

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

**BIOPROSPECÇÃO DE ALCALOIDES EM EXTRATOS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Duroia macrophylla* Huber
(RUBIACEAE)**

JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA

MANAUS - AMAZONAS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

JULIANA GOMES DE SOUZA OLIVEIRA

**BIOPROSPECÇÃO DE ALCALOIDES EM EXTRATOS DE
FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Duroia macrophylla* Huber
(RUBIACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia para a Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez

MANAUS - AMAZONAS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Juliana Gomes de Souza

O48b Bioprospecção de alcaloides em extratos de fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) / Juliana Gomes de Souza Oliveira. 2018
162 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cecília Veronica Nunez

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Amazônia. 2. Biotecnologia. 3. Metabolismo secundário. 4. Atividades biológicas. I. Nunez, Cecília Veronica II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico este trabalho ao meu esposo e à minha família,
incessantes nas orações a Deus pela minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais uma vez ter demonstrado amor e cuidado pela minha vida. Tenho a certeza de que foi Ele quem criou o objeto deste trabalho e me capacitou para realizar esta pesquisa.

Ao meu esposo Rodolfo, companheiro de vida e maior incentivador para a minha caminhada. Obrigada pela compreensão nas horas difíceis.

Aos meus pais, Sinvanil e Vilma, que mesmo distantes são sempre presentes, me acompanhando e tornando a jornada mais fácil ao dedicar tanto amor a mim.

À minha irmã Máira e ao meu unhado Marcos, que não medem esforços para cuidar da nossa família. Às minhas sobrinhas Antonia e Mariana que me trazem tantas alegrias.

À Igreja Batista Ebenézer por me dar todo o suporte em oração.

À minha orientadora Dra Cecilia, pela possibilidade de pertencer ao grupo de pesquisa e desenvolver esse projeto.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade e pela ajuda na bancada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela possibilidade de estudo.

À CAPES e ao CNPq pela bolsa e fomento do projeto.

Aos técnicos Magno P. Muniz (INPA) e Felipe M. Araújo da Silva (UFAM) fundamentais para obtenção dos espectros de RMN e isolamento das substâncias.

À prof Marne Carvalho de Vasconcellos e à Ellen Suzany P. Aranha pela possibilidade de realização do ensaio antitumoral.

A todos que de alguma forma participaram para que este trabalho fosse desenvolvido.

“Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apoie na sua própria inteligência. Lembre de Deus em tudo o que fizer, e Ele lhe mostrará o caminho certo.”

Provérbios 3:5-6

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XVIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Micro-organismos endofíticos	3
2.2. Interação Micro-organismo Endofítico X Hospedeiro	5
2.3. Metabolismo secundário e substâncias bioativas	10
2.4. Fungos e a produção de alcaloides	14
2.5. A família Rubiaceae Juss. e suas características	19
2.6. Gênero <i>Duroia</i> L. f.....	22
2.7. <i>Duroia macrophylla</i> Huber.....	24
2.8. Câncer e Atividade Citotóxica	27
2.9. Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach	30
2.10. Estresse Oxidativo e Atividade Antioxidante.....	33
2.11. Resistência aos antibióticos e Atividade antimicrobiana	34
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo Geral	37
3.2. Objetivos Específicos	37
4. METODOLOGIA	38
4.1. Área de Coleta e Obtenção do Material Vegetal	38
4.2. Desinfecção do Material Vegetal e Isolamento de Fungos Endofíticos.....	39
4.3. Purificação e Conservação dos Micro-organismos	41
4.4. Identificação fúngica.....	42
4.5. Preparo dos Extratos Fúngicos	42
4.6. Prospecção Química dos Extratos	45
4.6.1. Análise Cromatográfica dos Extratos.....	45
4.6.2. Ressonância Magnética Nuclear	45

4.7.	Atividades Química e Biológica.....	46
4.7.1.	Ensaio de Toxicidade Frente à <i>Artemia salina</i> Leach	46
4.7.2.	Ensaio Antioxidante.....	47
4.7.3.	Ensaio Antibacteriano.....	47
4.8.	Obtenção de Extratos com Metabólitos Secundários de Interesse	48
4.9.	Fracionamento dos extratos e purificação das substâncias	49
4.9.1.	Fracionamento cromatográfico do extrato micélio-DCM	50
4.9.2.	Fracionamento cromatográfico do extrato micélio- AcOEt	51
4.9.3.	Fracionamento cromatográfico do extrato da fase-DCM.....	53
4.9.3.1.	Fracionamento cromatográfico de $F_{DCM-F1-4}$	54
4.9.3.2.	Fracionamento cromatográfico de F_{DCM-F5}	55
4.10.	Identificação das substâncias isoladas	57
4.11.	Ensaio Antitumoral.....	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1.	Isolamento dos fungos endófitos e Taxa de Colonização	59
5.2.	Parte 1: Obtenção dos extratos fúngicos para a realização da triagem inicial	65
5.3.	Parte 1: Prospecção Química dos Extratos.....	66
5.3.1.	Análise Cromatográfica dos Extratos.....	66
5.3.2.	Ressonância Magnética Nuclear	77
5.4.	Parte 1: Atividades Química e Biológica	84
5.4.1.	Ensaio de Toxicidade Frente à <i>Artemia salina</i> Leach	84
5.4.2.	Ensaio Antioxidante.....	85
5.4.3.	Ensaio Antibacteriano.....	87
5.5.	Parte 2: Obtenção dos extratos para o fracionamento cromatográfico	89
5.6.	Parte 2: Prospecção Química dos Extratos.....	90
5.6.1.	Análise Cromatográfica dos Extratos.....	90
5.6.2.	Ressonância Magnética Nuclear	92
5.7.	Identificação fúngica.....	99
5.8.	Parte 2: Atividade Biológica	101
5.8.1.	Ensaio de Toxicidade Frente à <i>Artemia salina</i> Leach	101
5.8.2.	Ensaio Antioxidante.....	102
5.8.3.	Ensaio Antibacteriano.....	103
5.9.	Fracionamentos dos extratos e purificação das substâncias	105
5.10.	Identificação das substâncias isoladas	105

5.10.1.	Substância 1	106
5.10.2.	Substância 2	132
5.10.3.	Mistura de alcaloides	134
5.11.	Parte 3: Atividade Biológica	137
5.11.1.	Ensaio Antibacteriano – Citocalasina D.....	137
5.11.2.	Ensaio de citotoxicidade contra <i>A. salina</i> – Citocalasina D.....	137
5.11.3.	Ensaio Antitumoral	138
6.	CONCLUSÃO	142
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
8.	ANEXOS.....	157

RESUMO

Bioprospecção de alcaloides em extratos de fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)

Os micro-organismos endofíticos apresentam um enorme potencial para a produção de substâncias bioativas e são uma alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos contra várias doenças, entre as quais o câncer e as doenças infecciosas. As plantas da família Rubiaceae apresentam um grande potencial biotecnológico, como por exemplo a *Duroia macrophylla*, que já revelou a presença de um alcaloide com atividade antitumoral e baixa toxicidade para células não neoplásicas e oito alcaloides com atividade antimicobacteriana, o que resultou em duas patentes para este grupo de pesquisa. Por essas razões foi proposto o estudo do potencial biotecnológico dos micro-organismos endofíticos desta planta. Foram isolados 47 fungos endofíticos e destes selecionaram-se 21 fungos morfologicamente diferentes para a prospecção química e biológica dos seus extratos provenientes do micélio e do caldo fermentado. Dentre os extratos metanólicos, nenhum apresentou atividade antioxidante e 18 mostraram atividade antibacteriana. Os extratos obtidos da fase-acetato de etila dos fungos Dm SB 43 e Dm BDA 12c foram ativos contra *A. salina*, apresentando CL_{50} de 109,5 e 605,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Foram encontrados indícios de substâncias fenólicas, alcaloides, terpenos e açúcares. Quatro fungos apresentaram indícios de produção de alcaloides. Um deles foi selecionado para um novo cultivo com mais repetições para obtenção de quantidades maiores de extratos. Esse fungo foi identificado como *Xylaria* sp., e todos os seus extratos apresentaram toxicidade alta ou moderada contra *A. salina*. Apenas dois não apresentaram atividade antibacteriana e nenhum extrato demonstrou atividade antioxidante. Os extratos micélio-diclorometano, micélio-acetato de etila e fase-diclorometano apresentaram indícios de alcaloides na CCDC e foram fracionados. A partir desses fracionamentos foram isoladas a citocalasina D e outras duas substâncias que estão em fase de elucidação. Devido à pouca massa de substâncias isoladas, apenas a citocalasina D foi submetida aos ensaios biológicos e químico, que foi fortemente citotóxica contra *A. salina* (31,4 $\mu\text{g/mL}$) e não apresentou atividade antibacteriana e antioxidante nas concentrações testadas. A maior atividade antitumoral dos extratos de *Xylaria* sp. e da citocalasina D foi contra a linhagem celular HCT 116 (viabilidade celular de 53,5; 56,9; 58,4 e 77,28%). Já contra as células MCF7 e DU145 foi observada ausência ou baixa atividade. Contra a linhagem de células saudáveis MRC-5, a citocalasina D não apresentou citotoxicidade. Este resultado pode ser útil em relação à toxicidade da substância em possíveis correlações com outras atividades biológicas. Portanto, este estudo demonstrou a diversidade de classes químicas e o potencial de atividades biológicas que os fungos endofíticos de *D. macrophylla* apresentam, além do primeiro relato de *Xylaria* sp. nesta planta, que apresentou ser um grande produtor de citocalasina D.

Palavras-chave: Amazônia, Biotecnologia, Metabolismo secundário, Atividades biológicas.

ABSTRACT

Bioprospecting of alkaloids in endophytic fungi extracts of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)

Endophytic microorganisms have enormous potential for the production of bioactive substances and are an alternative for the development of new drugs against various diseases, including cancer and infectious diseases. The plants of the Rubiaceae family have a great biotechnological potential, such as *Duroia macrophylla*, which has already revealed the presence of an alkaloid with antitumor activity and low toxicity to non-neoplastic cells and eight alkaloids with antimycobacterial activity, which resulted in two patents for this research group. For these reasons it was proposed the study of the biotechnological potential of the endophytic microorganisms of this plant. A total of 47 endophytic fungi were isolated and 21 morphologically different fungi were selected for the chemical and biological exploration of their extracts from the mycelium and fermented broth. Among the methanolic extracts, none showed antioxidant activity and 18 showed antibacterial activity. The extracts obtained from the ethyl acetate phase of the fungi Dm SB 43 and Dm BDA 12c were active against *A. salina*, presenting LC₅₀ of 109.5 and 605.5 µg/mL, respectively. Evidences of the presence of phenolic substances, alkaloids, terpenes and sugars were found. Four fungi showed evidence of alkaloid production. One of them was selected for a new crop with more replicates to obtain larger amounts of extracts. This fungus was identified as *Xylaria* sp. and all extracts showed high or moderate toxicity against *A. salina*. Only two presented no antibacterial activity and no extract showed antioxidant activity. The extracts mycelium-dichloromethane, mycelium-ethylacetate and phase-dichloromethane showed evidence of alkaloids in the CCDC and they were fractionated. From these fractions were isolated cytochalasin D and two other substances that are in elucidation phase. Due to the low mass of isolated substances, only cytochalasin D was submitted to biological and chemical tests, which was strongly cytotoxic against *A. salina* (31.4 µg/mL) and showed no antibacterial and no antioxidant activity at the concentrations tested. The higher antitumor activity of extracts of *Xylaria* sp. and cytochalasin D was against the HCT 116 cell line (53.5, 56.9, 58.4 and 77.28% of cell viability). On the MCF7 and DU145 cells, absence or low activity was observed. Against the MRC-5 healthy cell line, cytotoxic D did not show cytotoxicity. This result may be useful in relation to the toxicity of the substance in possible correlations with other biological activities. Therefore, this study demonstrated the diversity of chemical classes and the potential of biological activities that the endophytic fungi of *D. macrophylla* present, in addition to the first report of *Xylaria* sp. in this plant, which showed to be a major producer of cytochalasin D.

