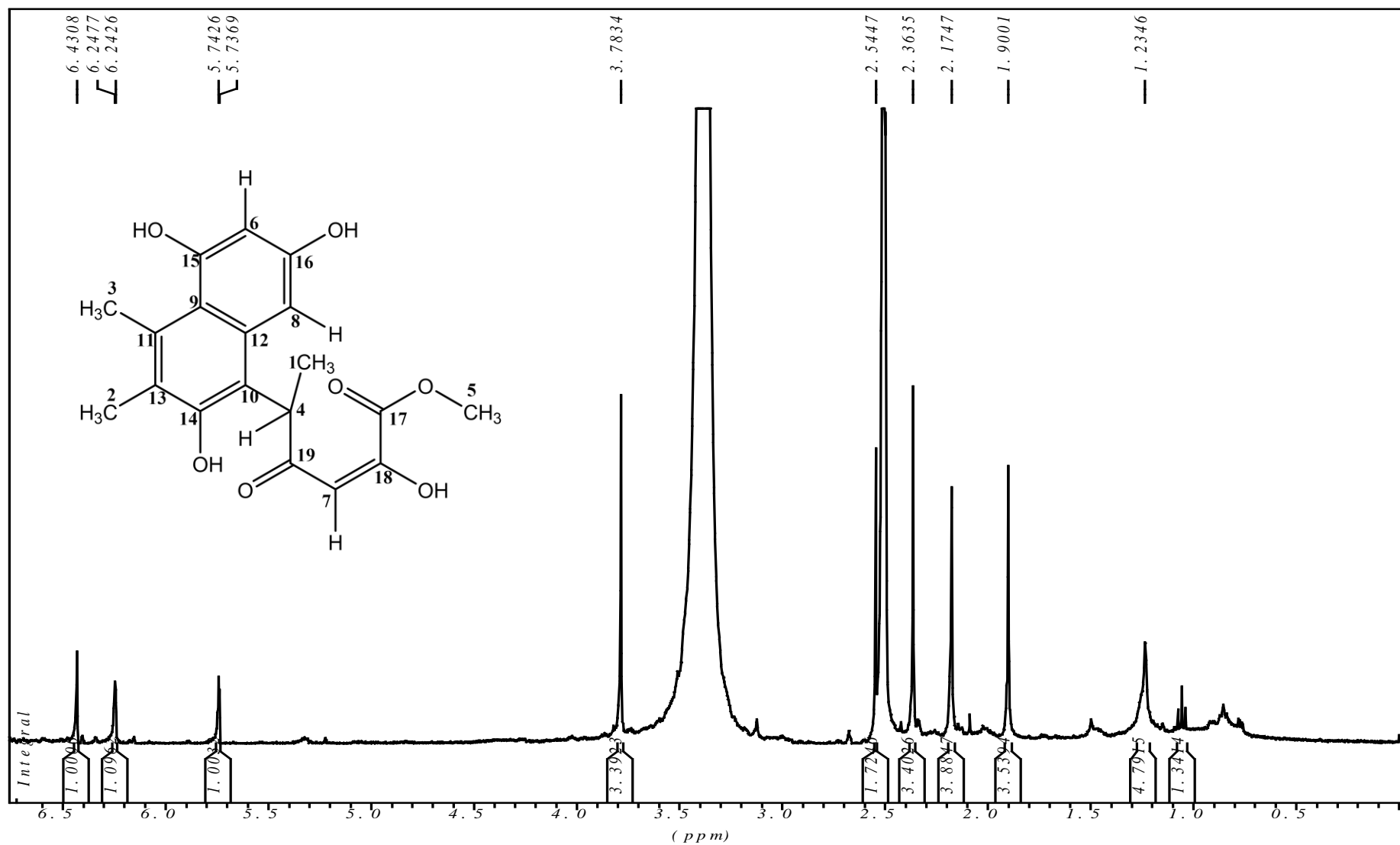


Figura 33 – Espectro de RMN de ¹H de F4-P10–Se 4 (400 MHz , DMSO-d₆).

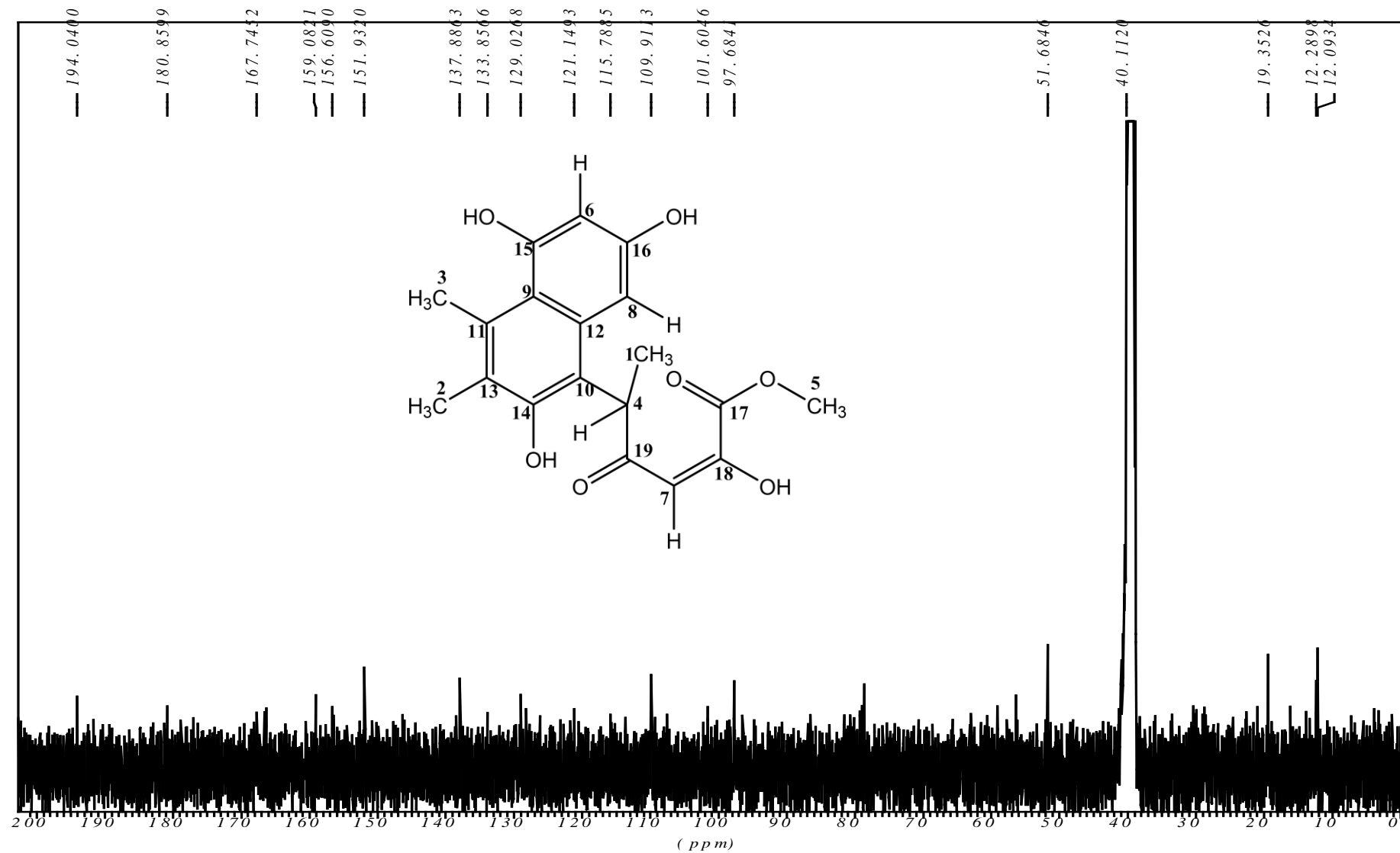


Figura 34 – Espectro de RMN de ^{13}C de F4-P10-Se 4 (100 MHz , DMSO- d_6).

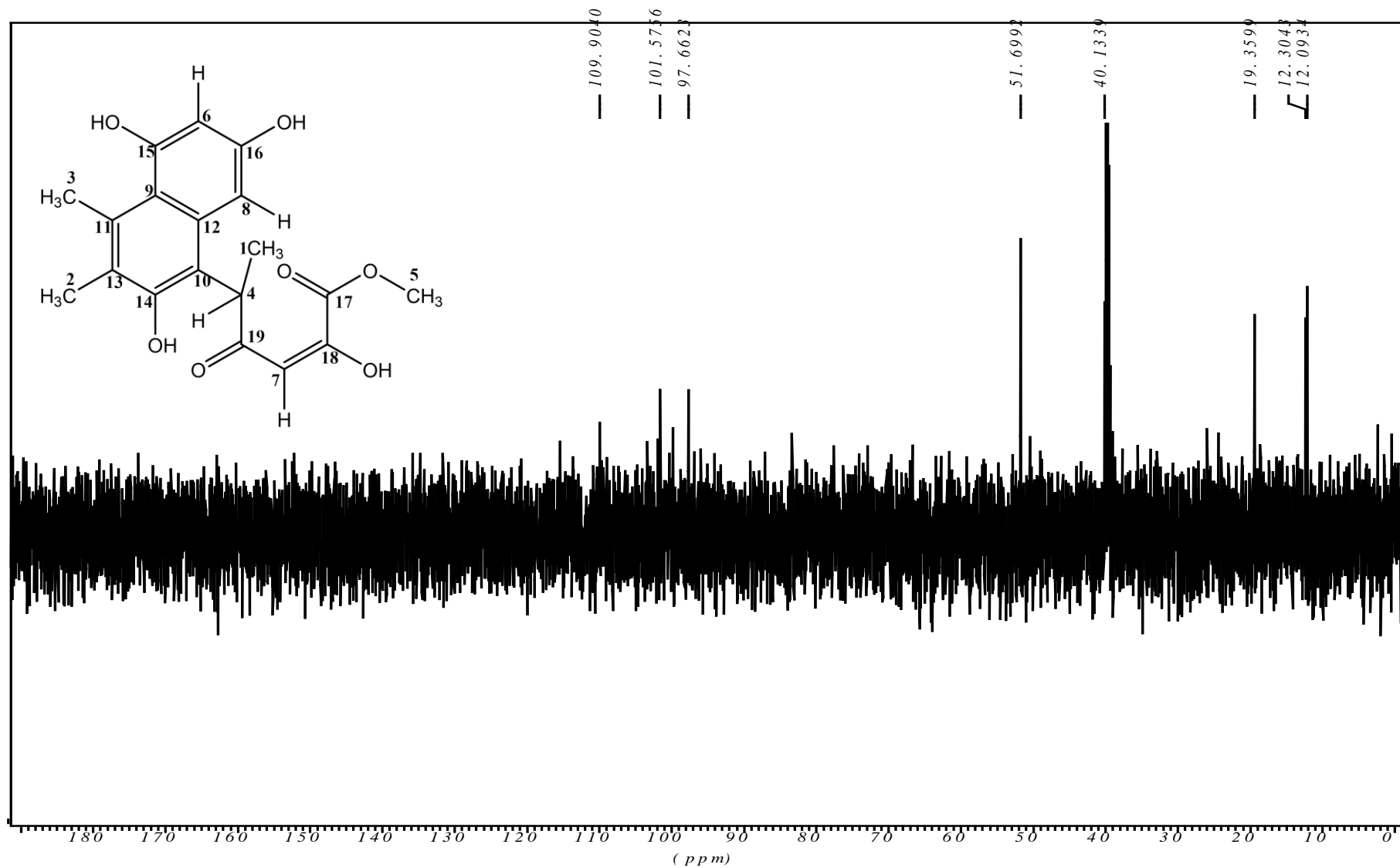


Figura 35 – Espectro de RMN de ^{13}C , DEPT 135°, de F4-P10–Se 4 (100 MHz , DMSO- d_6).