Keywords: Amazon, Biotechnology, Secondary metabolism, Biological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Interação endófito e hospedeiro: Doença x Antagonismo Balanceado.	6
Figura 2 - Exemplos de estruturas de substâncias bioativas produzidas tanto por fungos endofíticos quanto por seus hospedeiros.	9
Figura 3 - Estruturas de alcaloides Ergot.	16
Figura 4 - Exemplos de alcaloides produzidos por fungos endofíticos.	18
Figura 5 - Distribuição da família Rubiaceae no globo terrestre.	20
Figura 6 - Distribuição geográfica no território brasileiro do gênero <i>Duroia</i> L. f. (A) e da espécie <i>Duroia macrophylla</i> (B).	23
Figura 7 - Imagens de <i>Duroia macrophylla</i> Huber. (A) Aspecto geral da árvore na Reserva A. Ducke, (B) Folhas, (C) Flor, (D) Fruto, (E) Inflorescência.	24
Figura 8 - Local de coleta e Material vegetal de <i>Duroia macrophylla</i> Huber. ...	39
Figura 9 - Fluxograma de isolamento dos micro-organismos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	40
Figura 10 - Fluxograma da preparação dos extratos dos metabólitos intra e extracelulares dos fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	44
Figura 11 - Fluxograma do fracionamento do extrato _M DCM do fungo DM SB 43.	51
Figura 12 - Fluxograma do fracionamento do extrato _M AcOEt do fungo DM SB 43.	53
Figura 13 - Fluxograma do fracionamento do extrato _F DCM do fungo Dm SB 43.	57
Figura 14 - Características macroscópicas dos fungos endofíticos isolados de <i>Duroia macrophylla</i>	59
Figura 15 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada dos extratos diclorometânicos dos micélios dos 21 fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	68
Figura 16 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada dos extratos de acetato de etila dos micélios dos 21 fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	70

Figura 17 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada dos extratos metanólicos dos micélios dos 21 fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	72
Figura 18 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada das partições com diclorometano dos líquidos metabólicos dos 21 fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	74
Figura 19 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada das partições com acetato de etila dos líquidos metabólicos dos 21 fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	76
Figura 20 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato diclorometânico do micélio do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	79
Figura 21 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO) da fase diclorometânica do líquido metabólico do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	80
Figura 22 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO) da fase diclorometânica do caldo metabólico do fungo endofítico Dm BDA 13 de <i>Duroia macrophylla</i>	81
Figura 23 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato diclorometânico do micélio do fungo endofítico Dm BDA 41b de <i>Duroia macrophylla</i>	82
Figura 24 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fase diclorometânica do caldo metabólico do fungo endofítico Dm BDA 21 de <i>Duroia macrophylla</i>	83
Figura 25 - Curva padrão de ácido ascórbico do ensaio antioxidante.....	85
Figura 26 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada dos extratos do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	91
Figura 27 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato diclorometânico do micélio proveniente do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	93
Figura 28 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato de acetato de etila do micélio proveniente do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	94

Figura 29 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO) do extrato metanólico do micélio proveniente do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	95
Figura 30 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fase diclorometânica do líquido metabólico proveniente do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	96
Figura 31 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO) da fase de acetato de etila do líquido metabólico proveniente do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	97
Figura 32 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) dos extratos e líquidos metabólicos do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	98
Figura 33 - Características macroscópicas fungo endofítico SB 43 isolado de <i>Duroia macrophylla</i>	99
Figura 34 - Árvore de distância filogenética a partir do gene 18S rRNA. Construída com o auxílio do software MEGA 7.0 pelo método de Neighbor-Joining com parâmetro Kimura-2, e Bootstrap de 1000 réplicas.	99
Figura 35 - Estrutura Molecular da citocalasina D.	106
Figura 36 - Espectro de massas de alta resolução da substância 1.	106
Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).	108
Figura 38 - Ampliação da região entre 0,95 e 1,51 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).	109
Figura 39 - Ampliação da região entre 2,02 e 2,51 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).	109
Figura 40 - Ampliação da região entre 2,67 e 2,85 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).	109
Figura 41 - Ampliação da região entre 3,23 e 3,81 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).	110
Figura 42 - Ampliação da região entre 5,09 e 5,35 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).	110
Figura 43 - Ampliação da região entre 5,52 e 5,69 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3)	110

Figura 44 - Ampliação da região entre 6,08 e 6,14 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3)	111
Figura 45 - Ampliação da região entre 7,13 e 7,31 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).	111
Figura 46 - Mapa de correlação HSQC (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz; CDCl_3) – Substância 1.....	111
Figura 47 - Ampliação das regiões dos hidrogênios do mapa de correlações HSQC da Substância 1 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75MHz; CDCl_3).	112
Figura 48 - Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).115	
Figura 49 - Mapa de correlação COSY da Substância 1 em CDCl_3 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz).	116
Figura 50 - Ampliação do mapa de correlações COSY da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).....	117
Figura 51 - Mapa de correlação HMBC da Substância 1 em CDCl_3 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz).	120
Figura 52 - Ampliação do mapa de correlações HMBC da Substância 1 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz; CDCl_3).	120
Figura 53 - Região dos hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HMBC da Substância 1 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz; CDCl_3).....	123
Figura 54 - Região dos hidrogênios benzílicos do mapa de correlações COSY da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).	124
Figura 55 - Região dos hidrogênios da lactama de cinco membros do mapa de correlações COSY da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).....	124
Figura 56 - Região dos hidrogênios da lactama de cinco membros do mapa de correlações HMBC da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).	125
Figura 57 - Região dos hidrogênios do ciclohexano do mapa de correlações COSY da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).	126
Figura 58 - Região dos hidrogênios do ciclohexano do mapa de correlação HMBC da Substância 1 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz; CDCl_3).	126
Figura 59 - Região dos hidrogênios do anel macrocíclico do mapa de correlações COSY da Substância em CDCl_3 (300 MHz).....	127
Figura 60 - Região dos hidrogênios do anel macrocíclico do mapa de correlações HMBC da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).	128

Figura 61 - Espectro de massas de alta resolução da substância 2.....	133
Figura 62 - Espectro de RMN de ^1H da Substância 2 em CDCl_3 (300 MHz). 133	133
Figura 63 - Cromatograma LC-MS da mistura de alcaloides (190 nm).	135
Figura 64 - Espectro de massas de alta resolução do íon mais abundante da mistura de alcaloides.....	135
Figura 65 - Espectro de RMN de ^1H da mistura de alcaloides em CDCl_3 (300 MHz).....	136
Figura 66 - Efeito citotóxico das amostras em diferentes linhagens celulares utilizando no tempo de tratamento de 72 h.	139
Figura 67 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) dos extratos diclorometânicos dos micélios dos fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i> (CDCl_3 : Dm SB 41a, Dm SB43; DMSO: Dm BDA 41b).....	157
Figura 68 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) do extrato de acetato de etila do micélio do fungo Dm SB 41b e do extrato diclorometânico do micélio do fungo Dm BDA 21, ambos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i> (CDCl_3).	157
Figura 69 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i> (DMSO).	158
Figura 70 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) das fases diclorometânicas dos líquidos metabólicos dos fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i> (CDCl_3 , exceto Dm BDA 31 e Dm BDA 25a: DMSO).	159
Figura 71 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) das fases diclorometânicas dos líquidos metabólicos dos fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i> (CDCl_3 , exceto Dm SB 21: DMSO).....	160
Figura 72 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) das fases de acetato de etila dos líquidos metabólicos dos fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i> (DMSO, exceto Dm BDA 53: CDCl_3).	161

Figura 73 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) das fases de acetato de etila dos líquidos metabólicos dos fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* (DMSO). 162

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de fungos endofíticos, seus hospedeiros e suas substâncias bioativas.	12
Tabela 2 - Distribuição dos fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i> de acordo com o período de incubação e pH final do líquido metabólico.	43
Tabela 3 - Eluentes utilizados no fracionamento do extrato _M DCM do fungo DM SB 43.	50
Tabela 4 - Eluentes utilizados no fracionamento do extrato _M AcOEt do fungo Dm SB 43.	52
Tabela 5 - Eluentes utilizados no fracionamento do extrato _M DCM do fungo DM SB 43.	53
Tabela 6 - Eluentes utilizados no fracionamento de _F DCM.F1-4	54
Tabela 7 - Eluentes utilizados no fracionamento de _F DCM.F1-4.F2-4.F2-3.....	55
Tabela 8 - Eluentes utilizados no fracionamento de _F DCM.F5.....	56
Tabela 9 - Massas dos extratos dos fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	65
Tabela 10 - Resultados da análise em CCDC dos extratos diclometânicos dos micélios dos 21 fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	67
Tabela 11 - Resultados da análise em CCDC dos extratos de acetato de etila dos micélios dos 21 fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	69
Tabela 12 - Resultados da análise em CCDC dos extratos de metanólicos dos micélios dos 21 fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	71
Tabela 13 - Resultados da análise em CCDC das partições com diclorometano dos líquidos metabólicos dos 21 fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	73
Tabela 14 - Resultados da análise de CCDC das partições com acetato de etila dos líquidos metabólicos dos 21 fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	75
Tabela 15 - Resultados do ensaio de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> das fases de Acetato de Etila do primeiro cultivo submerso dos fungos endofíticos Dm SB 43 e Dm BDA 12c de <i>Duroia macrophylla</i>	84
Tabela 16 - Resultado do ensaio antioxidante dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i>	86

Tabela 17 - Atividade antibacteriana dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos endofíticos de <i>Duroia macrophylla</i> , com halos de inibição (mm).....	87
Tabela 18 - Massas dos extratos do fungo endofítico SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	89
Tabela 19 - Resultados da análise de classes químicas, em placas cromatográficas, dos extratos do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	90
Tabela 20 - Resultados do Teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> dos extratos do segundo cultivo submerso do fungo Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	102
Tabela 21 - Resultado do ensaio antioxidante dos extratos provenientes do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i>	103
Tabela 22 - Atividade antibacteriana dos extratos provenientes do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de <i>Duroia macrophylla</i> , com halos de inibição (mm).	104
Tabela 23 - Dados de RMN 1D e 2D da Citocalasina D em CDCl ₃ (300 MHz).	129
Tabela 24 - Dados de RMN 1D da Substância 2 em CDCl ₃ (300 MHz).	134
Tabela 25 - Resultados do ensaio de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> da citocalasina D.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt – Acetato de Etila
Ágar SB – Ágar Sabouraud
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – *American Type Culture Collection*
BDA – Ágar Batata Dextrose
Caldo BD – Caldo Batata Dextrose
Caldo SB – Caldo Sabouraud
CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl₃ – Clorofórmio
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CL₅₀ – Concentração necessária para matar 50% dos organismos-teste
COSY – *Correlated Spectroscopy*
d – dubleto
dd – duplo dubleto
DCM – Diclorometano
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EM – Espectrometria de Massas
ESI – *Electrospray ionization*
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
Inmet – Instituto Nacional de Meteorologia
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
HMBC – *Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*
HSQC – *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*
J – Constante de acoplamento
m/z – Relação massa/carga
MeOH – Metanol
nm – Nanômetro
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
pH – Potencial Hidrogeniônico
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
rpm – Rotações por Minuto
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde
TAS – Toxicidade frente à *Artemia salina*
UV – Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais foram e ainda são indispensáveis para o desenvolvimento e descoberta de novos medicamentos (BRANDÃO; P. DAVID; COUTO; NASCIMENTO; M. DAVID, 2010; CRAGG; KATZ; NEWMAN; ROSENTHAL, 2012; NEWMAN; CRAGG, 2016). Dos medicamentos novos e aprovados entre os anos de 1981 e 2014 apenas 27% eram totalmente sintéticos, sem nenhuma inspiração em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Os vegetais são uma importante fonte de produtos naturais, entretanto a produção dos metabólitos pode variar de acordo com o clima, disponibilidade de nutrientes, dentre outros fatores, tornando-se um entrave para a produção industrial. Por isso, são necessárias pesquisas que abordem outras fontes dessas substâncias bioativas ou seus similares para uma produção mais eficiente (LI et al., 2015).

Os micro-organismos também apresentam um enorme potencial de produção de substâncias bioativas (NEWMAN; CRAGG, 2016; STROBEL, 2003). Parte destes micro-organismos é denominada como “micro-organismos endofíticos”, pois na totalidade ou em parte do seu ciclo de vida eles habitam o interior de uma planta no espaço intra ou intercelular, sem causar danos aparentes à hospedeira (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; TAN; ZOU, 2001; ZHANG; SONG; TAN, 2006). Esses micro-organismos são parte da diversidade microbiana ainda pouco explorada, e apresentam um enorme potencial de produção de substâncias bioativas que poderão ser aplicadas na medicina, indústria ou agricultura (CHAPLA; BIASETTO; ARAÚJO, 2013; STROBEL, 2003). Estima-se que existam aproximadamente 300 mil espécies de plantas e que cada uma possua pelo menos um endófito, assim sendo, o potencial de descoberta de novas espécies e de novas substâncias em estudos com micro-organismos endofíticos é muito elevado (CHAPLA; BIASETTO; ARAÚJO, 2013; KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Como a diversidade de endófitos é maior em áreas de clima tropical e subtropical, as pesquisas com foco em plantas presentes nesses ecossistemas podem ser promissoras para a descrição de novas espécies de endófitos e de novos produtos naturais (STROBEL, 2003). Um importante representante da

biodiversidade mundial é o Brasil, um país com diversidade climática (climas tropicais úmidos, zonas semi-áridas e temperadas) e detentor de seis biomas distintos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA [SiBBr], 2016). A biodiversidade brasileira é estimada em aproximadamente 1,8 milhões de espécies e apenas cerca de 11% já foram catalogadas (SiBBr, 2016). Embora já seja conhecido o grande potencial que os micro-organismos endofíticos possuem para a produção de metabólitos secundários bioativos, eles ainda são pouco explorados inclusive os associados aos vegetais do Brasil (ZANARDI et al., 2012). Tal informação vem de encontro com o futuro das florestas tropicais que a cada ano está diminuindo, o que reduz as chances de descoberta de novos micro-organismos e de seus produtos e aumenta a necessidade e urgência de novos estudos com esta abordagem (STROBEL, 2003).