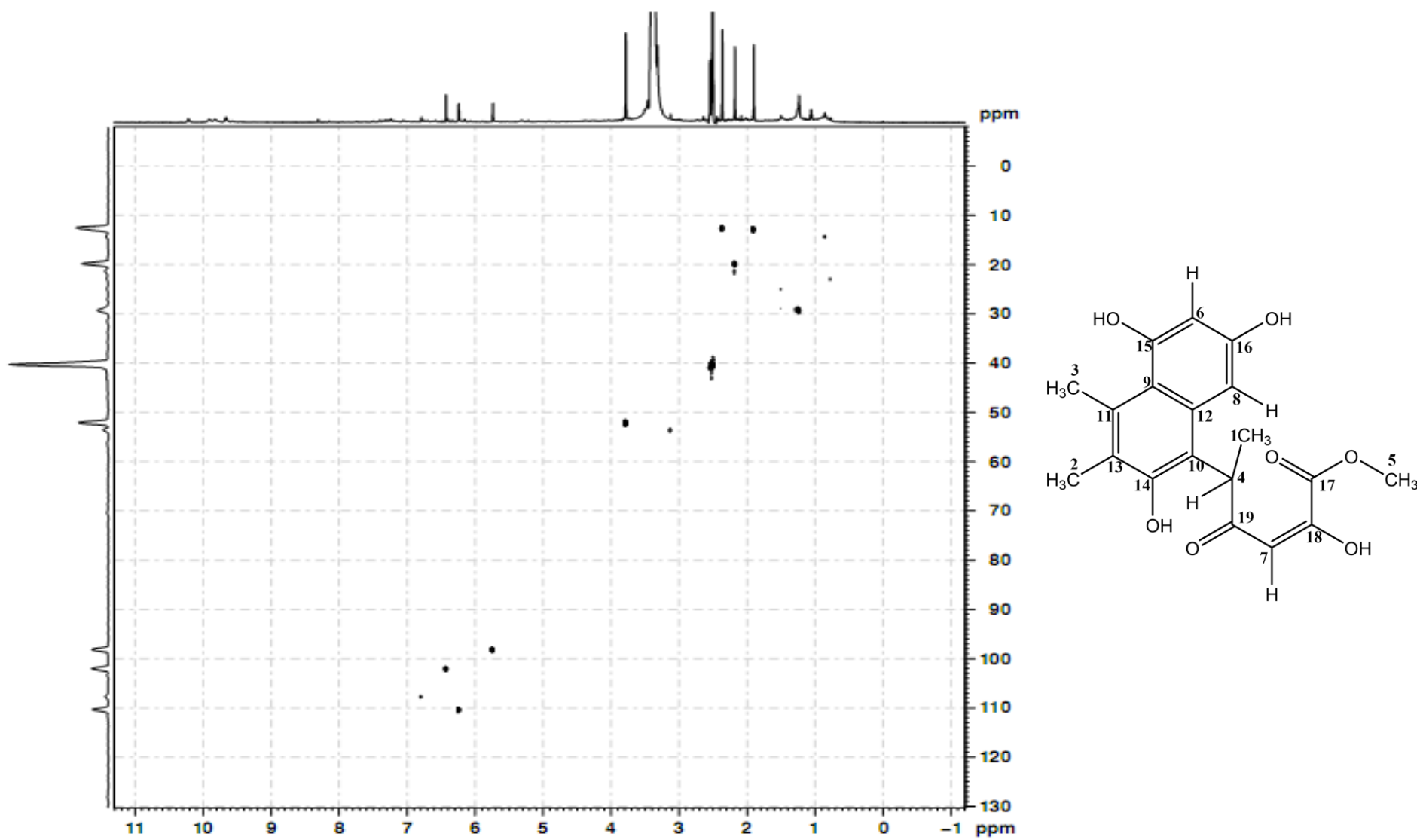


Figura 36– Espectro de correlação HSQC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz , DMSO- d_6).

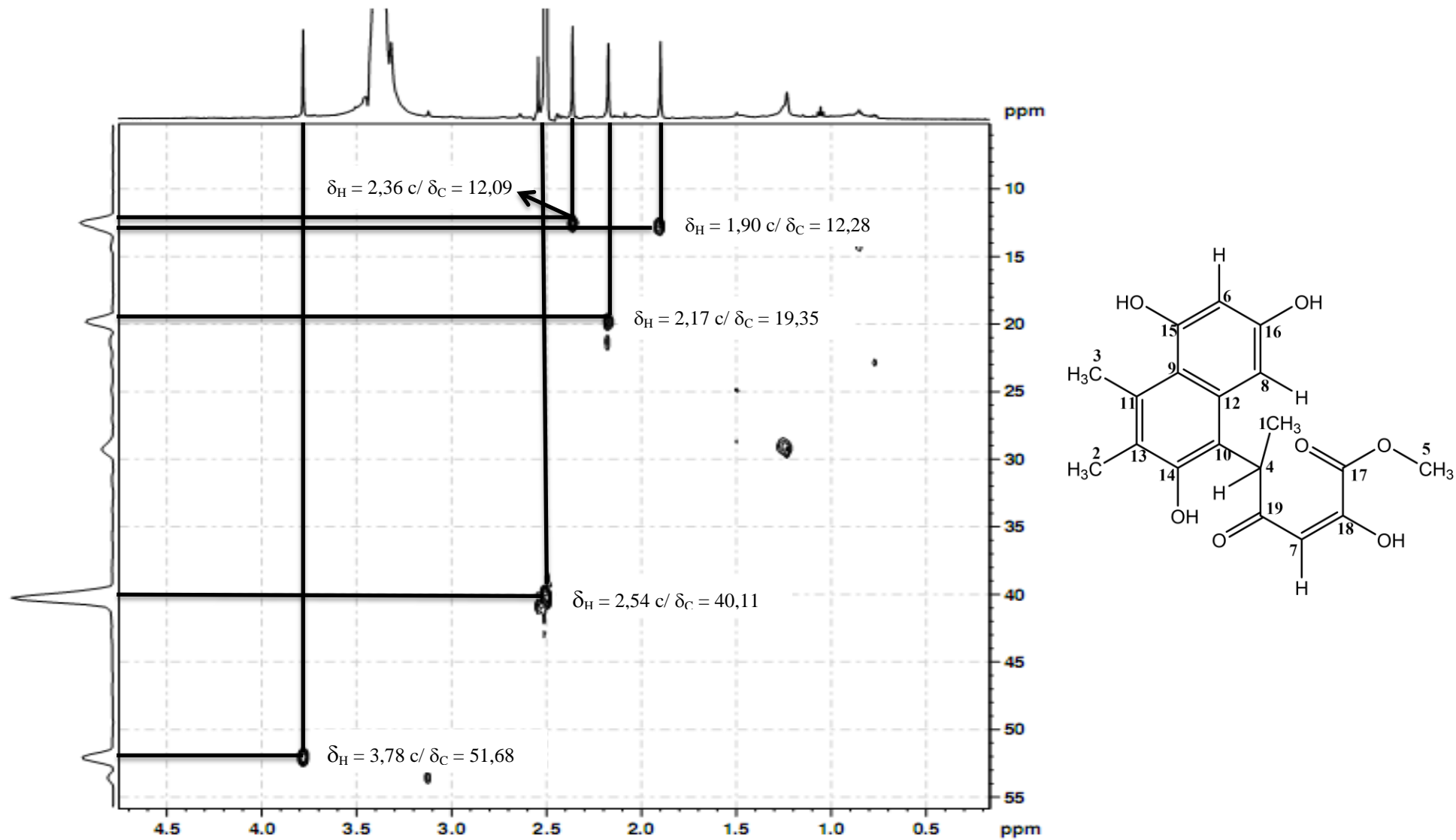


Figura 37 – Espectro de correlação HSQC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz , DMSO-d₆) - Ampliação 1.

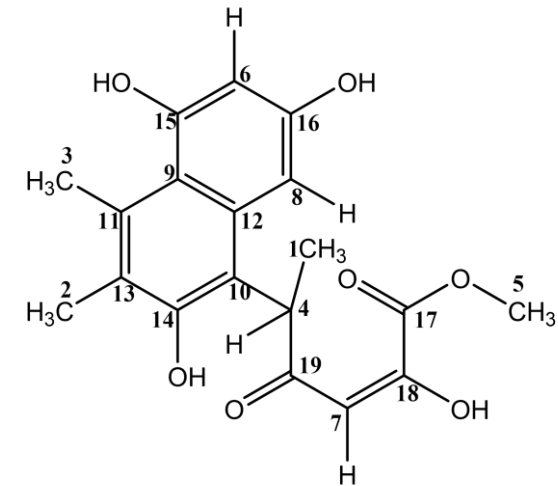
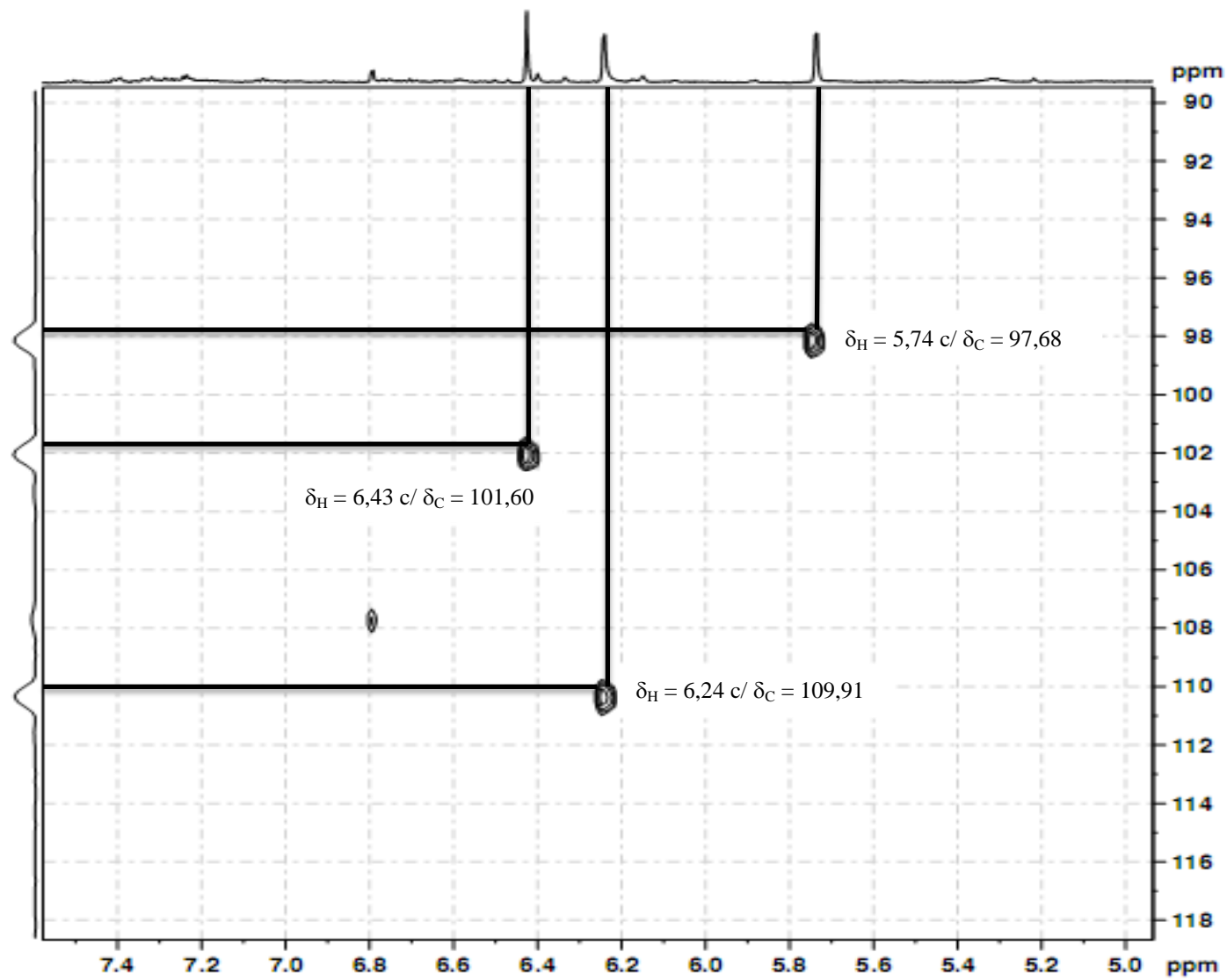


Figura 38 – Espectro de correlação HSQC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz , DMSO-d₆) - Ampliação 2.

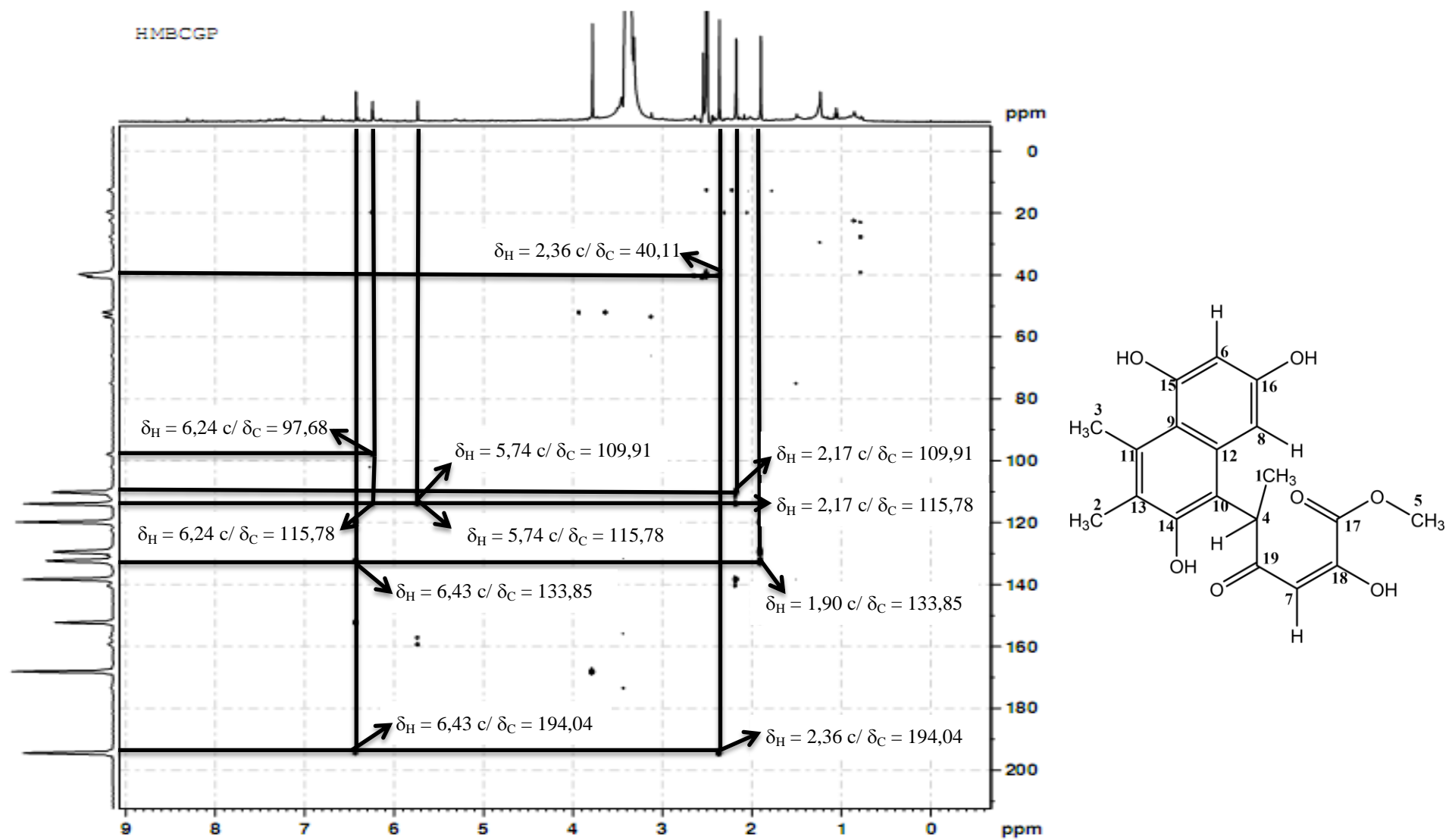


Figura 39 – Espectro de correlação HMBC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz , DMSO-d₆).

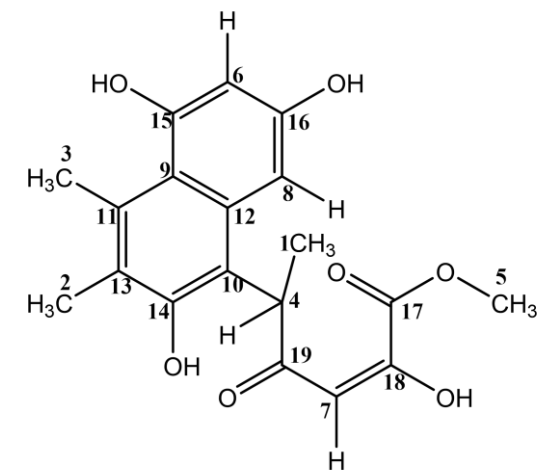
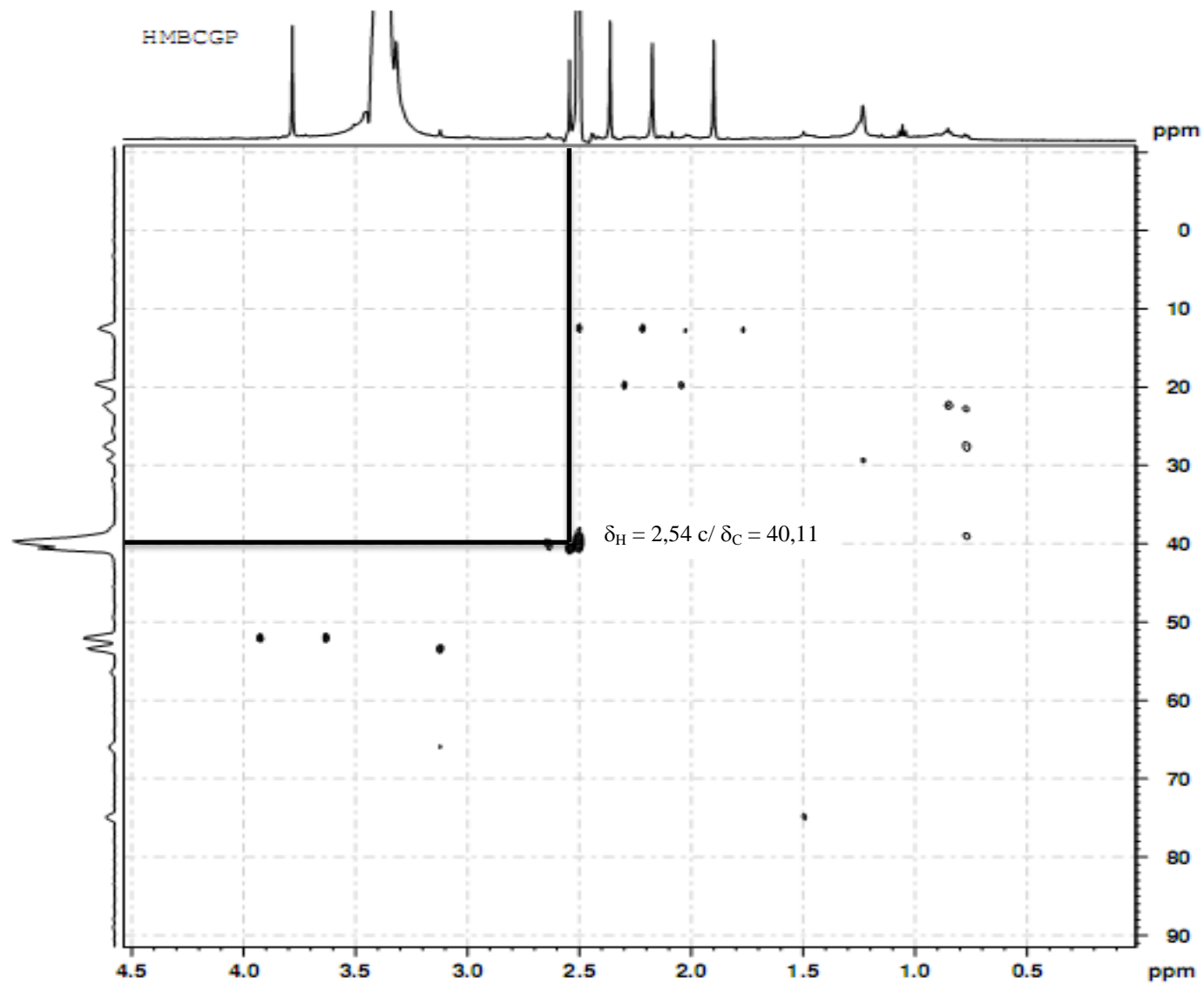


Figura 40 – Espectro de correlação HMBC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz , DMSO-d₆) - Ampliação 1.

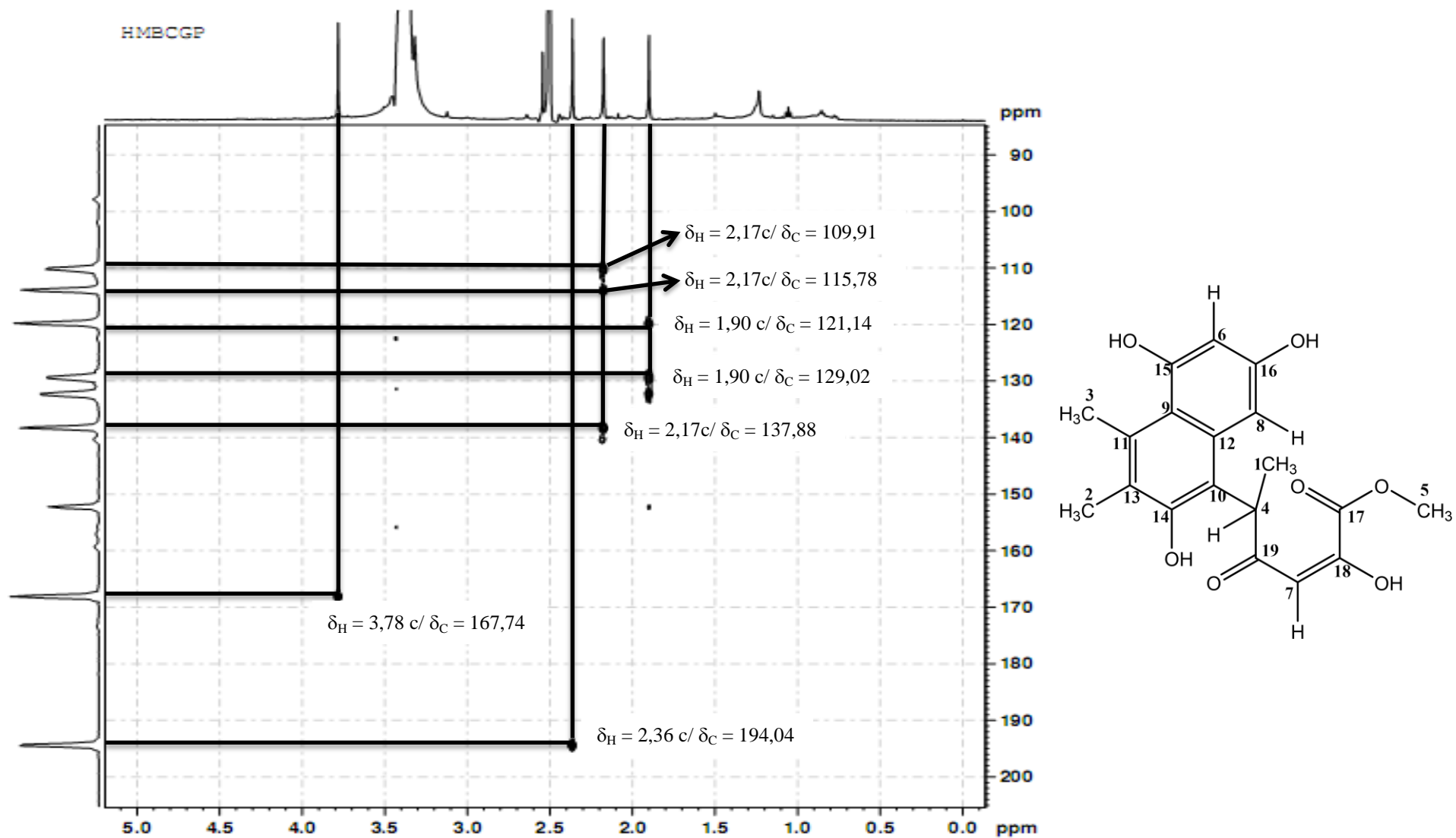


Figura 41 – Espectro de correlação HMBC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz , DMSO-d₆) - Ampliação 2.