Os micro-organismos endofíticos representam uma opção para a produção de metabólitos vegetais visto que devido à interação e co-evolução ocorrida ao longo do tempo, alguns deles podem captar parte do DNA da planta e produzir compostos antes associados ao hospedeiro (STROBEL, 2003; ZHANG et al., 2006). Além disso, o cultivo microbiano é um processo controlado e sem interferências ambientais (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

A família Rubiaceae é uma importante produtora de produtos naturais como cafeína, quinino e emetina (CAMPOS; BRITO, 1999; SAHU; MAHATO, 1982; SILVA NETO; PEIXOTO, 2012). Nela encontra-se a *Duroia macrophylla* Huber, uma planta que apresenta substâncias com aplicabilidade biotecnológica. Estudos realizados por este grupo de pesquisa revelaram a presença de um alcaloide com atividade antitumoral e baixa toxicidade para células saudáveis, e oito alcaloides com atividade antimicobacteriana, o que resultou em duas patentes nos anos de 2012 e 2014 (NUNEZ et al., 2014; NUNEZ; VASCONCELLOS, 2012). Portanto, a pesquisa dos micro-organismos endofíticos associados à essa planta é de extrema relevância, pois podem ser uma alternativa para a obtenção das substâncias já relatadas na espécie.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Micro-organismos endofíticos

Micro-organismos endofíticos são micro-organismos que na totalidade ou em parte do seu ciclo de vida habitam o interior de uma planta no espaço intra ou intercelular, sem causar danos aparentes à hospedeira (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; TAN; ZOU, 2001; ZHANG et al., 2006). Kusari, Hertweck e Spiteller (2012) definem essa associação como “endofitismo” e os benefícios dela dependem dos organismos que estão interagindo, e aparentemente, nenhum deles é prejudicado. A definição de endófito foi sofrendo modificações à medida em que esses organismos eram investigados e até o presente momento este termo ainda é discutido.

O termo “endofítico” foi utilizado pela primeira vez por de Bary (DE BARY, 1866) considerado o pai da fitopatologia e fundador da micologia moderna (MOURA, 2002). Ele o definiu como: “todo organismo presente no interior da planta”. Alguns anos depois, Carroll (1988) adicionou à definição de endófitos a característica de serem assintomáticos ao hospedeiro, excluindo desse grupo os organismos patogênicos e mutualistas, como por exemplo, os fungos de micorrizas. Petrini (1991) propôs um novo e mais amplo conceito: “São todos os organismos que habitam os órgãos das plantas, que em algum momento de sua vida, podem colonizar tecidos internos da planta sem causar dano aparente ao seu hospedeiro”. Este conceito incluiria micro-organismos epifíticos, que em algum período habitariam o interior da planta, e os patogênicos latentes, que podem viver assintomaticamente por uma determinada fase de suas vidas. De acordo com Azevedo, Maccheroni, Pereira e Araújo (2000) os fungos e bactérias micorrízicos não são considerados como endófitos por apresentarem estruturas externas visíveis.

Os micro-organismos endofíticos podem ser procariotos ou eucariotos, e encontram-se em uma variedade de locais do hospedeiro como: raízes, folhas, cascas, xilema, galhos, frutas, brotos, tubérculos, dentre outros (ZHANG et al., 2006). Tais associações são muito antigas sendo registradas em fósseis de

caules e folhas demonstrando uma possível co-evolução desde o surgimento dos primeiros vegetais superiores (STROBEL, 2003).

Acredita-se que os micro-organismos endofíticos estejam presentes em praticamente todo o reino vegetal (musgos, gramíneas, samambaias, monocotiledôneas, etc) (PETRINI, 1991; TAN; ZOU, 2001; ZHANG et al., 2006). Eles podem ser encontrados em plantas presentes nos mais diversos ecossistemas terrestres, dos trópicos ao ártico, desde florestas tropicais, mangues, florestas temperadas, oceanos até desertos (CHAPLA; BIASETTO; ARAÚJO, 2013; ZHANG et al., 2006) contudo, há uma diversidade maior de endófitos em plantas de áreas tropicais e subtropicais (STROBEL, 2003; TAN; ZOU, 2001). A partir de um vegetal, centenas de espécies microbianas podem ser isoladas e pelo menos uma delas será específica para ele (TAN; ZOU, 2001).

Os fungos são os endófitos mais frequentes e podem ser encontrados nas mais diversas partes da planta, tanto abaixo do solo, em raízes, quanto acima do solo, em folhas e caules (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Todas as espécies vegetais pesquisadas até o momento possuíam fungos endofíticos. Dentro da estimativa da existência de 300.000 espécies de plantas em todo o mundo, acredita-se que até 1 milhão e meio de fungos estejam associados à esses vegetais (GANLEY; BRUNSFELD; NEWCOMBE, 2004; LI et al., 2015; NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; PETRINI, 1991; ZHANG et al., 2006).

A colonização endofítica pode ser intercelular, intracelular (limitada a uma célula ou não), localizada ou sistêmica. Geralmente a colonização das partes aéreas é intracelular e confinada às células individuais ou intercelular localizada, diferente da colonização das raízes que também pode ser intra ou intercelular, mas usualmente é extensa. Qualquer órgão do vegetal pode ser colonizado, entretanto, alguns endófitos possuem preferência para algumas partes da planta. O endófito pode estar presente em hospedeiros diferentes ou pode ser específico para o vegetal, tendo nesse caso uma preferência ou exclusividade decorrente da sua adaptação (SCHULZ; BOYLE, 2005).

A transmissão do endófito para a planta pode ser horizontal ou vertical. Na primeira, as injúrias naturais (estômatos, hidatódios, crescimento das

raízes, ferimentos causados por insetos e apressórios de fungos patogênicos, etc) ou artificiais (ferimentos causados pelas práticas agrícolas) são portas de entrada para o micro-organismo, e geralmente as interações resultantes são antagônicas. Na colonização horizontal os micro-organismos são transportados por insetos, vento ou água e podem ser encontrados na superfície do vegetal, apresentando uma curta fase epifítica (SCHULZ; BOYLE, 2005). Já a infecção vertical ocorre através das sementes do hospedeiro, e na sua maioria resulta em uma interação mutualística (CHAPLA, BIASETTO, ARAÚJO, 2013; ZHANG et al., 2006). Inicialmente ocorre uma colonização intercelular onde os nutrientes do apoplasto são utilizados para o crescimento dos micro-organismos e posteriormente pode haver a disseminação de maneira sistêmica (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; SCHULZ; BOYLE, 2005).

2.2. Interação Micro-organismo Endofítico X Hospedeiro

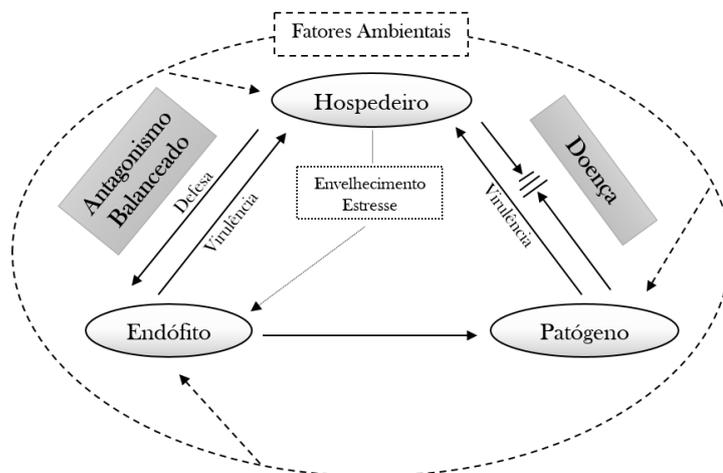
Pelo fato de não produzirem estruturas externas visíveis e pelo desconhecimento de seu papel no hospedeiro, os micro-organismos endofíticos foram por mais de um século quase que desconsiderados. Apenas no final da década de 70 quando suas funções e interações com o hospedeiro foram descobertas é que os estudos sobre eles se intensificaram (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Os micro-organismos endofíticos são didaticamente diferenciados dos epifíticos (colonizam a superfície da planta) e dos patogênicos (causam danos ao hospedeiro). Tal distinção não é bem delimitada, visto que existe um gradiente que os separa. Durante o ciclo de vida um epifítico poderia habitar o interior da planta, um endófito poderia causar doenças a ela, ou um patógeno poderia ser considerado endófito se no momento não afetasse negativamente o hospedeiro (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Sendo assim, em um dado momento a simbiose pode ser de mutualismo (endófito) e em outro de fitopatogênese (patógeno) (TAN; ZOU, 2001).

O resultado dessa interação depende de três fatores: a virulência do micro-organismo, a defesa do hospedeiro e as condições ambientais (SCHULZ; BOYLE, 2005). Quando há um distúrbio nesses fatores, causado por exemplo,

a partir de um estresse ambiental ou envelhecimento vegetal, o endófito pode ocasionar danos ao hospedeiro (Figura 1). No momento em que essas interações estão alinhadas, observa-se a infecção assintomática. Essa colonização seria o resultado do equilíbrio do antagonismo, onde os fatores de virulência do micro-organismo e de defesa do hospedeiro estão harmonizados, resultando em uma estratégia de sobrevivência para ambos (SCHULZ; BOYLE, 2005).

Figura 1 - Interação endófito e hospedeiro: Doença x Antagonismo Balanceado.
Fonte: Adaptado de SCHULZ; BOYLE (2005).



Acredita-se que a relação mutualística entre o endófito e o hospedeiro seja resultante de uma co-evolução, pois o mesmo micro-organismo pode ser encontrado em diferentes hospedeiros, entretanto, com interações distintas com eles (CHAPLA, BIASETTO, ARAÚJO, 2013). Através dessa relação, os micro-organismos endofíticos recebem proteção e nutrientes; e em contrapartida, a planta hospedeira pode ter a tolerância aumentada contra herbivoria, fitopatógenos, parasitas, estresse hídrico, etc (CARROLL, 1988; CHAPLA, BIASETTO; ARAÚJO, 2013; ZHANG et al., 2006). A herbivoria prejudica o hospedeiro e conseqüentemente a sobrevivência dos endófitos, portanto, como estratégia para o seu combate, são produzidas substâncias que diminuem a atratividade pela planta, que levam à inibição do desenvolvimento dos insetos ou que aumentam a susceptibilidade dele às doenças (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Carroll (1988) questiona a necessidade da planta em possuir endófitos, visto que o hospedeiro já produz substâncias que conferem certa resistência à

herbivoria e à patogenicidade. O autor ressalta a necessidade da variabilidade química das substâncias para que a resistência a esses agentes seja realmente eficaz. Uma planta vive muitos anos e seu genótipo apresenta poucas variações durante esse tempo, entretanto, insetos e micro-organismos patogênicos possuem um ciclo de vida menor e maiores chances a cada geração de se especializarem e superarem as defesas produzidas pela planta. Portanto, o papel da produção de substâncias pelos endófitos seria mais uma estratégia para a planta se defender de fitopatógenos e herbívoros (CARROLL, 1988) contribuindo no papel de adaptação da planta ao ambiente (SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Existe a possibilidade de utilização dos micro-organismos endofíticos na agricultura, através do biocontrole e da promoção do crescimento das plantas. No controle biológico, o endófito inserido no hospedeiro exerce a produção de substâncias antimicrobianas e atua na competição com patógenos por espaço e nutrientes. Na promoção do crescimento das plantas através da produção de fito-hormônios pelos endófitos ou pela maior absorção de elementos como nitrogênio e fósforo promovida por eles (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; TAN; ZOU, 2001). Então a promoção do crescimento das plantas poderia ser auxiliada pela presença dos endófitos. Portanto, a potencial substituição dos agrotóxicos pelos micro-organismos endofíticos proporcionaria uma produção agrícola ecológica e economicamente sustentável (SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Outra aplicabilidade desses micro-organismos envolve a biologia molecular onde os micro-organismos endofíticos recebem genes relacionados com a produção de antibióticos, hormônios, vitaminas e outras substâncias de interesse e são reintroduzidos no hospedeiro, atuando como vetores com o objetivo de introduzir essas características na planta (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002; SANTOS; VARAVALLO, 2011).

A interação entre o endófito e seu hospedeiro é complexa e ao longo do tempo eles podem co-evoluir para uma adaptação na qual o endófito pode captar parte do DNA da planta para o seu genoma. Tal possibilidade pode resultar na produção microbiana de substâncias antes associadas ao hospedeiro (STROBEL, 2003; ZHANG et al., 2006). Tomando esse conceito, a

biossíntese de substâncias de interesse por endófitos seria um recurso inovador para uma produção mais eficiente (ZHAO et al., 2010).

A partir da análise dos metabólitos produzidos por quinze *Pestalotiopsis microspora* isolados de plantas de diferentes continentes observou-se que apesar de se tratar da mesma espécie microbiana, existia uma variedade de substâncias produzidas entre as cepas, o que pode ser ocasionado por mutação genética, cruzamento genético e até mesmo troca de material genético com seus hospedeiros (STROBEL, 2003).

O taxol® (paclitaxel) foi originalmente isolado de cascas de *Taxus brevifolia* (teixo do Pacífico) e possui ação contra os cânceres de próstata, ovário, mama e pulmão (ZHAO et al., 2010; KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014). Para a realização dos testes clínicos foi necessário sacrificar 4 mil árvores para obtenção de 360 g da substância, e 38 mil árvores foram utilizadas para gerar 25 Kg de taxol® para o tratamento de 12 mil pacientes (BRANDÃO et al., 2010). Apesar de ser obtido de plantas selvagens, alternativas vêm sendo procuradas para satisfazer a demanda do mercado e diminuir o impacto causado pela sua obtenção minimizando o risco de extinção dessa espécie. Dentre elas, encontram-se a cultura de células/tecidos, cultivo em campo e síntese química, contudo, obstáculos como rendimento, demora na produção e altos custos tornam essas alternativas pouco viáveis (ZHAO et al., 2010).

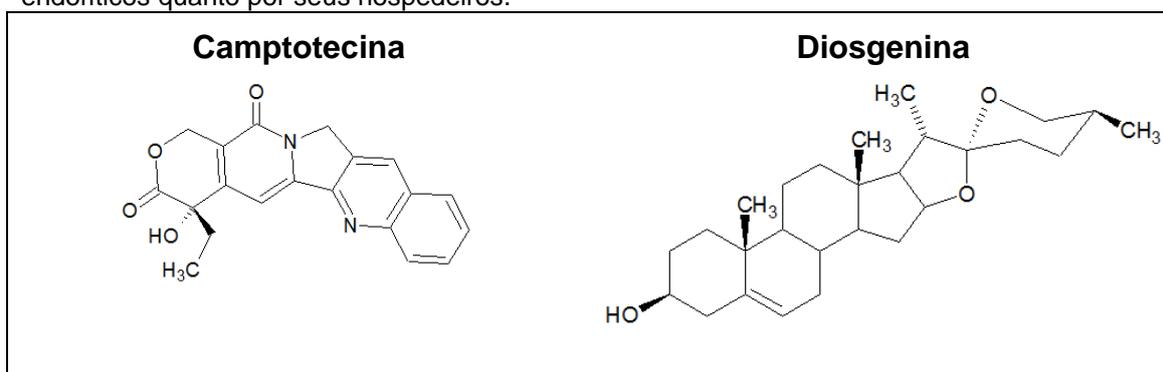
Uma promissora produção do taxol® surgiu a partir da descoberta de outro produtor dessa substância: o fungo endofítico *Taxomyces andreanae*. Após o isolamento de micro-organismos provenientes de 25 *T. brevifolia* de 20 localidades diferentes, o fungo foi encontrado a partir do floema de uma antiga árvore (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Atualmente pelo menos 19 gêneros de fungos endofíticos possuem a capacidade de produzir taxol® ou seus similares, dentre eles estão *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Sporormia* e *Trichothecium* (KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014; ZHAO et al., 2010). Esses fungos endofíticos foram isolados não apenas no gênero *Taxus*, mas também em *Cardiospermum helicacabum*, *Citrus medica*, *Cupressus* sp., *Ginkgo biloba*, *Hibiscus rosasinensis*, *Podocarpus* sp., *Taxodium distichum*, *Terminalia arjuna*, *Torreya*

grandifolia e *Wollemia nobilis* (ZHAO et al., 2010). Strobel (2003) relata a distribuição mundial de fungos produtores de taxol, não sendo limitada apenas aos endófitos do teixo, e sugere que a origem do taxol pode ser de fungos e em algum momento ter ocorrido uma transferência lateral de genes dos micro-organismos para as plantas.

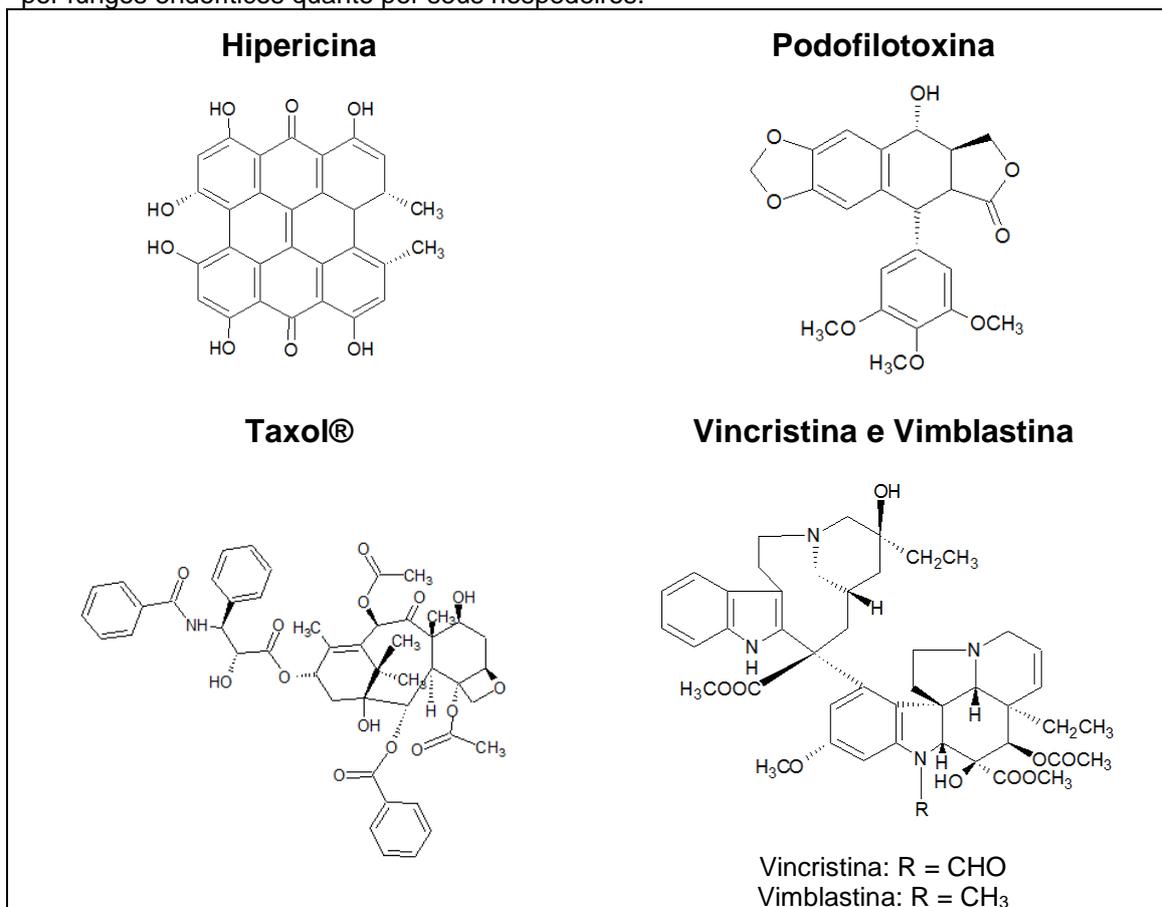
Outros exemplos são: o fungo endofítico *Fusarium oxysporum* e sua hospedeira *Catharanthus roseus*, ambos produtores de vincristina e vimblastina, alcaloides indólicos com atividade anticâncer (KUMAR; PATIL, RAJAMOCHANAN; AHMAD, 2013) e o fungo *Mucor fragilis* isolado de *Sinopodophyllum hexandrum*, co-produtores de podofilotoxina (fármaco anticancerígeno) (HUANG et al., 2014). Também destacam-se as substâncias: camptotecina (*Camptotheca acuminata* e *Fusarium solani*; *Nothapodytes foetida* e *Entrophospora infrequens*), hipericina (*Hypericum perforatum* e *Chaetomium globosum*) e diosgenina (*Paris polyphylla* var. *yunnanensis* e *Cephalosporium* sp. e *Paecilomyces* sp.) produzidas pela planta hospedeira e por seus endófitos (Figura 2) (ZHAO et al., 2010).

Os estudos das rotas metabólicas dessas substâncias podem ser direcionados para os micro-organismos produtores, pois a menor complexidade genômica facilitaria os estudos de engenharia genética para a produção ou manipulação dessas substâncias (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Figura 2 - Exemplos de estruturas de substâncias bioativas produzidas tanto por fungos endofíticos quanto por seus hospedeiros.



Continuação da Figura 2 - Exemplos de estruturas de substâncias bioativas produzidas tanto por fungos endofíticos quanto por seus hospedeiros.



2.3. Metabolismo secundário e substâncias bioativas

Os micro-organismos endofíticos apresentam metabolismo muito diversificado que pode resultar na biossíntese de substâncias com grande valor na química de produtos naturais: os metabólitos secundários (CALVO; WILSON; BOK; KELLER, 2002; KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Estas substâncias apresentam baixo peso molecular, estrutura química complexa e diversa, distribuição restrita entre as espécies, não sendo essenciais para a vida do organismo, mas fundamentais para a adaptação e/ou sobrevivência dele em um determinado ambiente (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

Os metabólitos secundários são originados de intermediários ou de produtos do metabolismo primário sendo produzidos em uma quantidade inferior que estes, que são universais e indispensáveis para a vida do organismo (MALIK, 1980). Triptofano, leucina, metionina, lisina, valina,

fenilacetato e fenilalanina são exemplos de produtos do metabolismo primário que atuam como precursores ou indutores da biossíntese de metabólitos secundários (DEMAIN, 1998). A partir de um pequeno número de substâncias do metabolismo primário, são feitas alterações estruturais, modificações no número de átomos e esqueletos básicos, inserções de átomos de oxigênio, enxofre, nitrogênio, cloro, etc. surgindo as diversificações das moléculas do metabolismo secundário (MALIK, 1980). A síntese destas substâncias em fungos é realizada a partir de uma ou da combinação de vias biossintéticas como a via do acetato mevalonato e do acetato malonato (SCHULZ; BOYLE, 2005). Como resultado das interações biossintéticas que compõem este metabolismo estão os três principais grupos de metabólitos secundários: os terpenos, as substâncias fenólicas e as substâncias nitrogenadas (TAIZ; ZEIGER, 2006).

A atuação destas substâncias nos organismos ainda é pouco conhecida, mas sabe-se que alguns metabólitos secundários podem participar na diferenciação morfológica dos fungos, bem como na participação no aumento da ramificação de hifas, nas taxas do desenvolvimento assexuado e sexuado, no processo de esporulação e na produção de outros metabólitos secundários (CALVO et al., 2002). As substâncias resultantes desse metabolismo desempenham importantes funções na relação endófito-planta, participando da sinalização, defesa e regulação da simbiose (SCHULZ; BOYLE, 2005). Sabe-se também que geralmente eles são sintetizados pelos micro-organismos na fase estacionária, quando há uma redução na taxa de crescimento microbiano e escassez de nutrientes (CALVO et al., 2002; DEMAIN, 1998).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos possuem ampla diversidade estrutural e pertencem a diferentes classes como: alcaloides, esteroides, xantonas, fenóis, isocumarinas, terpenos etc. (SCHULZ; BOYLE, 2005). Os fungos endofíticos são uma rica fonte de novos produtos naturais e seus metabólitos secundários podem apresentar relevantes atividades biológicas (Tabela 1). Estas substâncias podem atuar como antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, antidiabetes, antivirais, antitumorais, imunossupressoras, pigmentos, toxinas, hormônios, pesticidas, dentre outros, o que as caracteriza como uma importante fonte de produtos

naturais bioativos (AMBROSE; CHRISTAPHER; SUBHASH, 2013; CALVO et al., 2002; CHAPLA, BIASETTO, ARAÚJO, 2013; DEMAIN, 1998; SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Este amplo espectro de atividades biológicas das substâncias dos endófitos desencadeou o aumento de estudos com estes fungos e resultou em 250 artigos entre os anos 2000 e 2009 (CHAPLA, BIASETTO, ARAÚJO, 2013). Desse modo, as substâncias produzidas pelos micro-organismos endofíticos têm grande importância ecológica e bioquímica além de aplicabilidade econômica seja na medicina, na indústria de alimentos, de tecidos, de detergentes, na biologia molecular e na agricultura (CALVO et al., 2002; DEMAIN, 1998; KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Tabela 1 - Exemplos de fungos endofíticos, seus hospedeiros e suas substâncias bioativas.