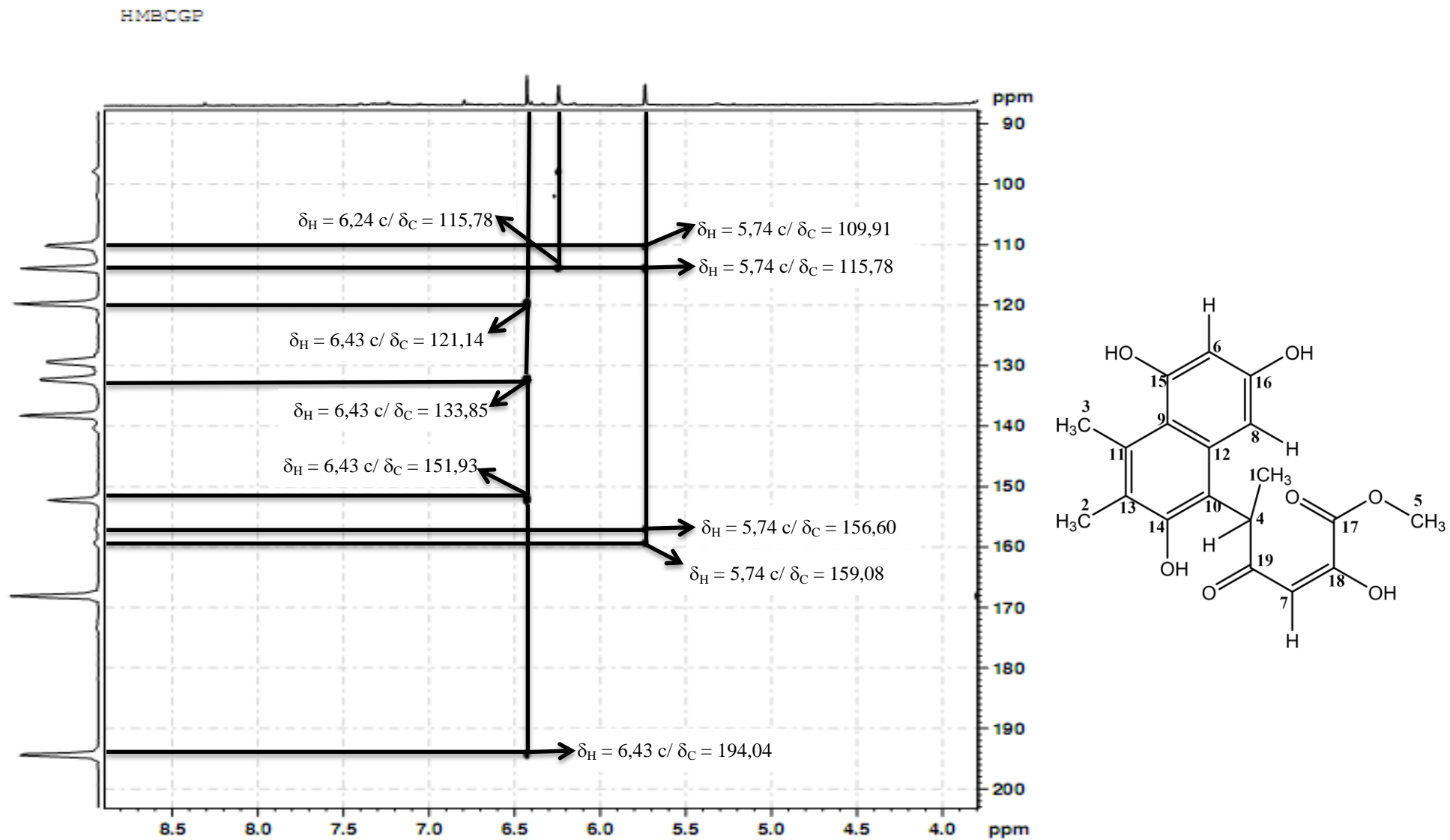


Figura 42 – Espectro de correlação HMBC de F4-P10–Se 4 (500 e 125 MHz , DMSO-d₆) - Ampliação 3.

5.9.2 Determinação estrutural de F11-A4

A fração F11-A4 (0,0013 g), possui mancha única quando submetida à CCDC, e foi analisada por CG-EM. Nesta análise, foi verificado que não se tratava de uma substância pura, mas sim de uma mistura, (Figura 45 e Tabela 25).

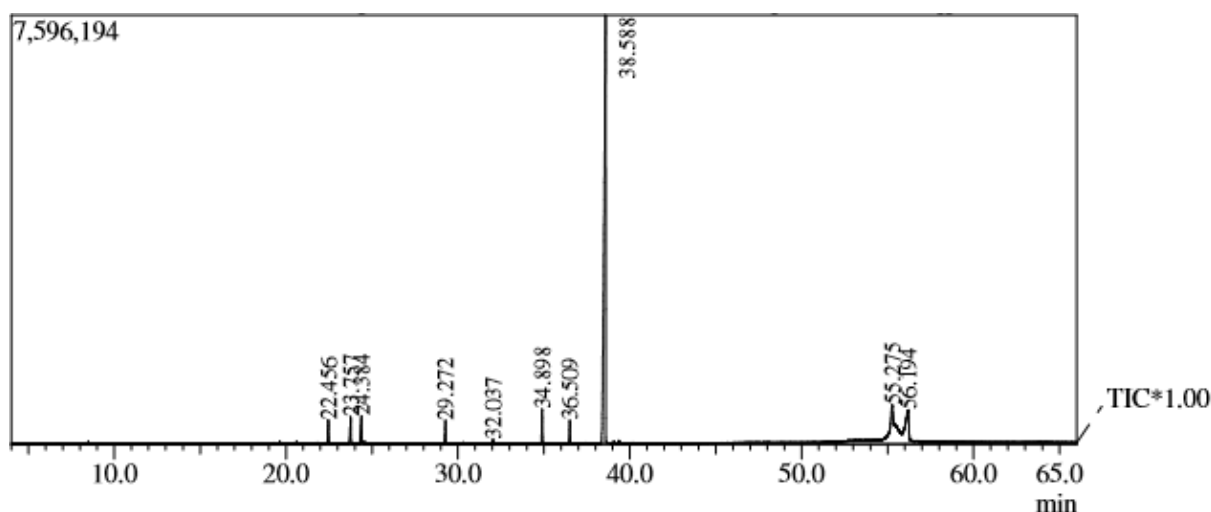


Figura 45 – Cromatograma obtido por CG para a fração F11-A4.

Número de Pico	Componentes	TR	Área	Área %
1	Éster sec-octila do ácido acético (Acetato de octila)	22,456	1251432	1,95
2	Trimetil nonanal	23,757	1479407	2,30
3	5,6-Dimetildecano	24,384	1887704	2,94
4	Não identificado	29,272	1184326	1,84
5	Éster de dioctilo do ácido 1,2-benzenodicarboxílico	32,037	170941	0,27
6	Não identificado	34,898	1591876	2,48
7	Não identificado	36,509	989447	1,54
8	Griseofulvina	38,588	46817507	72,89
9	3 β -Ergosta-5,7-dien-3-ol	55,275	3300836	5,14
10	Pregnane-5,16-dien-3 β ,9 α -diol-20-ona	56,194	5555019	8,65

Tabela 25 – Compostos químicos da fração F11-A4 identificados por CG-EM

O componente majoritário da fração F11-A4 é a griseofulvina com um percentual de 72,89% (Tabela 25). A griseofulvina (**38**) (Figura 46) é um fármaco antifúngico importante representado por um benzofurano e insolúvel em água. Esse antifúngico oral clássico foi isolado pela primeira vez como um produto metabólico de uma cultura de *Penicillium griseofulvum* em 1939 por Oxford e colaboradores. É ativo contra os fungos *Microsporium*, *Trichophyton* e *Epidermophyton floccosum*, causadores da *Tinea corporis* (infecção fúngica do corpo).¹³⁹

Esse metabólito secundário já foi isolado de outros fungos endofíticos, como por exemplo de *Xylaria* sp, associado à planta *Palicourea marcgravii*.¹⁴⁰

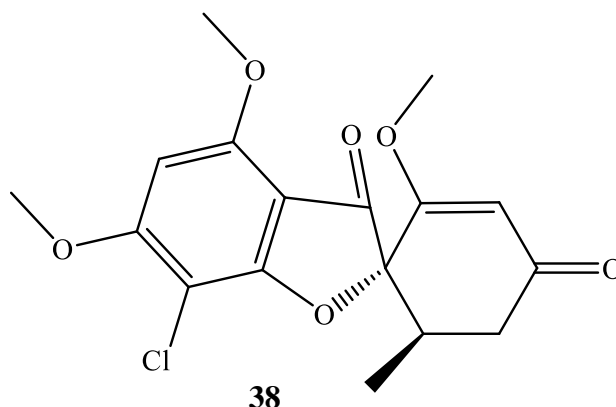


Figura 46 – Estrutura química da griseofulvina.

A griseofulvina, além de ser utilizada para o tratamento de infecções fúngicas em seres humanos e animais, também é um agente antiproliferativo, devido à sua baixa toxicidade e eficácia na inibição da proliferação de células de cancro.¹⁴¹

Liéby-Muller e colaboradores (2015)¹⁴¹ trabalharam com vários análogos de griseofulvina através de um processo de síntese. As suas atividades antiproliferativas foram avaliadas em células HCC1937, uma linhagem de câncer de mama resistente, bem como em células SCC114, uma linhagem celular humana dependente de agrupamento centrosomal. Através da introdução de grupos sulfonas e sulfóxidos, formando os análogos da griseofulvina, foram evidenciadas propriedades citotóxicas contra as células com amplificação centrosomal e também propriedades citotóxicas inesperadas contra uma linhagem de células intrinsecamente resistentes a antimitótico.

Ho e colaboradores (2001)¹⁴² descreveram em seu estudo com ratos atímicos portadores de xenoenxertos de tumor humano, que a griseofulvina inibe sinergicamente o crescimento do tumor em combinação com nocodazol, sugerindo que a griseofulvina pode ser valiosa em combinação com outros fármacos para o tratamento de câncer.

Desta maneira, pode-se supor que a griseofulvina seja uma das responsáveis pela atividade antiproliferativa apresentada pelo extrato etanólico do fungo 11 (item 5.6.1, página 50).

Muitos estudos devem ser feitos com o intuito de ampliar o horizonte a respeito dos fungos endofíticos, seus metabólitos secundários e como os mesmos podem contribuir para a geração de novos medicamentos.

5.10 Obtenção e caracterização do óleo essencial das folhas de *E. erythropappus*

Na Figura 47 é apresentada a foto do primeiro processo de obtenção do óleo essencial das folhas de *E. erythropappus*, utilizando-se o aparelho de Clevenger. O tempo de extração foi de 5 horas.

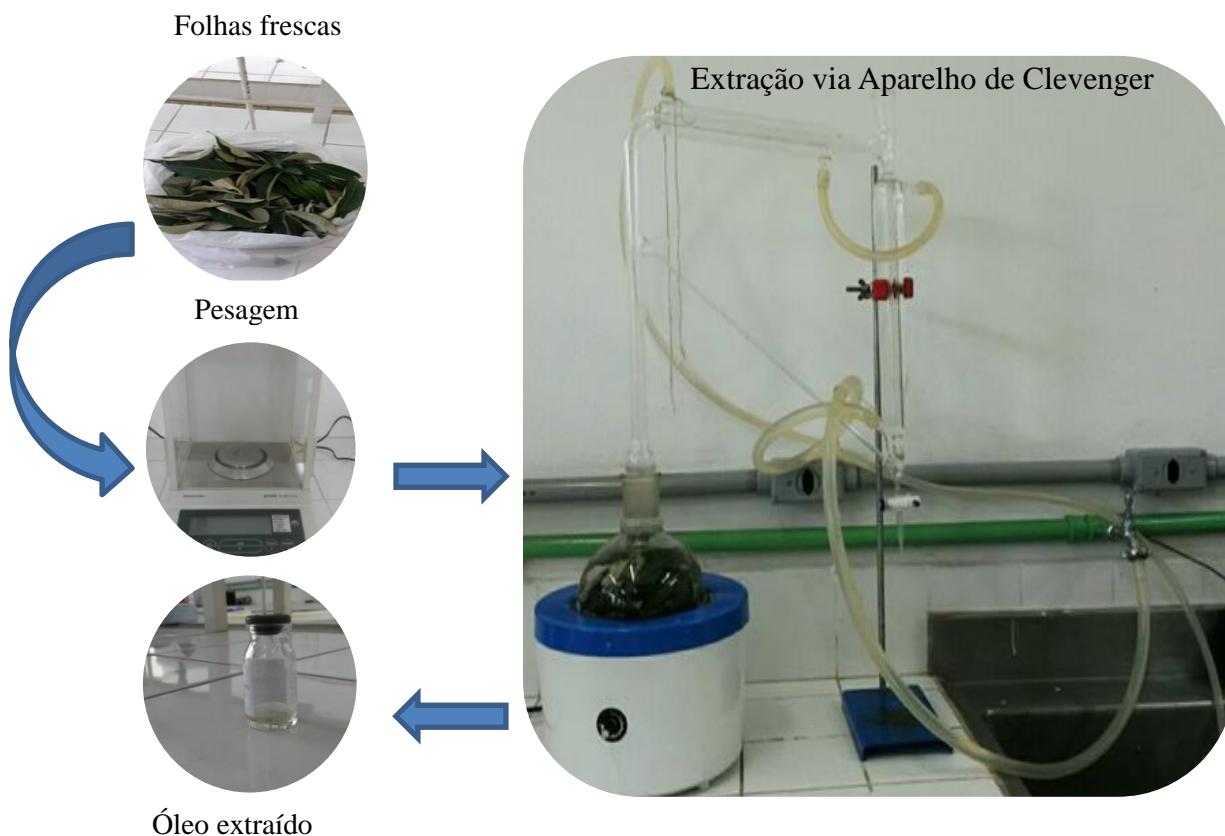


Figura 47 – Fotos do processo de obtenção do óleo essencial através do aparelho de Clevenger.