Endófito/ Hospedeiro	Substância Isolada	Atividade Biológica	Referência
<i>Xylaria</i> sp./ <i>Piper aduncum</i> (Piperaceae)	Citocalasinas	Citotóxica contra células HeLa	(SILVA et al., 2010)
<i>Phomopsis cassiae</i> / <i>Cassia spectabilis</i> (Fabaceae)	Sesquiterpenos	Antifúngica Inibidora de Acetilcolinesterase	(ZANARDI et al., 2012)
<i>Trichoderma</i> sp./ <i>Huperzia serrata</i> (Lycopodiaceae)	Huperizina A	Antioxidante Inibidora de Acetilcolinesterase	(DONG; FAN; LING; HUANG; WEI, 2014)
<i>Microsphaeropsis</i> sp. <i>Seimatosporium</i> sp./ <i>Salsola oppositifolia</i> (Amaranthaceae)	Microsfaerol Seimatorona	Antibacteriana Antifúngica Antialga	(HUSSAIN et al., 2015)
<i>Fusarium tricinctum</i> <i>Alternaria alternata</i> / <i>Solanum nigrum</i> (Solanaceae)	Ácido indol-acético	Promoção de crescimento do vegetal	(KHAN et al., 2015)

*Hospedeiro não informado.

Continuação da Tabela 1 - Exemplos de fungos endófitos, seus hospedeiros e suas substâncias bioativas.

Endófito/ Hospedeiro	Substância Isolada	Atividade Biológica	Referência
<i>Alternaria alternata</i> <i>Fusarium proliferatum</i> / <i>Salvia miltiorrhiza</i> (Lamiaceae)	Fenóis Flavonoides	Antioxidante	(LI et al., 2015)
<i>Fusarium sp.</i> / <i>Caesalpinia echinata</i> (Fabaceae)	Beauvericina	Tripanossomicida	(CAMPOS et al., 2015)
<i>Pestalotiopsis</i> <i>microspora</i> /*	Hidrolase serina	Biorremediação	(RUSSELL et al., 2011)
<i>Coccomyces proteae</i> / <i>Disterigma humboldtii</i> (Ericaceae)	Compostos fenólicos	Antiangiogênica	(CAO et al., 2012)
<i>Aurapex penicillata</i> / <i>Geonoma</i> <i>hoffmanniana</i> (Palmae)	Substâncias fenólicas	Antiangiogênica	(CAO et al., 2012)
<i>Aspergillus sp.</i> <i>Phoma sp.</i> / <i>Salvadora oleoides</i> (Salvadoraceae)	Fenóis 2,6-di- <i>terc</i> -butil- <i>p</i> - cresol 2,6-bis(1,1-dimetiletil)- 4-metil	Antidiabética	(DHANKHAR; DHANKHAR; YADAV, 2013)

*Hospedeiro não informado.

As pesquisas fitoquímicas revelam a produção de metabólitos secundários com grandes potenciais para a biotecnologia, entretanto fatores ambientais como chuvas, seca, exposição ao sol, dentre outras, atuam na instabilidade e variabilidade de produção e comprometem o seu uso para este fim (ZANCA, 2015). Nesse âmbito, o bioprocessamento de endófitos que produzem substâncias de seus hospedeiros poderia substituir o uso de plantas para a obtenção dessas substâncias. Isto tornaria o processo vantajoso pois não

existem interferências das variáveis ambientais como acontece com as plantas (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

A produção fúngica pode ser simples e abundante, o custo de produção é relativamente baixo e os parâmetros de cultivo são controlados (ZHAO et al., 2010). A otimização resultaria em um processo sustentável, com rendimento lucrativo, reprodutível e contínuo, característicos de uma escala industrial (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

Apesar de muito promissora, a produção de metabólitos secundários por micro-organismos endofíticos pode ser influenciada pela ausência de multifatores como a interação do endófito com o hospedeiro e com outros endófitos, as interferências de fatores bióticos, como a presença de patógenos e herbívoros, além das condições ambientais em que o hospedeiro está suscetível (KUSARI; KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014).

Outra problemática ao se utilizar essa “biotecnologia endofítica” é a viabilidade desse processo, que pode sofrer redução na produção dos metabólitos secundários após repetidas repicagens das linhagens, principalmente em culturas axênicas (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012). Portanto, a interação entre os micro-organismos endofíticos com seu hospedeiro e outros endófitos deve ser investigada possibilitando a produção industrial dos metabólitos secundários.

Nessa jornada para a descoberta de mais substâncias bioativas ou de novas formas de obtenção das já existentes, o primeiro passo para utilizar os micro-organismos endofíticos é o seu isolamento. A partir da realização da bioprospecção de seus metabólitos pode-se utilizar as ferramentas da engenharia genética, tecnologia metabólica (elucidação da via biossintética) e a otimização do cultivo microbiano para tornar esse processo realidade (ZHAO et al., 2010).

2.4. Fungos e a produção de alcaloides

Compondo a diversidade dos metabólitos secundários estão os alcaloides, uma classe de substâncias encontrada principalmente em vegetais (21.000 dentre os 27.000 conhecidos) e em menor quantidade em micro-

organismos e animais (DEWICK, 2002; MEYER; REZENDE; SOARES; TOMBA, 2013). Com estruturas muito complexas e diversificadas, são moléculas geralmente providas de relevantes atividades farmacológicas e toxicológicas (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os alcaloides são substâncias orgânicas que possuem em sua estrutura um ou mais átomos de nitrogênio em anel, os quais conferem o caráter básico à molécula que pode variar de acordo com a estrutura, localização e presença de outros grupos funcionais (DEWICK, 2002). Os átomos de nitrogênio são provenientes de aminoácidos como: ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico e histidina (DEWICK, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2006). Os esqueletos de carbono do aminoácido precursor do alcaloide podem se manter na estrutura ou apenas seu nitrogênio ser incorporado a ela. O restante da molécula pode ser derivado de substâncias das rotas biossintéticas do acetato, chiquimato e fosfato desoxixilulose (DEWICK, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2006). A sua estrutura também pode ser formada pela aminação de outros substratos como terpenos e esteroides (DEWICK, 2002).

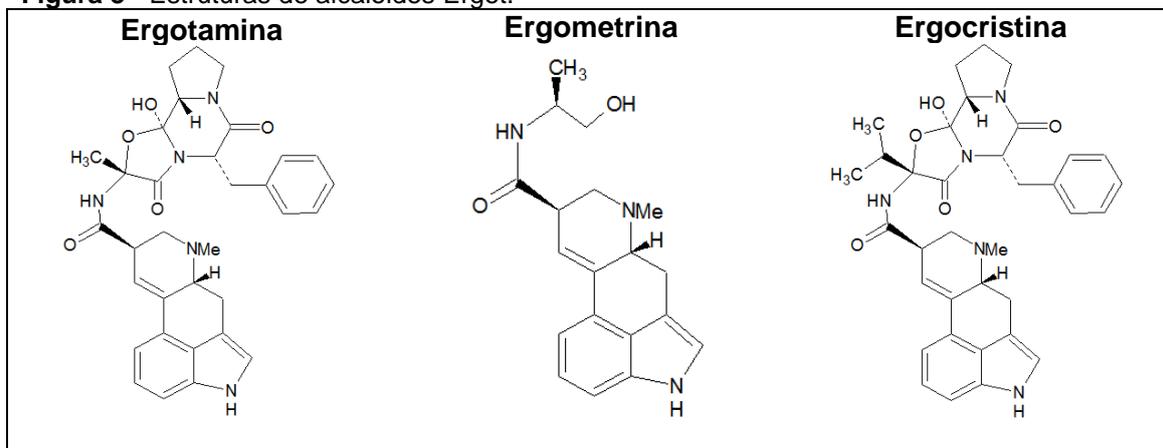
Muitos alcaloides possuem afinidade por sítios lipofílicos cerebrais o que possibilita seu uso como calmante, analgésico e até como narcótico (NETO; CAETANO, 2005). Como exemplo destaca-se a morfina, substância isolada da planta *Papaver somniferum* (papoula), utilizada pelos egípcios desde 1250 a.C. e até os dias atuais ele continua sendo empregado para o alívio de dores (NETO; CAETANO, 2005). Outros alcaloides de importantes aplicabilidades são: a codeína e a papaverina, também produzidos pela papoula, a cafeína proveniente de *Coffea arabica* (café) e a nicotina proveniente de *Nicotiana tabacum* (tabaco).

Os alcaloides exercem papel fundamental para a defesa da planta contra os predadores, como pode ser observado nos episódios de mortes de gado após a ingestão de plantas que possuem essas substâncias (TAIZ; ZEIGER, 2006). Apesar de algumas plantas serem conhecidas por causar intoxicação em animais, em alguns casos essa toxicidade não vem do vegetal, mas é proveniente de alcaloides produzidos por micro-organismos endofíticos encontrados nele (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

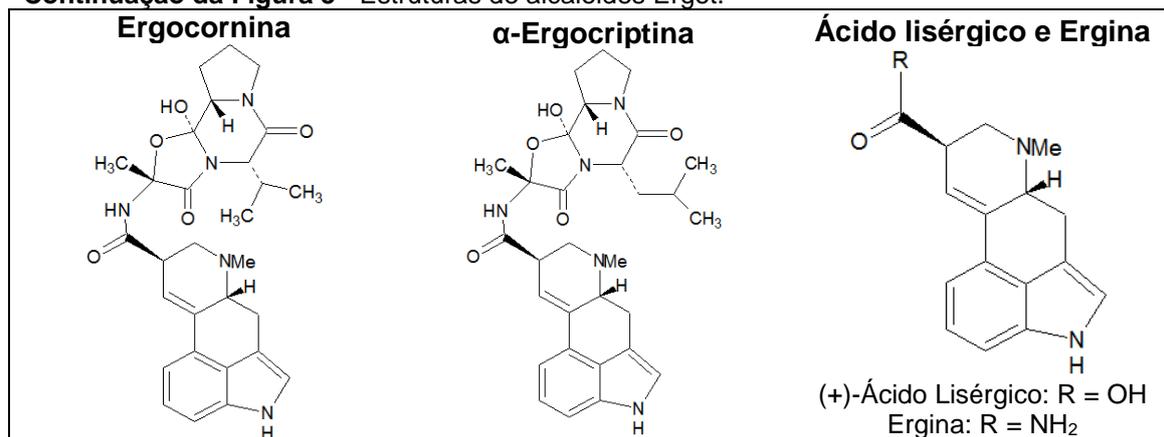
Os fungos também são produtores de alcaloides, dentre eles encontra-se o *Claviceps purpurea*, também conhecido como esporão-do-centeio por causar doenças nesta planta e em outros cereais como o milho, trigo e aveia. Existem relatos de que as pessoas na Europa Medieval eram acometidas por gangrena, ataques epilépticos, alucinações e até iam a óbito após a ingestão de cereais contaminados com os escleródios formados pelo fungo. Tal doença era conhecida como Fogo de Santo Antônio e era resultado da ação dos alcaloides no sistema nervoso central e na vasoconstrição (FLIEGER; WURST; SHELBY, 1997). Os alcaloides produzidos por este fungo são denominados alcaloides Ergot ou ergolinas (DEWICK, 2002), são alcaloides indólicos muito diversos que possuem várias atividades, sendo alguns já comercializados como a ergotamina (ergonovina), utilizada no controle da hemorragia puerperal e a ergometrina, indicada no combate às enxaquecas (NETO; CAETANO, 2005; SCOTT, 2007). Este fungo também é fonte de ergocristina, ergocornina, ergocriptina, ergina e ácido lisérgico (Figura 3) do qual sintetiza-se o LSD (dietilamida do ácido lisérgico), droga alucinógena que aumenta a pressão arterial e reduz os níveis de prolactina (GUERRE, 2015).

Outros fungos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Rhizopus* sp. e espécies endofíticas dos gêneros *Epichloë* (*Acremonium*) e *Balansia*, mesmo não produtoras das estruturas em forma de esporão, também sintetizam alcaloides Ergot (DEWICK, 2002; FLIEGER; WURST; SHELBY, 1997).

Figura 3 - Estruturas de alcaloides Ergot.



Continuação da Figura 3 - Estruturas de alcaloides Ergot.



Os gêneros *Xylaria*, *Phoma*, *Hypoxyylon* e *Chalara* são produtores de alcaloides conhecidos como citocalasinas, e apesar de muitos destes apresentarem atividades antibióticas e antitumorais, as suas toxicidades celulares são um entrave para o desenvolvimento de medicamentos (STROBEL, 2003).

Muitas pesquisas de bioprospecção de fungos endofíticos vêm revelando a produção de alcaloides por eles e relevantes atividades biológicas. O extrato de acetato de etila do caldo metabólico de *Xylaria* sp. endofítico de *Piper aduncum* (Piperaceae) apresentou seis citocalasinas (19,20-epoxicitocalasina D, C, N, Q e R) (Figura 4-A). Cinco dessas substâncias demonstraram fraca atividade contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* e quatro, forte atividade contra células HeLa (SILVA et al., 2010). O fungo endofítico *Rhinocladiella* sp. isolado de *Tripterygium wilfordii* (Celastraceae) produziu citocalasina E (Figura 4-B) e três citocalasinas anteriormente não descritas: 22-oxa-[12]-citocalasina 1, 2 e 3 (WAGENAAR; CORWIN; STROBEL; CLARDY, 2000).

Isolado a partir de folhas de *Melia azedarach* (Meliaceae), o fungo *Fusarium* sp. LN-12 é produtor do alcaloide fusarimina A (Figura 4-C) (YANG et al., 2012). O alcaloide penibrugueramina A (Figura 4-D) foi isolado do endófito *Penicillium* sp. a partir do hospedeiro *Bruguiera gymnorrhiza* (Rhizophoraceae) (ZHOU et al., 2014).

O fungo *Alternaria tenuissima* isolado de *Cephalotaxus hainanensis* (Cephalotaxaceae) é produtor de homoharringtonina (Figura 4-E), um alcaloide

também encontrado em seu hospedeiro e eficaz no tratamento da leucemia mieloide crônica (HU et al., 2016).

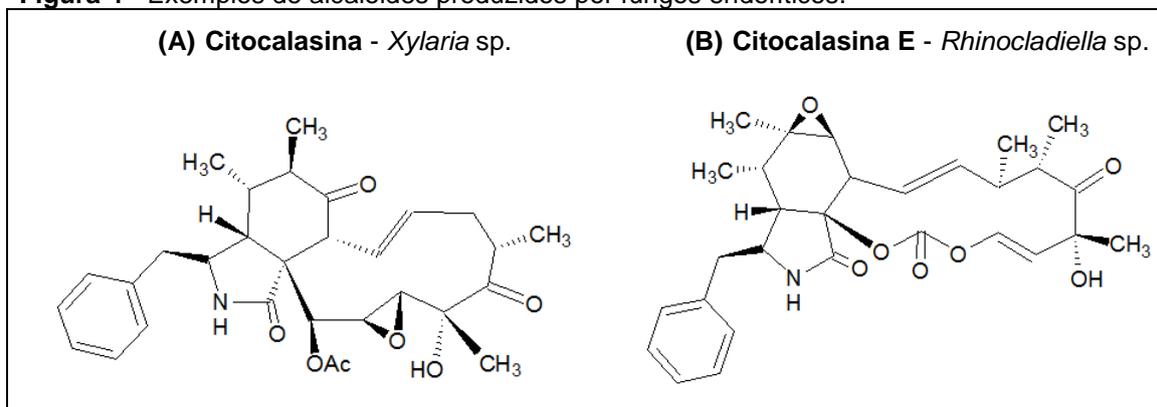
Isolado a partir de folhas de *Adenophora axilliflora* (Campanulaceae), o endófito *Chaetomium* sp. sintetizou o alcaloide chaetominina (Figura 4-F) que demonstrou uma maior atividade contra linhagens de células de leucemia e de câncer de cólon do que a droga padrão 5-fluorouracil (JIAO et al., 2006).

O alcaloide rohituquina (Figura 4-G) foi produzido por *Fusarium proliferatum* isolado de cascas de *Dysoxylum binectariferum* (Meliaceae). Além do hospedeiro, essa substância já foi isolada de outras plantas como *Amoora rohituka* (Meliaceae), *Dysoxylum binectariferum* (Meliaceae) e *Schumanniohyton problematicum* (Rubiaceae) e possui importantes características como atividades anti-inflamatória, anti-câncer e imunomoduladora (MOHANA KUMARA et al., 2012).

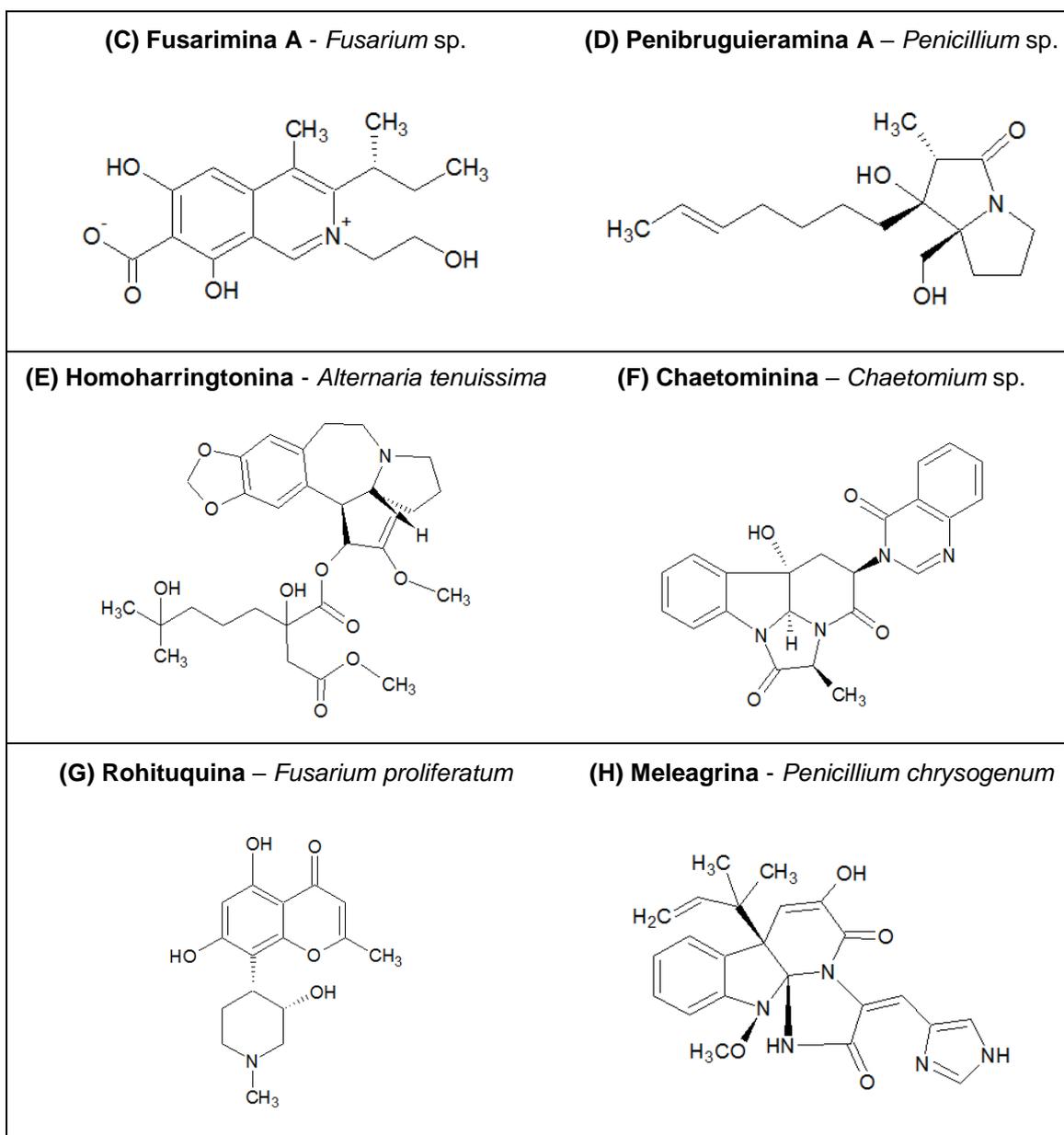
O endófito *Penicillium chrysogenum* encontrado em folhas de *Olea europea* (Oleaceae) produz meleagrina (Figura 4-H), um alcaloide capaz de inibir o crescimento de linhagens de células de câncer de mama e não atuar na viabilidade das células epiteliais mamárias não-tumorais (MADY et al., 2016).

Portanto, considerando as importantes atividades biológicas e grandes possibilidades de aplicação, os estudos de alcaloides de fungos endofíticos são extremamente pertinentes para a química de produtos naturais e para a biotecnologia (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005; ZHAO et al., 2010).

Figura 4 - Exemplos de alcaloides produzidos por fungos endofíticos.



Continuação da Figura 4: Exemplos de alcaloides produzidos por fungos endofíticos.



2.5. A família Rubiaceae Juss. e suas características

A família Rubiaceae ocupa o quarto lugar entre as Angiospermas com maiores diversidades de espécies (Orchidaceae, Asteraceae e Fabaceae). Estudos sistemáticos vêm sendo realizados para uma melhor divisão desta família e atualmente ela encontra-se dividida em três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae. Como observado na Figura 5, sua distribuição é cosmopolita, entretanto há uma maior concentração nos trópicos

(GOVAERTS; FRODIN; RUSHAM; BRIDSON; DAVIS, 2007; SILVA NETO; PEIXOTO, 2012).

Essa família contém aproximadamente 13.673 espécies distribuídas em 609 gêneros (THE PLANT LIST, 2013a), seu tamanho é tão significativo que estima-se que de 10 a 20% da diversidade nos trópicos do Velho Mundo é de rubiáceas (GOVAERTS et al., 2007). O Brasil abriga 124 gêneros e 1.392 espécies distribuídas em todas as regiões com domínios geográficos na Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Desse total, 33 gêneros e 539 espécies podem ser encontradas na Amazônia (REFLORA, 2016). Seus representantes são muito diversos, incluindo ervas, cipós, arbustos até pequenas e grandes árvores, com tamanhos variados de 5 mm até 55 m de altura (*Spermacoce* spp. e *Chimarrhis* spp., respectivamente) (DELPRETE; JARDIM, 2012).

Figura 5 - Distribuição da família Rubiaceae no globo terrestre.



FONTE: TROPICOS.ORG, 2016.

Além da grande diversidade de espécies, as plantas que compõem essa família possuem um enorme potencial econômico. Neste aspecto encontra-se *Genipa americana* (jenipapo) e *Coffea arabica*, a espécie mais conhecida e cultivada desta família, apresentando uma grande importância na indústria alimentícia por dar origem ao café. Algumas espécies também possuem características medicinais sendo utilizadas na medicina científica até a popular, como *Cinchona officinalis*, da qual extrai-se o quinino, alcaloide utilizado no

tratamento da malária, *Cephaelis ipecachunha*, produtora de emetina, que possui efeitos expectorantes, eméticos e anti-helmintícos, e *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) utilizada pela população em casos de artrite, diabetes, asma, etc. A versatilidade do uso destas plantas chega até a atividade horticultural onde elas podem ser encontradas na ornamentação de parques e jardins, como os gêneros *Gardenia*, *Ixora* e *Mussaenda* (CAMPOS; BRITO, 1999; SAHU; MAHATO, 1982; SILVA NETO; PEIXOTO, 2012).

A família Rubiaceae encontra-se entre as 20 famílias de plantas produtoras de alcaloides. Com grande diversidade estrutural, as rubiáceas produzem treze classes diferentes de alcaloides, sendo os indólicos os mais frequentes (391) seguidos dos quinolínicos (70) (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001). Para esta família, os alcaloides indólicos são os principais marcadores químicos (CARBONEZI et al., 2004).

Martins e Nunez (2015) relatam os iridoides, os alcaloides indólicos e as antraquinonas como sendo as principais classes de metabólitos secundários nas subfamílias Ixoroideae, Cinchonoideae e Rubioideae, respectivamente. Substâncias como esteroides, fenóis simples, flavanonas, flavanois, leucoantocianidinas, terpenoides (diterpenos e triterpenos), cumarinas e taninos também já foram encontrados nos representantes desta família. A maior diversidade química é encontrada na subfamília Rubioideae (DUARTE et al., 2014; MARTINS; NUNEZ, 2015; MESQUITA et al., 2015).

Nas investigações biológicas realizadas por Mesquita e colaboradores (2015) observa-se o potencial biotecnológico e farmacêutico de espécies desta família. O extrato metanólico de folhas de *F. goudotiana* apresentou DL₅₀ inferior a 5 µg/mL nos testes contra *Artemia salina*. Nesse mesmo teste, os extratos diclorometânicos de *F. goudotiana*, *F. hirsuta* e *F. paraensis* e o extrato metanólico de *F. paraensis* apresentaram DL₅₀ inferior a 1000 µg/mL. Quanto à atividade antioxidante destacam-se os extratos metanólicos de *Ferdinandusa goudotiana*, *F. hirsuta*, *F. paraensis* e *Ferdinandusa* sp. Atividade antifúngica foi detectada nos extratos de *F. hirsuta* e *F. paraensis* contra *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*, e *F. hirsuta* também atuou contra *Epidermophyton floccosum* (MESQUITA et al., 2015). Atividades antifúngicas contra *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*

foram observadas em *F. paraensis*, *F. hirsuta*, *Palicourea corymbifera* e *P. guianensis* (RODRIGUES et al., 2014).

O potencial antimicobacteriano e citotóxico contra as linhagens celulares Vero (células de rim de macaco) e C3A (células de fígado humano) foi investigado em quinze espécies de rubiáceas. Os testes indicaram a presença de pelo menos 40 diferentes substâncias com atividade antimicobacteriana nos extratos de acetona de folhas. As espécies *Psychotria zombamontana*, *P. capensis*, *Keetia* sp., *Oxyanthus speciosus*, *Cephalanthus natalensis*, *CreMASpora triflora* e *Mussaenda arcuata* apresentaram boa atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium smegmatis*, *M. aurum* e *M. tuberculosis*. No teste de citotoxicidade, *P. capensis*, *P. zombamontana* e *H. parvifolium* foram mais tóxicos contra a linhagem celular Vero e *P. capensis* contra as células C3A. Na pesquisa, *O. speciosus* demonstrou-se mais promissor possuindo o maior número de compostos ativos contra as micobactérias, baixa concentração inibitória mínima (0,06 mg/mL) e menor citotoxicidade (ARO et al., 2015).