O seu óleo essencial apresentou-se como um líquido viscoso, de cor amarelo claro e com forte cheiro característico,

O rendimento do óleo essencial utilizando-se o aparelho de Clevenger foi de 0,049% (m/m).

Na Figura 48 é apresentada a foto do segundo processo para obtenção do óleo essencial das folhas de *E. erythropappus*, utilizando o hidrodestilador (Linax). O tempo de extração foi de 4 horas.



Figura 48 – Foto do Hidrodestilador (Linax), usado na extração do óleo essencial.

O rendimento do óleo essencial fazendo-se uso do hidrodestilador foi de 0,12%.

O óleo extraído no primeiro processo, utilizando-se o aparelho de Clevenger foi usado para caracterização de seus constituintes via CG-EM (Figura 49 e Tabela 26).

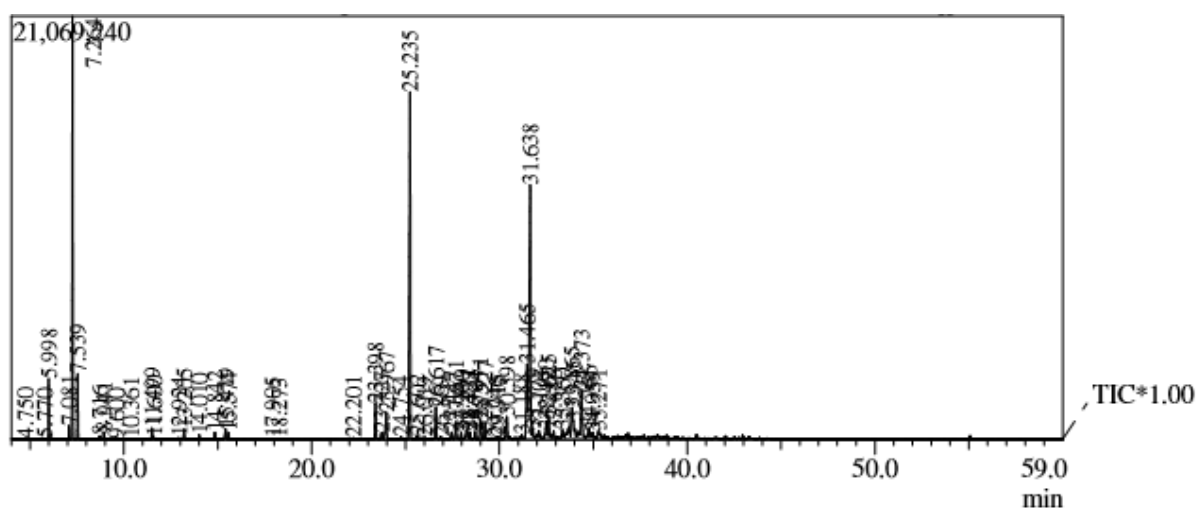


Figura 49 – Cromatograma obtido por CG do óleo essencial das folhas de *E. erythropappus*.

Composto	IK ^a	IK ^b	%	Composto	IK ^a	IK ^b	%
N.i.*	N.a.**	N.a.	0,02	α -Humuleno	1454	1454	1,93
α -Thujeno	925	930	0,03	allo-Aromadendreno	1460	1460	0,19
α -Pineno	933	939	2,12	γ -Muuroleno	1474	1479	0,44
Sabineno	971	975	0,54	Germacreno D	1480	1481	1,04
β -Pineno	977	979	17,28	β -Selineno	1487	1490	0,40
Myrceno	987	990	2,49	epi-Cubebol	1495	1494	0,75
<i>p</i> -Cymeno	1022	1024	0,13	α -Muuroleno	1498	1500	0,35
Limoneno	1028	1029	0,34	Germacreno A	1505	1509	0,46
N.i.	N.a.	N.a.	0,04	γ -Cadineno	1512	1513	1,53
<i>n</i> -Octanol	1066	1068	0,03	δ -Cadineno	1519	1523	1,09
Linalool	1096	1096	0,52	N.i.	N.a.	N.a.	0,11
<i>n</i> -Nonanal	1099	1100	0,07	α -Cadineno	1536	1538	0,15
Nopinona	1131	1140	0,08	N.i.	N.a.	N.a.	1,39
<i>trans</i> -Pinocarveol	1137	1139	0,52	N.i.	N.a.	N.a.	0,21
Pinocarvona	1157	1164	0,23	Espatuleno	1576	1578	5,64
Terpinen-4-ol	1176	1177	0,35	Óxido de Cariofileno	1581	1583	20,47
α -Terpineol	1190	1188	0,73	Globulol	1584	1590	0,37
Myrtenol	1194	1195	0,33	Viridiflorol	1593	1592	0,40
Geraniol	1248	1252	0,07	Ledol	1603	1602	0,96
N.i.	N.a.	N.a.	0,02	Epóxido de Humuleno II	1606	1608	1,15
α -Cubebeno	1348	1351	0,07	1,10-di-epi-Cubenol	1613	1619	0,34
α -Copaeno	1376	1376	2,11	1-epi-Cubenol	1626	1628	0,39
β -Bourboneno	1384	1388	0,33	epi- α -Cadinol	1640	1640	1,68
β -Elemeno	1390	1390	1,20	epi- α -Muurolol	1642	1642	0,45
α -Gurjuneno	1408	1409	0,17	α -Cadinol	1653	1654	3,24
<i>E</i> -Cariofileno	1420	1419	23,64	N.i.	N.a.	N.a.	0,47
β -Copaeno	1429	1432	0,21	N.i.	N.a.	N.a.	0,40
<i>E</i> - β -Farneseno	1439	1442	0,11	N.i.	N.a.	N.a.	0,22

IK^a: Índice de Kovats em coluna ZB-5MS (relativo a *n*-alcanos).

IK^b: Índice de Kovats em coluna DB-5 (reportado da literatura).¹⁴³

*N.i.: não identificado. **N.a.: não avaliado.

Tabela 26 – Composição química do óleo essencial das folhas de *E. erythropappus*

A análise por CG-EM mostrou a presença de 56 compostos, o que conduziu à identificação de 47 componentes representando 97,12% da composição total do óleo. O óleo essencial é dominado pela presença de sesquiterpenos hidrocarbonetos que constituem 36,17%, seguido por sesquiterpenos oxigenados, e monoterpenos hidrocarbonetos que constituem respectivamente 35,09% e 22,80% da composição do óleo. O componente principal dos sesquiterpenos hidrocarbonetos foi *E*-cariofileno (23,64%). Óxido de cariofileno (20,47%) e espatuleno (5,64%) foram os principais constituintes dos sesquiterpenos oxigenados enquanto, β -pineno (17,28%) foi o principal constituinte dos monoterpenos hidrocarbonetos, porém, não foi verificada a presença de α -bisabolol, constituinte majoritário

da madeira da candeia.¹⁴⁴ Na Figura 50 é apresentada a estrutura dos principais constituintes presentes no óleo essencial.

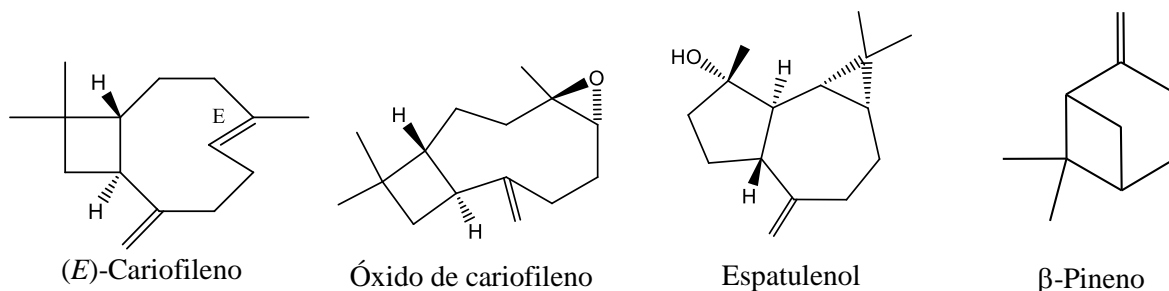


Figura 50 – Estrutura dos principais constituintes presentes no óleo essencial de *E. erythropappus*.

O rendimento em óleo essencial das folhas frescas de *E. erythropappus* foi de 0,049% para o extraído no aparelho de Clevenger e 0,12% para o extraído no hidroddestilador. De posse desses resultados pode-se verificar que os rendimentos obtidos por meio dos dois processos de extração foram menores que o preconizado na literatura por Sousa e colaboradores (2008)¹⁴⁵ que obtiveram um rendimento de 0,25%, utilizando-se folhas frescas da mesma planta e fazendo-se uso do aparelho de Clevenger.

Silvério e colaboradores (2013)¹⁴⁶ ao caracterizarem o óleo essencial das folhas de *E. erythropappus*, coletadas na cidade de Juiz de Fora – MG, identificaram 25 componentes, sendo que mais de 80% dos mesmos equivalem ao do nosso estudo, observando a presença principalmente de sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbônicos. Fato este que também pôde ser confirmado por Sousa e colaboradores (2008),¹⁴⁵ que ao identificarem os constituintes presentes no óleo essencial de *E. erythropappus*, encontraram como majoritários β-pineno, *E*-cariofileno, β-mirceno, germacreno-D, biciclogermacreno, α-copaeno, α-pineno, δ-cadineno e α-humuleno, dentre os 33 componentes identificados, os quais se igualam em mais de 54% aos nossos resultados.

Dorman & Deans (2000)¹⁴⁷ relatam que óleos essenciais contendo terpenos possuem atividade antimicrobiana. Estes mesmos pesquisadores verificaram que os compostos α-pineno e β-pineno, bem conhecidos por possuírem potencial antimicrobiano, são os responsáveis pela atividade antimicrobiana quando presentes em óleos essenciais, tais como o de pimenta preta, cravo, gerânio, noz-moscada, orégano e tomilho. Este potencial também tem sido revelado para α-humuleno, óxido de cariofileno, β-selineno e elemol, que foram encontrados em quantidades apreciáveis nos óleos investigados dos trabalhos de Sousa e

colaboradores (2008),¹⁴⁸ Jakovlev e colaboradores (1979)¹⁴⁹ e Nascimento e colaboradores (2007).¹⁵⁰

Ainda, sobre a atividade antimicrobiana apresentada por terpenos, Nascimento (2007)¹⁵⁰ relata que a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. erythropappus* está aparentemente relacionada com o mirceno e linalol, uma vez que existe uma relação entre as estruturas químicas dos componentes mais abundantes dos óleos e as suas atividades antimicrobianas.

No trabalho de Silvério e colaboradores (2013),¹⁴⁶ foi descrita pela primeira vez a atividade antioxidante do óleo essencial de *E. erythropappus*, o qual teve tal atividade atribuída à presença de altas percentagens de *E*-cariofileno, germacreno-D, α -copaeno, β -pineno, α -muurolol e α -bisabolol. Alguns destes compostos também estão presentes no óleo essencial por nós extraído, estimulando uma futura análise do mesmo com relação à atividade antioxidante. O óleo essencial de *E. erythropappus* pode ser uma fonte potencial de recursos naturais antioxidantes e agentes antimicrobianos.^{146, 150}

Os compostos α -pineno e β -pineno, que foram encontrados no óleo essencial do presente estudo, sendo o β -pineno um dos compostos majoritários, foram relatados por Lorente e colaboradores (1989),¹⁵¹ como responsáveis pela atividade anti-inflamatória do óleo de *Bupleurum fruticosum*.

O estudo de Sousa e colaboradores (2008)¹⁴⁸ realizado com o óleo essencial das folhas de *E. erythropappus* para tratamento oral de edema em ratos, mostrou que o mesmo possui atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

6 CONCLUSÕES

Das folhas da planta *E. erythropappus* (Asteraceae) foram isolados 11 fungos endofíticos, sendo os fungos 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 11 identificados por sequenciamento de DNA quanto a sua ordem e classe.