Um estudo realizado com *Bathysa australis* demonstrou a presença de alcaloides, antraquinonas, cumarinas, polifenóis (taninos) e saponinas em extratos metanólicos das folhas. O teste de toxicidade frente à *Artemia salina* apresentou uma CL₅₀ de 684 ± 9,04 µg/mL (POMPILHO; MARCONDES; OLIVEIRA, 2014).

Os micro-organismos associados às plantas desta família também podem produzir substâncias de interesse biotecnológico e importantes atividades biológicas, como o fungo epifítico *Seimatoantlerium tepuiense*, isolado de folhas de *Maguireothamnus speciosus*, que é produtor do taxol (STROBEL et al., 1999).

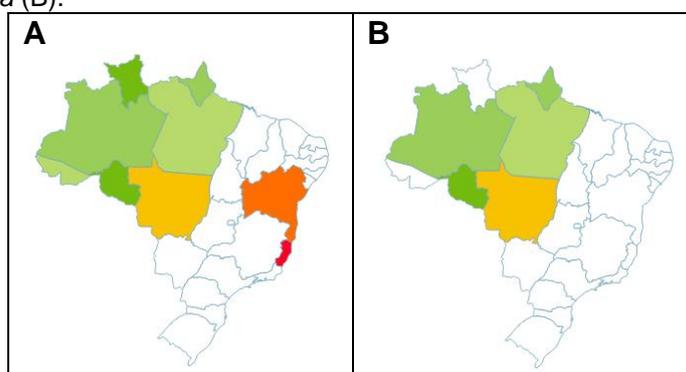
2.6. Gênero *Duroia* L. f.

O Gênero *Duroia* é composto por 38 espécies (THE PLANT LIST, 2013b), dentre essas, 24 são nativas do Brasil e compõem a flora da Amazônia, do Cerrado e da Mata Atlântica. No Brasil, elas estão distribuídas

nos estados da Bahia, Mato-Grosso, Espírito Santo, Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima (REFLORA, 2016) (Figura 6).

O gênero é conhecido pela associação com formigas, como a que pode ser observada entre *D. hirsuta* e *Myrmelachista schumanni*, cuja interação resulta em abrigo para as formigas e proteção para a planta contra invasão da vegetação ao redor pela presença de ácido fórmico produzido pelo inseto (CAMPOS; BRITO, 1999; FREDERICKSON; GREENE; GORDON, 2005).

Figura 6 - Distribuição geográfica no território brasileiro do gênero *Duroia* L. f. (A) e da espécie *Duroia macrophylla* (B).



FONTE: (REFLORA, 2016).

Apesar dos dados fitoquímicos e pesquisas sobre atividades biológicas serem muito escassos, as informações existentes sobre este gênero revelam um grande potencial biotecnológico de *Duroia* sp. Isto pode ser observado em *Duroia hirsuta*, uma planta utilizada como corante e cujas cascas têm ação cicatrizante. Os extratos metanólicos de suas folhas apresentaram atividade contra *Mycobacterium phlei*, *Herpes simplex*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, e suas raízes possuem substâncias como flavonol-3-O-metil, flavonol, iridoide lactona (duroina) e iridoide tetracíclico (plumericina) (AQUINO et al., 1999; KHAN; ATHER; THOMPSON; GAMBARI, 2005; LOPEZ; HUDSON; TOWERS, 2001; PAGE; MADRIÑÁN; TOWERS, 1994).

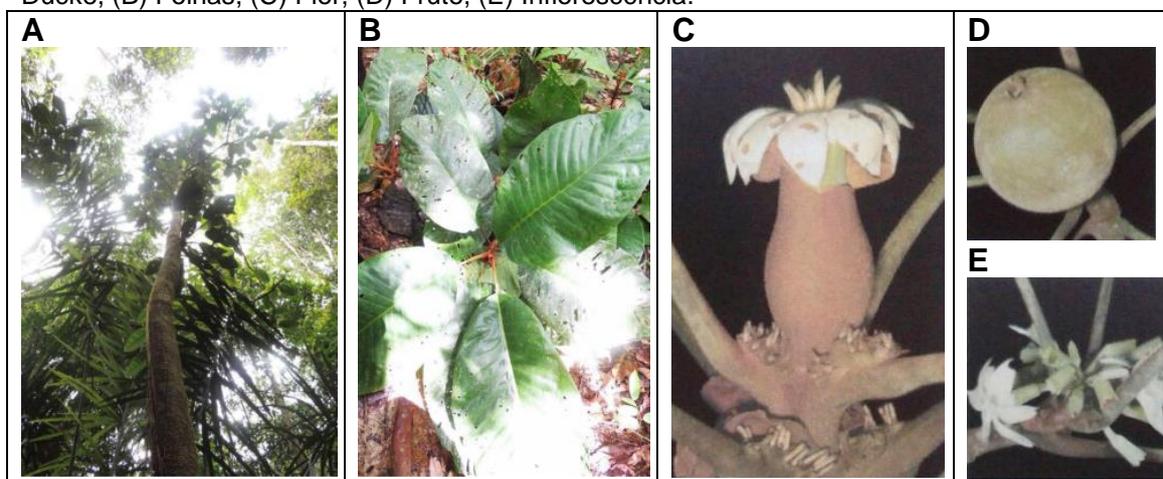
Na investigação fitoquímica de extratos diclorometânicos e metanólicos de folhas de *Duroia saccifera* foram encontrados alcaloides, fenóis simples, flavononas e flavonóis em ambos os extratos, além de triterpenoides nos extratos metanólicos. Nos testes qualitativos e quantitativos, os extratos apresentaram potencial atividade antioxidante (MESQUITA et al., 2015).

Com relação aos micro-organismos endofíticos de *Duroia* sp. os dados são ainda mais restritos, atendo-se apenas a *D. hirsuta*, de onde uma nova espécie fúngica foi isolada. Forcina e colaboradores (2015) isolaram do tronco desta planta uma nova espécie fúngica: *Stelliosphaera formicum*. A bioprospecção do líquido metabólico deste fungo originou dois conjugados sesquiterpenos-poliol: esteliosferois A e B que apresentaram atividade contra *S. aureus* (CIM de aproximadamente 250 µg/mL). Tal estudo revelou a importância deste tipo de pesquisa que pode resultar em novas descobertas taxonômicas e químicas (FORCINA et al., 2015).

2.7. *Duroia macrophylla* Huber

Duroia macrophylla Huber é nativa da Floresta Amazônica, sua distribuição é restrita ao Brasil (Pará, Amapá, Rondônia, Amazonas e Mato Grosso) e Guianas (REFLORA, 2016) (Figuras 6 e 7). Trata-se de uma espécie arbórea com aproximadamente de 15-20 m de altura e 12-25 cm de diâmetro, que possui como sinônimo *Coupou brasiliensis* Wernham (REFLORA, 2016; TAYLOR; CAMPOS; ZAPPI, 2007). É popularmente conhecida como cabeça-de-urubu, apuruí, puruí, puruí da mata ou puruí grande da mata (CAMPOS; BRITO, 1999; FONSECA; LISBOA; URBINATI, 2005; REIS; RUSCHEL; COELHO; LUZ; MARTINS-DA-SILVA, 2010; RESQUE, 2007).

Figura 7 - Imagens de *Duroia macrophylla* Huber. (A) Aspecto geral da árvore na Reserva A. Ducke, (B) Folhas, (C) Flor, (D) Fruto, (E) Inflorescência.



Fonte: ZANCA (2015) ^{A e B}, CAMPOS; BRITO (1999) ^{C, D e E}.

Os estudos fitoquímicos realizados em galhos e folhas desta espécie revelaram a presença de terpenos, alcaloides, substâncias fenólicas e flavonoides (MARTINS, 2014; MARTINS et al., 2014; NUNEZ; VASCONCELLOS, 2012; NUNEZ et al., 2012).

Relevantes atividades biológicas foram descobertas em extratos e substâncias provenientes desta espécie. No teste de toxicidade frente à *A. salina* os extratos metanólicos e diclorometânicos de folhas e galhos apresentaram CL₅₀ abaixo de 700 µg/mL, com destaque para o extrato metanólico de folhas cujo valor de CL₅₀ foi de 64,8 µg/mL (MARTINS et al., 2014). Em testes antioxidantes, os extratos metanólicos de folhas e galhos mostraram-se extremamente ativos a ativos (MARTINS et al., 2014). Moderada atividade inseticida contra indivíduos adultos de *Sitophilus zeamais* foi observada em extratos metanólicos de galhos e diclorometânicos de galhos e folhas (MARTINS et al., 2014).

Martins (2014) observou atividade antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae* e *Flavobacterium columnare* nos extratos metanólicos e diclorometânicos de galhos e folhas. Também observou-se atividade contra: *Nocardia brasiliensis* que foi inibida pela atividade dos extratos de DCM e MeOH de folhas, *Salmonella enteritidis* pelo extrato de MeOH-Galho, *Bacillus cereus* por MeOH-Folha e *Aeromonas hydrophilla* pelo extrato DCM-Folhas. O ácido oleanólico isolado das folhas apresentou concentração inibitória mínima de 500 µg/mL contra *Nocardia brasiliensis* e *Serratia marcescens* (MARTINS, 2014).

Martins e colaboradores (2013) realizaram um estudo fitoquímico e avaliaram o potencial antimicobacteriano de dois indivíduos localizados em diferentes partes da Amazônia. A partir das folhas e galhos foram obtidos os extratos diclorometânicos e metanólicos que mostraram-se ativos contra *Mycobacterium tuberculosis* (exceto um extrato metanólico de galho). O extrato diclorometânico de folhas apresentou-se mais ativo, de onde foram isolados os triterpenos ácido oleanólico e ursólico.

Os alcaloides indólicos raunitidina, 9-metoxiajmalicina e 10-metoxiajmalicina (cabucina) foram isolados a partir de extratos metanólicos

desta espécie (NUNEZ et al., 2009, 2012). No teste de toxicidade frente à *A. salina* este extrato apresentou DL₅₀ de 40 µg/mL (NUNEZ et al., 2012).

Um novo alcaloide indólico isolado das folhas desta espécie apresentou atividade antitumoral e baixa toxicidade para células saudáveis. Este alcaloide originou a patente: “Composição farmacêutica antitumoral compreendendo alcaloide, processo para sua obtenção, e seu uso” (NUNEZ; VASCONCELLOS, 2012).

O estudo promissor de extratos diclorometânicos e metanólicos de galhos desta espécie desencadeou o isolamento de oito alcaloides indólicos monoterpênicos, descritos pela primeira vez no gênero, com atividade antimicrobiana (*M. tuberculosis* pan-sensível H37Rv e INHr-monorresistente ao antibiótico isoniazida). Esta pesquisa gerou outra patente intitulada: “Uso de composto, método *ex-vivo*, processo e extrato purificado” (NUNEZ; MARTINS; RAMOS; SILVA, 2014).

Devido à importância desses alcaloides, Zanca (2015) realizou uma pesquisa para avaliar a sazonalidade da produção de alcaloides na espécie. Ao avaliar dois indivíduos durante um ano, foi observada uma variação sazonal, onde alcaloides indólicos eram produzidos em maior quantidade nos meses chuvosos (extratos hexânicos) e apresentavam-se em menor teor no mês de novembro (extratos metanólicos).

Com o intuito de fornecer uma alternativa para a obtenção dos alcaloides de interesse foi realizado um estudo com cultura de tecidos para o desenvolvimento laboratorial dessa planta. Entretanto, a produção de calos desta espécie resultou em indivíduos que produziram terpenos, mas não foi detectada a presença de alcaloides, e tampouco foram observadas as atividades antioxidante, antimicrobiana e tóxica nos extratos obtidos (ZANCA, 2015).

Além dos estudos realizados por este grupo de pesquisa, não foram encontrados até o momento nenhum outro estudo químico e biológico com esta espécie, o que demonstra a necessidade de novos estudos que contribuam para o conhecimento sobre *D. macrophylla* e que sugiram alternativas de obtenção e produção das importantes substâncias da espécie.

2.8. Câncer e Atividade Citotóxica

O câncer, doença cientificamente denominada por neoplasia maligna, é caracterizado pelo crescimento descontrolado e desordenado de células transformadas que podem se dispersar e invadir outros tecidos. A perda do controle da diferenciação e proliferação celular, a invasão em outros tecidos e órgãos são as principais características da doença. Existem cerca de 200 tipos diferentes de câncer, diferenciados pelos sistemas afetados, por sua capacidade de invasão e desencadeados por fatores ambientais ou hereditários. Os tratamentos variam de acordo com o tipo da doença, mas técnicas como a quimioterapia, crioterapia, cirurgia ou radioterapia podem ser aplicadas de forma combinada ou não (ALMEIDA et al., 2005; SANTOS; PINHEIRO, 2016).