Em relação às atividades biológicas dos fungos endofíticos, tanto para a atividade antimicrobiana (fungos 4 e 5), quanto para a atividade antiproliferativa (fungos 9 e 11) dois extratos brutos foram os mais ativos.

A triagem química realizada para os extratos etanólicos dos fungos ativos (4, 5, 9 e 11) revelou que há a presença de saponina (fungo 4), terpenos (fungos 5 e 11) e para o fungo 9 não foi detectada nenhuma dessas classes de compostos. Já quando realizou-se a mesma triagem para estes mesmos fungos, porém para as suas frações hexânica e acetato de etila houve a presença de terpenos e alcaloides para a fração hexânica e terpenos, saponinas, flavonoides e alcaloides para a fração acetato de etila, ambos referentes aos fungos 4 e 9. Enquanto que para o fungo 11, a fração hexânica apresentou resultado positivo somente para terpenoide, e a fração em acetato de etila apresentou saponina e flavonoide. O fungo 5 apresentou terpenoides e alcaloides para a fração hexânica e terpenoides, saponinas, e flavonoides para a fração acetato de etila. Para ambas frações dos fungos trabalhados (4, 5, 9 e 11) não foi detectada a presença de tanino.

O estudo químico realizado com a fração acetato de etila do fungo 4 possibilitou, até o presente momento, o isolamento de 1 substância química. Com os dados dos espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais (HSQC e HMBC), foi possível propor a estrutura como sendo um derivado do naftaleno. O estudo químico realizado com a fração acetato de etila do fungo 11 possibilitou isolar uma fração rica em griseofulvina.

O teor de óleo essencial das folhas de *E. erythropappus* extraído pelo aparelho de Clevenger foi de 0,049%, resultando na identificação de 97,12% de sua constituição química, formada principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos. Para o óleo essencial extraído no hidrodestilador e utilizado para a realização do ensaio de atividade alelopática o rendimento obtido foi de 0,12%, tais rendimentos foram inferiores ao preconizado pela literatura.

Este foi o primeiro estudo realizado sobre o potencial alelopático do óleo essencial das folhas de *E. erythropappus* sobre sementes de alface, tomate, mostarda e picão-preto. Nota-se através dos valores da $\text{CI}_{50\%}$ uma inibição da germinação e crescimento radicular para as plantas daninhas (mostarda e picão-preto) evidenciando um possível bioerbicida no controle de gerenciamento das mesmas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Oliveira, D.A.; Pietrafesa, J.P. & Barbalho, M.G.S. “Manutenção da Biodiversidade e o *Hotspots* Cerrado”. Revista Caminhos de Geografia, 9 (26), 101-114, **2008**.
- 2 - Barreiro, E.J. & Bolzani, V.S. “Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos”. Química Nova, 32 (3), 679-688, **2009**.
- 3 - Joly, C.A.; Haddad, C.F.B.; Verdade, L.M.; Oliveira, M.C.; Bolzani, V.S. & Berlinck, R.G.S. “Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil”. Revista USP, 89, 114-133, **2011**.
- 4 - Amaral, J.G. Estudos das variações sazonais e intrapopulacional dos metabólitos secundários majoritários das folhas de *Eremanthus glomerulatus* Less (Asteraceae). 2008. 147 p. Dissertação de mestrado, Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-USP.
- 5 - Scorzoni, L.; Benaducci, T.; Almeida, A.M.F.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S. & Gianinni, M.J.S.M. “O uso de metodologia padrão para a determinação de atividade antifúngica de produtos naturais contra leveduras médicas *Candida sp* e *Cryptococcus sp*”. Brazilian Journal Microbiology, 38 (3), 391-397, **2007**.
- 6 - Domingues, R.J.; Young, M.C.M.; Tofoli, J.G. & Matheus, D.R. “Potencial antifúngico de extratos de plantas e de basidiomicetos nativos sobre *Colletotrichum acutatum*, *Alternaria solani* e *Sclerotium rolfsii*”. Summa Phytopathologica, 37 (3), 149-151, **2011**.
- 7 - Chapla, V.M.; Biasetto, C.R. & Araujo, A.R. “Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais”. Revista Virtual de Química, 5 (3), 421-437, **2012**.
- 8 - Pinto, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S.; Lopes, N.P. & Epifanio, R.A. “Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas”. Química Nova, 25 (1), 45-61, **2002**.
- 9 - Igarashi, Y. “Screening of Novel Bioactive Compounds from Plant-Associated Actinomycetes”. Actinomycetologica, 18 (2), 63-66, **2004**.
- 10 - Verdi, L.G.; Brighente, I.M.C. & Pizzolatt, M.G. “Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos”. Química Nova, 28 (1), 85-94, **2005**.
- 11 - Oliveira, R.G; Lima, E.O.; Vieira, W.L.; Freire, K.R.L.; Trajano, V.N.; Lima, I.O.; Souza, E.L.; Toledo, M.S. & Silva-Filho, R.N. “Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica”. Revista Brasileira de Farmacognosia, 16 (1), 77-82, **2006**.
- 12 - Beretta, M.E.; Fernandes, A.C.; Schneider, A.A. & Ritter, M.R. “A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil”. Revista Brasileira de Biociências, 6 (3), 189-216, **2008**.
- 13 - Almeida, G.S.S. Asteraceae Dumort. nos Campos Ruprestres do Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2008.

- 14 - Scalon, V.R.; Martins, C. & Cândido, E.S. “Florística dos remanescentes de campo rupestre sobre cangango Campus Morro do Cruzeiro/UFOP, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil”. *MG Biota*, 5 (3), 19-47, **2012**.
- 15 - Vieira, F.A. & Carvalho, D. “Diversidade genética de três espécies simpátricas de *Eremanthus* SPP”. In: IX Congresso de Ecologia do Brasil, Anais, 1-3, **2009**.
- 16 - Rosumek, F.B. “Associação de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish (Asteraceae) com formigas e sua relação com a mirmecofauna do solo em floresta de altitude, região central de Minas Gerais”. *Lundiana*, 9 (1), 41-47, **2008**.
- 17 - Granato, A.C.; Oliveira, J.H.L.; Selegim, M.H.R.; Berlinck, R.G.S.; Macedo, M.L.; Ferreira, A.G.; Rocha, R.M.; Hajdu, E.; Peixinho, S.; Pessoa, C.O.; Moraes, M.O. & Cavalcanti, B.C. “Produtos naturais da ascídia *Botrylloides giganteum*, das esponjas *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona delitrix* e do *nubibrânquio Tambja eliora*, da Costa do Brasil”. *Química Nova*, 28 (2), 192-198, **2005**.
- 18 - Sandes, A.R.R. & Blasi, G.D. “Biodiversidade e Diversidade Química e Genética: Aspectos Relacionados com a Propriedade Intelectual no Brasil”. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 28-32. **2000**.
- 19 - Santos, A.S.R. Biodiversidade. Disponível em: <file:///C:/Users/Ana%20Paula/Documents/MESTRADO%202014/PROJETO%20DE%20PESQUISA/PROJETO/ARTIGOS%20QUE%20USEI%20NO%20PROJETO/SANTOS%201998.htm>. Acesso em 14 jul. 2014.
- 20 - Calixto, J.B. “Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view”. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (1-2), 131-134, **2005**.
- 21 - Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em 14 jul. 2014.
- 22 - Myers, N.; Mittermeier, R.A.; Mittermeier, C.G; Fonseca, G.A.B. & Kent, J. “Biodiversity hotspots for conservation priorities”. *Nature*, 403, 853-858, **2000**.
- 23 - Martinelli, G.; Messina, T. & Filho, L.S. 2014. *Livro vermelho da flora do Brasil – Plantas raras do Cerrado*. 1ª edição. - Rio de Janeiro: CNCFlora, 320 p.
- 24 - Teixeira, I. Lista Nacional Oficial de Espécies da Flora Ameaçadas de Extinção. Disponível em: <<http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=18/12/2014&jornal=1&pagina=110&totalArquivos=144>>. 16 maio 2016.
- 25 - Laje, G.A. Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas *Annona crassiflora* Mart. 2011. 108 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Química.
- 26 - Abreu, P.M. & Branco, P.S. “Bibliotecas de produtos naturais como combinatória”. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 14 (5), 675-712, **2003**.
- 27 - Butler, M.S. “The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery”. *Journal of Natural Products*, 67 (12), 2141-2153, **2004**.

- 28 - Nogueira, L.G. Determinação do potencial biológico e antioxidante de extratos de casca de raiz de *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). 2009. 88p. Dissertação de mestrado, Araraquara. Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.
- 29 - Pupo, M.T.; Gallo, M.B.C. & Vieira, P.C. “Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais”. *Química Nova*, 30 (6), 1446-1455, **2007**.
- 30 - Netto, P.H.; Manente, F.A.; Moura, E.L.; Regasini, L.O.; Pinto, M.E.F.; Bolzani, V.S.; Oliveira, O.M.M.F. & Velloso, J.C.R. “Avaliação das atividades antioxidante, anti e pró-hemolítica do extrato etanólico das folhas de *Pterogyne nitens* Tul. (Fabaceae-Caesalpinioideae)”. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14 (4), 666-672, **2012**.
- 31 - Filho, R.B. “Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente”. *Química Nova*, 33 (1), 29-239, **2010**.
- 32 - Santos, L.S.; Oliveira, M.N.; Guilhon, G.M.P.; Santos, A.S.; Ferreira, I.C.S.; Lopes-Júnior, M.L.; Arruda, M.S.P.; Sailva, M.N.; Souza-Filho, A.P.S.; Rodrigues-Filho, E. & Oliveira, M.C.F. “Potencial herbicida da biomassa e de substâncias química produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*”. *Planta Daninha*, 26 (3), 539-548, **2008**.
- 33 - Demain, A.L. “Small bugs, big business: The economic power of the microbe”. *Biotechnology Advances*, 18 (6), 499-514, **2000**.
- 34 - Sordi, R. Estudo Químico e Biológico de Fungos Endofíticos Isolados das Folhas de *Styrax camporum* Pohl (Styracaceae). 2007. 121 p. Dissertação de mestrado, Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química.
- 35 - Magalhães, W.C.S. “Diversidade de fungos endofíticos em candeia *Eremanthus erythopapus* (DC.)MacLeish”. *Revista Cerne*, 14 (3), 267-273, **2008**.
- 36 - Mussi-Dias, V.; Araújo, A.C.O.; Silveira, S.F.; Rocabado, J.M.A. & Araújo, K.L. “Fungos endofíticos associados a plantas medicinais”. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14 (2), 261-266, **2012**.
- 37 - Strobel, G.; Daisy, B.; Castillo, U.; & Harper, J. “Natural Products from Endophytic Microorganisms”. *Journal of Natural Products*, 67 (2), 257-268, **2004**.
- 38 - Tan, R.X. & Zou, W.X. “Endophytes: a rich source of functional metabolites”. *Natural Product Reports*, 18 (4), 448-459, **2001**.
- 39 - Speciana, V.; Orlandellia, R.C.; Felbera, A.C.; Azevedo, J.L. & Pamphilea, J.A. “Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos”. *Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde*, 16 (4), 345-351, **2014**.
- 40 - Kongsaree, P.; Prabpai, S.; Sriubolmas, N.; Vongvein, C. & Wiyakrutta, S. “Antimalarial Dihydroisocoumarins Produced by *Geotrichum* sp., an Endophytic Fungus of *Crassocephalum crepidioides*”. *Journal of Natural Products*, 66 (5), 709-711, **2003**.
- 41 - Wagenaar, M.M.; Corwin, J.; Strobel, G. & Clardy, J. “Three New Cytochalasins Produced by an Endophytic Fungus in the Genus *Rhinocladiella*”. *Journal of Natural Products*, 63 (12), 1692-1695, **2000**.

- 42 - Dagne, E.; Leslie, A.A.G.; Asmellash, S.; Abaete, D.; Kingstcm, D.G.I.; Hofmann, G.A. & Johnstone, R.K. "Two New Cytotoxic Cytochalasins from *Xylizria obovata*". *Tetrahedron*, 50 (19), 5615-5620, **1994**.
- 43 - Kumara, D.S.S.; Cheungb, H.Y.; Lauc, C.S.; Chend, F. & Hyde, K.D. "In vitro studies of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii* with anti-proliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells". *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 295-300, **2004**.
- 44 - Harper, J.K.; Arif, A.M.; Ford, E.J.; Strobel, G.A.; Porco Jr, J.A.; Tomer, D.P.; O'Neill, K.L.; Heidere, E.M. & Granta, D.M. "Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities". *Tetrahedron*, 59 (14), 2471-2476, **2003**.
- 45 - Montagner, C. Atividade Antifúngica e Citotóxica de Cumarinas Naturais e Semi-sintéticas. 2007. 125 p. Dissertação de mestrado, Florianópolis, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-UFSC.
- 46 - Mesquita, A.K.F.; Machado, K.C.; Nunes, L.C.C.; Moraes, J. & Freitas, R.M. "Estudo prospectivo tecnológico e científico do potencial Anti- *Schistosoma mansoni* da cumarina e do ácido *o*-hidroxicinâmico". *Cadernos de Prospecção*, 6 (3), 386-397, **2013**.
- 47 - Zhang, H.W.; Song, Y. Chun & Tan, R.X. "Biology and chemistry of endophytes". *Natural Product Reports*, 23 (5), 753-771, **2006**.
- 48 - Cafêu, M.C.; Silva, G.H.; Teles, H.L.; Bolzani, V.S.; Araújo, A.R.; Young, M.C.M. & Pfenning, L.H. "Substâncias Antifúngicas de *Xylaria* sp., Um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae)". *Química Nova*, 28 (6), 991-995, **2005**.
- 49 - Daisy, B.H.; Strobel, G.A.; Castillo, U.; Ezra, D.; Sears, J.; Weaver, D.K. & Runyon, J.B. "Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus". *Microbiology*, 148 (11), 3737-3741, **2002**.
- 50 - Canuto, K.M.; Rodrigues, T.H.S.; Oliveira, F.S.A. & Gonçalves, F.J.T. Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/81780/1/Fungos-Endofiticos.pdf>>. 16 maio 2015.
- 51 - Kusari, S. Hertweck, C. & Spiteller, M. "Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites". *Chemistry & Biology*, 19 (7), 792-798, **2012**.
- 52 - Strobel, G. & Daisy, B. "Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4), 491- 502, **2003**.
- 53 - Hattori, E.K.O. & Nakajima, J.N. "A família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil". *Rodriguésia*, 59 (4), 687-749, **2008**.
- 54 - Correia, M.V. Redes neurais e Algoritmos genéticos no estudo quimiosistemático da família Asteraceae. 2010. 191 p. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, Instituto de Química.

- 55 - Ganesan, A. "The impact of natural products upon modern drug discovery". *Current Opinion in Chemical Biology*, 12 (3), 306-317, **2008**.
- 56 - Taranto, A.G.; Carneiro, J.W.M.; Araujo, M.T. & Silva, B.M. "Estudos sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos – Parte I". *Sitientibus*, 34, 47-58, **2006**.
- 57 - Fujaco, M.A.G.; Leite, M.G.P.; Pontes, S.R. & Ornelas, A.R. "Controle Geomorfológico e Antrópico na distribuição de Candeias (*Eremanthus* SP.) no Parque Estadual do Itacolomi, Minas Gerais". In: VI Simpósio Nacional de Geomorfologia, Anais, 1-11, **2006**.
- 58 - Ribeiro, A.O.; Silva, A.F. & Castro, A.H.F. "Identificação de espécies da família Asteraceae, revisão sobre usos e triagem fitoquímica do gênero *Eremanthus* da Reserva Boqueirão, Ingaí-MG". *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 12 (4), 456-465, **2010**.
- 59 - Tonetti, O.A.O.; Davide, A.C. & Silva, E.A.A. "Qualidade física e fisiológica de sementes de *Eremanthus erythropappus* (DC.) Mac. Leish". *Revista Brasileira de Sementes*, 28 (1), 114-121, **2006**.
- 60 - Silva, C.S.J.; Oliveira, A.D.; Junior, L.M.C.; Scolforo, J.R.S. & Souza, A.N. "Viabilidade Econômica e Rotação Florestal de Plantios de Candeia (*Eremanthus erythropappus*), em condições de risco". *Revista Cerne*, 20 (1), 113-122, **2014**.
- 61 - Silva, A.C.; Rosado, S.C.S.; Calegario, N.; Rodrigues, E.A.C.; Oliveira, A.N. & Vieira, C.T. "Variações Genéticas na Qualidade do Sistema Radicular de Mudanças de Candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish)". *Revista Árvore*, 31 (4), 609-617, **2007**.
- 62 - Momesso, L.S.; Kawano, C.Y.; Ribeiro, P.H.; Nomizo, A.; Goldman, G.H. & Pupo, M.T. "Chaetoglobosinas produzidas por *Chaetomium globosum*, fungo endofítico associado a *Viguiera robusta* Gardn. (Asteraceae)". *Química Nova*, 31 (7), 1680-1685, **2008**.
- 63 - Fornari, T.; Vicente, G.; Vázquez, E.; García-Risco, M.R. & Reglero, G. "Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction". *Journal of Chromatography A*, 1250, 34-48, **2012**.
- 64 - Bizzo, H.R.; Hovell, A.M.C. & Rezende, C.M. "Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas". *Química Nova*, 32 (3), 588-594, **2009**.
- 65 - Sousa, O.V.; Silvério, M.S.; Del-Vechio-Vieira, G.; Matheus, F.C.; Yamamoto, C.H. & Alves, M.S. "Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60 (6), 771-777, **2008**.
- 66 - Nascimento, A.M.A.; Brandão, M.G.L.; Oliveira, G.B.; Fortes, I.C.P. & Chartone-Souza, E. "Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or β -bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*". *Antonie van Leeuwenhoek-Journal of Microbiology*, 92 (1), 95-100, **2007**.
- 67 - Salvador, M.J.; Ferreira, E.O.; Pral, E.M.F.; Alfieri, S.C.; Albuquerque, S.; Ito, I. Y. & Dias, D.A. "Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae)". *Phytomedicine*, 9 (6), 566-571, **2002**.

- 68 - Candido, R.C.; Toloi, M.R.T.; Frnaceschini, S.A.; Garcia, F.R. & Minto, E.C.M. *In vitro* activity of antimycotic agents determined by E-test method against vagina shape *Candida* species. *Mycopathologia*, 144 (1), 15-20, **1998**.
- 69 - Penna, C.; Marinos, S.; Vivot, E.; Cruañes, M.C.; Munoz, J.D.; Cruanes, J.; Ferraro, G.; Gutkind, G. & Martino, V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 77 (1), 37-40, **2001**.
- 70 - Fabri, R.L.; Nogueira, M.S.; Dutra, L.B.; Bouzada, M.L.M. & Scio, E. “Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae”. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13 (2), 183-189, **2011**.
- 71 - Machado, T.B.; Pinto, A.V.; Pinto, M.C.F.R.; Leal, I.C.R.; Silva, M.G.; Amara, C.F.; Kuster, L.R.M. & Neto, K.R. “*In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*”. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21 (3), 279-284, **2003**.
- 72 - Prakash, O.; Kumar, A.; Ajeet, P.K. “Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review”. *American Journal of Pharmacology and Sciences*, 1 (6), 104-115, **2013**.
- 73 - Pinhatti, A.V. Avaliação *in vitro* da atividade antiproliferativa de benzofenonas isoladas de *Hypericum carinatum* Griseb. Porto Alegre, 40 p. **2010**.
- 74 - Toyang, N.J.; Wabo, H. K.; Ateh, E.N.; Davis, H.; Tane, P.; Sondengam, L.B.; Bryant, J. & Verpoorte, R. “Cytotoxic sesquiterpene lactones from the leaves of *Vernonia guineensis* Benth. (Asteraceae)” *Journal of Ethnopharmacology*, 146 (2), 552-556, **2013**.
- 75 - Lobo, J.F.R.; Castro, E.S.; Gouvea, D.R.; Ferandes, C.P.; Almeida, F.B.; Amorim, L.M.F.; Burth, P.; Rocha, L.; Santos, M.G.; Harmerski, L.; Loples, N.P. & Pinto, A.C. “Antiproliferative activity of *Eremanthus crotonoides* extracts and centratherin demonstrated in brain tumor cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(6), 1295-1300, **2012**.
- 76 - Ferreira, A.G. & Aquila, M.E.A. “Alelopatia: Uma área emergente da Ecofisiologia”. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12, 175-204, **2000**.
- 77 - Rice, E.L. Allelopathy. 2^a ed., New York, Academic Press, 1984.
- 78 - Souza-Filho, A.P.S.; Guilhon, G.M.S.P.; Zoghbi, M.G.B. & Cunha, R.L. “Análise comparativa do potencial alelopático do extrato hidroalcoólico e do óleo essencial de folhas de cipó-d’ alho (Bignoniaceae)”. *Planta Daninha*, 27 (4), 647-653, **2009**.
- 79 - Tigre, R.C. Atividades alelopática de *Cladonia verticallaris* (Raddi) Fr. Sobre a germinação e o crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. 2014. 141 p. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia Vegetal.
- 80 - Morikawa, C.I.O.; Miyaura, R.; Figueroa, M.L.T.; Salgado, E.L.R. & Fujii, Y. “Screening of 170 Peruvian plant species for allelopathic activity by using the Sandwich Method”. *Weed Biology and Management*, 12 (1), 1-11, **2012**.

- 81 - Kato-Noguchia, H.; Takeshita, S.; Kimura, F.; Ohno, O. & Suenaga, K. "A novel substance with allelopathic activity in *Ginkgo biloba*". Journal of Plant Physiology, 170 (18), 1595-1599, **2013**.
- 82 - Albuquerque, M.B.; Santos, R.C.; Lima, L.M.; Melo-Filho, P.A.; Nogueira, R.J.M.C.; Câmara, C.A.G. & Ramos, A.R. "Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A review". Agronomy for Sustainable Development, 31 (2), 379-395, **2010**.
- 83 - Scrivanti L.R, Zunnino M.P. & Zygadlo J.A. "*Tagetes minuta* and *Schinus molle* essential oils as allelopathic agents". Biochemical Systematics and Ecology, 31 (6), 563-572, **2003**.
- 84 - Batish, D.R.; Singh, H.P.; Kaur, S. & Arora, V. "Allelopathic interference of residues of *Ageratum conyzoides*". Journal of Plant Disease and Protection, 19 (Spl.), 293-299, **2004**.
- 85 - Yeryomenko, Y.A. "Allelopathic Activity of Invasive Arboreal Species". Russian Journal of Biological Invasions, 5 (3), 146-150, **2014**.
- 86 - Voll, C.E. Aplicação de vinhaça e do extrato de palhico de cana-de-açúcar no controle de plantas daninhas. 2005. 45 p. Dissertação de mestrado, Piracicaba, Universidade de São Paulo.
- 87 - Karam, D. & Melhorança, A.L. "Plantas Daninhas". Embrapa – Milho e Sorgo, 3ª ed. **2007**.
- 88 - Freitas, S.P.; Oliveira, A.R.; Freitas, S.J. & Soares, L.M.S. "Controle químico de *Rottboellia exaltata* em cana-de-açúcar". Planta Daninha, 22 (3), 461-466, **2004**.
- 89 - Lorenzi, H. 1991. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 2ª Edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 440p.
- 90 - Lorenzi, H. 2000. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3ª Edição. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 608p.
- 91 - Rodrigues, R. L. Fungos endofíticos associados à *Vellozia compacta* Mart. ex Schult. F. (Velloziaceae) presente em afloramentos rochosos nos estados de Minas Gerais e Tocantins. 2010. 70 p. Dissertação de mestrado, Ouro Preto, Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Biomas Tropicais-UFOP.
- 92 - Castellani, A. "Viability of some pathogenic fungi in distilled water". Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 42, 225-226, **1939**.
- 93 - Hillis, D.M. & Dixon, M.T. "Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference". Quarterly Review of Biology, 66 (4), 411-453, **1991**.
- 94 - Schlotterer, C.; Hauser, M.T.; Huesler, A. & Tautz, D. "Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*". Molecular Biology and Evolution, 11 (3), 513-522, **1994**.
- 95 - Rosa, L.H.; Vaz, A.B.M.; Caligiorno, R.B.; Campolina, S. & Rosa, C.A. "Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae)". Polar Biology, 32 (2), 161-167, **2009**.

- 96 - White, T.J.; Bruns, T.D. & Lee, S.B. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: a guide to methods and applications. Edited by N.A. Innis, J. Gelfand, and J. Sninsky. Academic Press, San Diego, Californian, USA, **1990**.
- 97 - Rosa, L.H.; Vieira, M.L.A.; Santiago, I.F. & Rosa, C.A. "Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica". FEMS Microbiology Ecology, 73 (1), 178-189, **2010**.
- 98 - Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M. & Kumar, S. "Mega: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods". Molecular Biology and Evolution, 28 (10), 2731-2739, **2011**.
- 99 - Edeoga, H.O.; Okwu, D.E. & Mbaebie, B.O. "Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants". African Journal of Biotechnology, 4 (7), 685-688, **2005**.
- 100 - Egwaikhide, P.A. & Gimba, C.E. "Analysis of the phytochemical content and antimicrobial activity of *Plectranthus glandulosus* whole plant". Middle-East Journal of Scientific Research, 2 (3-4), 135-138, **2007**.
- 101 - Abalaka, M.E.; Adeyemo, S.O. & Daniyan, S.Y. "Evaluation of the antimicrobial potentials of leaf extracts of *Khaya senegalensis*". Journal of Pharmaceutical Research and Opinion, 1 (2), 48-51, **2011**.
- 102 - Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bodesch, H.; Kenney, S. & Boyd, M.R. "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening" Journal of the National Cancer Institute, 82 (13), 1107-1112, **1990**.
- 103 - Mossman, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays". Journal of Immunological Methods, 65 (1-2), 55-63, **1983**.
- 104 - Berridge, M.V.; Tan, A.S.; Mccoy, K.D. & Wang, R. "The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts". Biochemica, 4, 14-19, **1996**.
- 105 - Nascimento, A.M.; Conti, R.; Turatti, I.C.C.; Cavalcanti, B.C.; Costa-Lotufo, L.V.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Manfrim, V.; Toledo, J.S.; Cruz, A.K. & Pupo, M.T. "Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*". Revista Brasileira de Farmacognosia, 22 (6), 1276-1281, **2012**.
- 106 - Okeke, M.I.; Iroegbu, C.U.; Eze, E.N.; Okoli, A.S. & Esimone, C.O. "Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity". Journal of Ethnopharmacology, 78 (2-3), 119-27, **2001**.
- 107 - Pujol, I.; Guarro, J.; Llop, C.; Soler, L. & Fernandez-Ballart, J. "Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests for the filamentous fungi". Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40 (9), 2106-10, **1996**.
- 108 - Espinel-Ingroff, A.; Dawson, K.; Pfaller, M.; Anaissie, E.; Breslin, B.; Dixon, D.; Fothergill, A.; Paetznick, V.; Peter, J.; Rinaldi, M. & Walsh, T. "Comparative and

collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (2), 314-319, **1995**.

109 - Grove, D.C. & Randall, W.A. “Assay methods of antibiotics: a laboratory manual (Antibiotics monographs, 2)”. *Medical Encyclopedia*, **1955**.

110 - Salvador, M.J. Estudo químico, biológico e biotecnológico de *Alternanthera maritima* e *Alternanthera tenella* (Gomphreneae, Amaranthaceae). 2005. 410 p. Tese de doutorado (Doutorado em Ciências - Área Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

111 - Salvador, M.J.; Zucchi, O.L.A.D.; Candido, R.C.; Ito, I.Y. & Dias, D.A. “*In vitro* antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae)”. *Pharmaceutical Biology*, 42 (2), 138-148, **2004**.

112 - Salvador, M.J.; Pereira, P.S.; França, S.C.; Candido, R.C.; Ito, I.Y. & Dias, D.A. “Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adults plants extracts from *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae)”. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 131-136, **2003**.

113 - Salvador, M.J.; Ferreira, E.O.; Pral, E.M.F.; Alfieri, S.C.; Albuquerque, S.; Ito, I.Y. & Dias, D.A. “Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae)”. *Phytomedicine*, 9 (6), 566-571, **2002**.

114 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 2008, Manual Clinical And Laboratory Standards Institute – CLSI (antigo NCCLS). <www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>. Acesso em: 20/04/2015.

115 - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 2003, Manual Clinical And Laboratory Standards Institute – CLSI (antigo NCCLS). <www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>. Acesso em: 20/04/2015.

116 - Seibert, J.B. Desenvolvimento de nanoemulsão a partir do óleo essencial de folhas de *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf.: Avaliação da sazonalidade e atividades biológicas. 2015. 83 p. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Ouro Preto, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

117 - Dutka, B. Short-term root elongation toxicity bioassay. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. National water research institute (NWRI), Environment Canada. **1989**.

118 - Greene, J.C.; Bartels, C.L.; Warren-Hicks, W.J.; Parkhurst, B.R.; Linder, G.L.; Peterson, S.A. & Miller, W.E. Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites. U. S. EPA 600/3-88/029. Corvallis. OR. **1988**.

119 - Wang, W. “Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants”. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 6 (5), 409-414, **1987**.

120 - Van den Dool, H. & Kratz, P.D.J. “Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography”. *Journal of Chromatography*, 11, 463-471, **1963**.

- 121 - Jacobi, C. M.; Carmo, F. F.; Vincent, R. C. & Stehmann, J. R. "Plant communities on ironstone outcrops-a diverse and endangered Brazilian ecosystem". *Biodiversity and Conservation*, 16 (7), 2185-2200, **2007**.
- 122 - Jacobi, C.M. & Carmo, F.F. "The contribution of ironstone outcrops to plant diversity in the Iron Quadrangle, a Threatened Brazilian Landscape". *Ambio*, 37 (4), 324-326, **2008**.
- 123 - Mourão, A. & Stehmann, J.R. "Levantamento da flora do campo rupestre sobre canga hematítica couraçada remanescente da Mina do Brucutu, Barão de Cocais, Minas Gerais". *Rodriguésia*, 58 (4), 775-786, **2007**.
- 124 - Freire, F.C.O.; Vasconcelos, F.R. & Coutinho, I.B.L. "Fungos endofíticos: Uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade". *Essentia*, 16 (1), 61-102, **2014**.
- 125 - Magalhaes, W.C.S.; Missagia, R.V.; Frieiro-Costa, F.A. & Mendes-Costa, M.C. "Diversidade de fungos endofíticos em can-deia *Eremanthus erythropappus* (DC.) MACLEISH". *Cerne*, 14 (3), 1-7, **2008**.
- 126 - Gatti, A.B; Perez, S.C.J.G.A. & Lima, M.I.S. "Atividade alelopática de extratos aquosos de *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L.". *Acta Botanica Brasilica*, 18 (3), 459-472, **2004**.
- 127 - Miranda, C.A.S.F.; Cardoso, M.G.; Carvalho, M.L.M.; Figueiredo, A.C.; Nelson, D.L.; Oliveira, C.M.; Gomes, M.S.; Andrade, J.; Souza, J.A. & Albuquerque, L.R.M. "Chemical Composition and Allelopathic Activity of *Parthenium hysterophorus* and *Ambrosia polystachya* Weeds Essential Oils". *American Journal of Plant Sciences*, 5 (9), 1248-1257, **2014**.
- 128 - Hillen, T.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Mesquini, R.M.; Cruz, M.E.S.; Stangarlin, J.R. & Nozaki, M. "Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes". *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14 (3), 439-445, **2012**.
- 129 - Pires, N.M. & Oliveira, V.R. "Alelopatia". *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*, 95-123, **2011**.
- 130 - Nishida, N.; Tamotsu, S.; Nagata, N.; Saito, C. & Sakai, A. "Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: Inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings". *Journal Chemical Ecology*, 31 (5), 1187-1203, **2005**.
- 131 - Novy, P.; Davidova, H. Serrano-Rojero, C.S.; Rondevaldova, J.; Pulkrabek, J. & Kokoska, L. "Composition and Antimicrobial Activity of *Euphrasia rostkoviana* Hayne Essential Oil". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-5, **2015**.
- 132 - Moradali, M.F.; Mostafavi, H.; Ghods, S. & Hejaroude, G.A. "Investigation of antimicrobial fatty acids from medicinal artist conk mushroom *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (Aphyllphoromycetidae) by TLC and spectroscopic detection," *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 10 (2), 149-154, **2008**.

- 133 - Amiran, F.; Shafaghat, A. & Shafaghatlonbar, M. "Omega-6 Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Hexanic Extract from *Prunus armeniaca* L. Kernel from North-West Iran". National Academy Science Letters, 38 (2), 107-111, **2015**.
- 134 - Afieroho, O.E. & Ugoeze, K.C. "Gas Chromatography-Mass Spectroscopic (GC-MS) Analysis of n-Hexane Extract of *Lentinus tuber-regium* (Fr) Fr (Polyporaceae) Syn *Pleurotus tuber-regium* Fr sclerotia". Tropical Journal of Pharmaceutical Research November, 13 (11), 1911-1915, **2014**.
- 135 - Leandro, L.M. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Eperua duckeana* e *Eperua glabriflora* (Fabaceae). 2011. 217 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) — Universidade Federal do Amazonas, Instituto de Ciências Exatas.
- 136 - Lee, W.B.; Kwon, H.C.; Cho, O.R.; Lee, K.C.; Choi, S.U.; Baek, N.I. & Lee, K.R. "Phytochemical Constituents of *Cirsium setidens* Nakai and Their Cytotoxicity against Human Cancer Cell Lines". Archives of Pharmacal Research, 25 (5), 628-635, **2002**.
- 137 - Harada, H.; Yamashita, U.; Kurihara, H.; Fukushi, E.; Kawabata, J. & Kamei, Y. "Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga". Anticancer Research, 22 (5), 2587-2590, **2002**.
- 138 - Silverstein, R.M.; Webster, F.X & Kiemle, D.J. 2007. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7ª Edição. LTC. Rio de Janeiro: tradução Ricardo Bicca de Alencastro.
- 139 - Oxford, A.E.; Raistrick, H. & Simonar, P."Studies in the biochemistry of microorganisms: Griseofulvin, C(17)H(17)O(6)Cl, a metabolic product of *Penicillium griseofulvum* Dierckx". Journal Biochemistry, 33, 240-248, **1939**.
- 140 - Cafêu, M.C.; Silva, G.H.; Teles, H.L.; Bolzani V. da S.; Araújo A.R.; Young, M.C.M. & Pfenning, L.H. "Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., Um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae)". Química Nova, 28 (6), 991-995, **2005**.
- 141 - Liéby-Muller, F.; Heudré Le Baliner, Q.; Grisoni, S.; Fournier, E.; Guilbaud, N. & Marion, F. "Synthesis and activities towards resistant cancer cells of sulfone and sulfoxide griseofulvin derivatives". Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 25 (10), 2078-2081, **2015**.
- 142 - Ho, Y.S.; Duh, J.S.; Jeng, J.H.; Wang, Y.J.; Liang, Y.C.; Lin, C.H.; Tseng, C.J.; Yu, C.F.; Chen, R.J. & Lin, J.K. "Griseofulvin potentiates antitumorogenesis effects of nocodazole through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest in human colorectal cancer cells". International Journal of Cancer, 91 (3), 393-401, **2001**.
- 143 - Adams, R.P. "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry". Allured, Carol Stream (IL), **2009**.
- 144 - Braun, N.A.; Meier, M.; Kohlenberg, B. & Hammerschmidt, F.J. "Two new bisabolene diols from the stem wood essential oil of *Vanillosmopsis erythropappa* Schultz-Bip. (Asteraceae)". Journal of Essential Oil Research, 15 (3), 139-142, **2003**.
- 145 - Sousa, O.V.; Dutra, R.C.; Yamamoto, C.H. & Pimenta, D.S. "Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch". Revista Brasileira de Farmácia, 89(2), 113-116, **2008**.

- 146 - Silvério, M.S.; Del-Vechio-Vieira, G.; Pinto, M.A.O.; Alves, M.S. & Sousa, O.V. "Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae)". *Molecules*, 18 (8), 9785-9796, **2013**.
- 147 - Dorman, H.J.D. & Deans, S.G. "Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils". *Journal of Applied Microbiology*, 88 (2), 308-316, **2000**.
- 148 - Sousa, O.V.; Silvério, M.S. Del-Vechio-Vieira, G.; Matheus, F.C.; Yamamoto, C.H. & Alves, M.S. "Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil from *Eremanthus erythropappus* leaves". *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60 (6), 771-777, **2008**.
- 149 - Jakovlev, V.; Isaac, O.; Thiemer, K. & Kunde, R. "Pharmacological investigations with compounds of chamomile - New investigations on the antiphlogistic effects of (-)- α -bisabolol and bisabolol oxides". *Planta Medica*, 35 (2), 125-140, **1979**.
- 150 - Nascimento, A.M.; Brandão, M.G.; Oliveira, G.B.; Fortes, I.C. & Chartone-Souza, E. "Synergistic bactericidal activity of *Eremanthus erythropappus* oil or β -bisabolene with ampicillin against *Staphylococcus aureus*". *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92 (1), 95-100, **2007**.
- 151 - Lorente, I.; Ocete, M.A.; Zarzuelo, A.; Cabo, M.M. & Jimenez, J. "Bioactivity of the essential oil of *Bupleurum fruticosum*". *Journal of Natural Products*, 52 (2), 267-272, **1989**.