Com o aumento da expectativa de vida, essa doença tornou-se um problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento, que abrigaram cerca de 60% dos casos de câncer e 70% das mortes decorrentes dessa doença em 2012. O panorama geral em 2012 foi de 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes, e estima-se que esse número deverá aumentar cerca de 70% até 2035. Em todo o mundo o tipo de câncer mais comum em 2012 foi o de pulmão (1,8 milhões de novos casos) seguido de mama, intestino e próstata, e os tipos de câncer com maiores taxas de mortalidade foram de pulmão (1,6 milhões de mortes), fígado e estômago (BRANDÃO et al., 2010; FERLAY et al., 2013; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER [INCA], 2015).

A estimativa realizada pelo INCA (2015) é que no Brasil ocorreriam 600 mil novos casos de câncer entre 2016 e 2017. Sem considerar o câncer de pele não melanoma, o câncer de próstata representaria cerca de 28,6%, seguidos de câncer no pulmão (8,1%), intestino (7,8%), estômago (6%) e cavidade oral (5,2%) em homens. Nas mulheres dentre os principais estariam o câncer de mama (28,1%), intestino (8,6%), colo do útero (7,9%), pulmão (5,3%) e estômago (3,7%) (INCA, 2015).

Na população masculina brasileira o câncer de próstata é o mais incidente em todas as regiões do Brasil. Os fatores de risco dessa doença são principalmente a idade, histórico familiar e cor da pele/etnia. No Brasil em 2013

ocorreram cerca de 14 mil mortes decorrentes do câncer de próstata (INCA, 2015).

Com maior taxa de incidência e de mortes entre mulheres, o câncer de mama ocupa uma taxa de 25% dos tipos de câncer diagnosticados. Em 2012, em todo o mundo cerca de 500 mil mulheres vieram a óbito causado pela doença. Exceto o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente em mulheres em quase todas as regiões do Brasil, com exceção da na Região Norte onde ele apresenta-se como o segundo mais incidente (INCA, 2015).

Com exceção do câncer de pele não melanoma, no estado do Amazonas estimava-se que em 2016 os casos de câncer de colo de útero (37,14%) seriam os mais incidentes seguidos de câncer de mama (24,25%) nas mulheres, e na população masculina 28,6% dos casos de câncer seriam de próstata (INCA, 2015). Estimava-se que 2.500 homens e 2.770 mulheres iriam desenvolver alguma neoplasia maligna no estado do Amazonas em 2016 e a capital concentraria mais de 70% dos casos (INCA, 2015).

Os medicamentos utilizados no tratamento do câncer afetam gravemente as células sadias, desencadeando muitos efeitos colaterais, tal problemática desperta a necessidade da busca de novos medicamentos para este fim (SANTOS; PINHEIRO, 2016). Investigações envolvendo substâncias provenientes de produtos naturais ocorrem por todo o mundo e são realizados testes *in vitro*, *in vivo*, pré-clínicos, além da observação dos mecanismos de atuação sobre as células tumorais (SANTOS; PINHEIRO, 2016).

Dentre os testes utilizados para este fim, encontram-se os ensaios colorimétricos, conhecidos pela sua confiabilidade, baixo custo, rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade. Esses testes fornecem informações quantitativas (espectrofotômetro) quanto à capacidade citotóxica de uma determinada amostra sobre a diminuição da proliferação celular (CL_{50}) (ESCOBAR; ALFONSO; ARISTIZÁBAL, 2009). Nos últimos 50 anos o reagente Alamar Blue® ou resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) vem sendo utilizado nos estudos de viabilidade celular e citotoxicidade. No Pubmed existem cerca de 1.000 publicações que utilizaram o reagente na pesquisa de drogas contra o câncer (RAMBERSAD, 2012). Trata-se de um indicador de oxi-

redução, onde em seu estado fundamental apresenta coloração azul não fluorescente, indicando a presença de células não-viáveis, enquanto que sua forma reduzida (resofurina) é rósea fluorescente, indicando células viáveis, portanto, o número de células vivas é proporcional à fluorescência emitida. (BONNIER et al., 2015; RAMPERSAD, 2012). A reação observada é resultado de várias reações metabólicas. Produtos da respiração celular como NADH, NADPH, FADH, FMNH, citocromos e enzimas localizadas nas mitocôndrias ou no citoplasma, como diaforases e flavina redutase, têm capacidade de reduzir a resazurina (BONNIER et al., 2015).

Ao rastrear a origem de medicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* para o tratamento do câncer, observa-se que mais de 70% possui sua origem em plantas (SANTOS; PINHEIRO, 2016). Na análise dos medicamentos aprovados em 30 anos (de 1981 a 2010) 79,8% das drogas utilizadas para o tratamento de câncer são derivadas ou inspiradas em produtos naturais (CRAGG; KATZ; NEWMAN; ROSENTHAL, 2012).

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) ao observar o potencial que os vegetais apresentam, desenvolveram um programa de triagem com plantas na busca de agentes anticancerígenos (BRANDÃO et al., 2010). Além disso, parcerias com o NCI vêm revelando numerosas substâncias de origem animal e microbiana com potencial anticâncer. Dentre elas destacam-se o paclitaxel (Taxol® - *Taxus brevifolia*), seu derivado semissintético docetaxel (Taxotere®) e a camptotecina (*Camptotheca acuminata*), base para a semi-síntese de topotecan (Hycamtin®) e irinotecan (Camptosar®), que são drogas efetivas e comercializadas para o tratamento do câncer (CRAGG et al., 2012).

Os alcaloides isolados da planta vinca (*Catharanthus roseus* sin. *Vinca rosea*), conhecidos como alcaloides da vinca, como a vimblastina (Velban®), a vincristina (Oncovin®) e seus análogos semi-sintéticos a vindesina (Eldisina®) e a vinorelbina (Navelbina®); também já são comercializados e utilizados no tratamento de leucemias agudas, câncer de ovários, testículos, mama e pulmão (BRANDÃO et al., 2010; SANTOS; PINHEIRO, 2016).

Visando o potencial anticâncer que os alcaloides podem possuir, estudos envolvendo essa classe de substâncias estão em desenvolvimento, como o de Sesang e colaboradores (2014) que descobriram a atividade

citotóxica contra células de carcinoma hepatocelular e de câncer de mama de um novo alcaloide aporfínico (8-hydroxyartabonatine C) e de ouregidiona isolados de extratos de folhas e galhos de *Pseuduvaria trimera* (Annonaceae) (SESANG et al., 2014). Alcaloides oxindólicos isolados de *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae), conhecida como unha-de-gato e utilizada pela população no tratamento de câncer, demonstraram citotoxicidade contra as células de câncer de bexiga e glioblastoma humano (KAISER et al., 2016).

O grande desafio para o tratamento do câncer está em desenvolver medicamentos capazes de diferenciar as células saudáveis das tumorais. Por isso, diversas pesquisas devem ser desenvolvidas com foco a descobrir novos medicamentos ou aumentar a seletividade e efetividade das drogas já existentes para impedir o avanço do câncer (BRANDÃO et al., 2010).

2.9. Toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

Artemia sp. é um microcrustáceo pertencente à família Artemiidae encontrado em diversos ambientes marinhos dos cinco continentes. Seu ciclo de vida inclui a fase de ovos que dão origem aos náuplios (larvas) ou diferenciam-se em cistos em condições ambientais desfavoráveis (formas mais resistentes à seca). No momento em que a água e a oxigenação estão disponíveis, esses cistos eclodem dando origem aos náuplios que evoluem para a fase adulta. O microcrustáceo possui importância comercial servindo de alimento para peixes, mariscos e camarões na aquicultura. Seus cistos estão disponíveis em lojas de animais, apresentam baixo custo e podem ser armazenados por anos em condições ideais (DUMITRASCU, 2011; SORGELOOS; WILEN; PERSOONE, 1978).

A *Artemia salina* encontra-se entre os modelos experimentais utilizados para a busca de produtos naturais bioativos. O ensaio com este microcrustáceo apresenta vantagens por ser um teste rápido, de baixo custo, sem necessidades de grandes equipamentos e de fácil execução (MEYER et al., 1982; PARRA; YHEBRA; SARDIÑAS; BUELA, 2001). O ensaio de toxicidade frente à *A. salina* (TAS) também apresenta uma grande vantagem frente à comunidade científica, pois pode ser uma alternativa ao uso de animais nos

testes toxicológicos (HARADA, 2009). Para a realização do teste é fundamental ter as variáveis temperatura, salinidade, iluminação e tempo de eclosão controladas (SORGELOOS; WILEN; PERSOONE, 1978).

Tarpley (1958) utilizou *Artemia salina* como organismo teste nos bioensaios com resíduos de inseticidas. Posteriormente, o bioensaio foi aplicado como método de triagem para toxinas fúngicas (HARWIG; SCOTT, 1971). Meyer e colaboradores (1982) utilizaram o microcrustáceo para observar o potencial farmacológico de extratos de plantas superiores comparando com substâncias naturais cujas atividades já eram conhecidas. Atualmente, este ensaio é utilizado como referência em diversos grupos de pesquisas com o objetivo de correlacionar a atividade citotóxica contra *Artemia salina* e a atividade antitumoral (HARADA, 2009).

Nesta metodologia são considerados extratos bioativos aqueles em que a CL₅₀ encontra-se abaixo de 1.000 µg/mL (FILHO et al., 2009; MEYER et al., 1982; PARRA et al., 2001). Segundo Anderson e colaboradores (1991 apud DAVID et al., 2001), a partir desse teste as substâncias podem ser consideradas: muito ativas (DL₅₀ abaixo de 100 µg/mL), medianamente ativas (DL₅₀ entre 100 e 900 µg/mL) ou inativas (DL₅₀ acima de 1.000 µg/mL). Os extratos que apresentam baixa atividade ainda poderão ser objetos de estudos de modificação estrutural e pró-fármacos (HARADA, 2009).

São encontradas na literatura diversas pesquisas que a partir da triagem resultante deste ensaio, os extratos com resultados satisfatórios são direcionados para testes mais dispendiosos, específicos e complexos, como por exemplo o de atividade antitumoral (HARADA, 2009).

Ao realizar testes para analisar a correlação entre o TAS e o ensaio de atividade antitumoral SRB (sulforrodamida B) com cisplatina, substâncias de extratos vegetais e células de linhagens Hep-2 (carcinoma de laringe) e B16-F10 (células de melanoma), Harada (2009) confirmou o TAS como “indicativo de atividade antitumoral”, entretanto não houve a possibilidade de estabelecer quantitativamente essa correlação. Neste teste, cisplatina, β-lapachona, emodina, duguetina e lapachol apresentaram atividade contra *A. salina* (CL₅₀ < 140 µg/mL) e contra as linhagens tumorais (CL₅₀ < 11 µg/mL), boldina e *N*-nitrosoanonaina foram inativas nos dois testes e rutina e aloina foram inativas

no TAS e apresentaram baixa atividade no ensaio antitumoral ($CL_{50} < 47 \mu\text{g/mL}$). Esta constatação auxilia em uma pré-avaliação e direcionamento dos estudos através do uso do TAS como um bioensaio preliminar para as potenciais atividades biológicas específicas (HARADA, 2009).

No estudo com 20 extratos vegetais Parra e colaboradores (2001) encontraram uma boa correlação [$r = 0,85$ ($p < 0,05$)] entre a CL_{50} obtida no teste com *A. salina* e a DL_{50} do teste toxicidade aguda em camundongos.

Ao pesquisar a toxicidade de *Duguetia flagellaris*, Oliveira (2013) observou que todos os extratos hexânicos (galho, flagelo e folhas) e o extrato galho-acetato de etila apresentaram CL_{50} abaixo de $1.000 \mu\text{g/mL}$. Nos testes com células tumorais, o extrato galho-hexano apresentou atividade antitumoral (42% de viabilidade celular) entretanto, o extrato folha-acetato que não apresentou atividade contra *A. salina* demonstrou atividade (21,4% de viabilidade celular) contra uma das linhagens celulares testadas (OLIVEIRA, 2013).

Os extratos de plantas da família Rubiaceae também foram avaliados com relação à toxicidade contra *A. salina*. O óleo essencial de *Mitracarpus frigidus* apresentou moderada atividade no TAS com Cl_{50} de $88 \pm 10 \mu\text{g/mL}$ (FABRI et al., 2012). A partir de extratos de hexânicos, diclorometânicos e metanólicos de *Gonzalagunia rosea* foi possível observar a atividade citotóxica contra *A. salina* com CL_{50} de 0,54, 0,58 e 0,01 mg/mL, respectivamente (NIÑO; NARVÁEZ; MOSQUERA; CORREA, 2006).

Para a triagem de plantas do Amazonas com atividade citotóxica foi realizado o teste de citotoxicidade contra *A. franciscana*. Os extratos metanólicos e aquosos de cascas de *Ladenberga undata* (Rubiaceae) apresentaram percentual de letalidade de 22 e 8%, respectivamente na concentração de $500 \mu\text{g/mL}$ (QUIGNARD et al., 2003).

Apesar do teste de toxicidade frente à *Artemia salina* não ser específico para um indicativo de atividade antitumoral ou outra ação farmacológica, ele é uma ferramenta útil para o monitoramento de bioatividade (MEYER et al., 1982). Portanto, os extratos/substâncias que apresentam-se ativos neste teste deverão ser submetidos a bioensaios mais específicos.

2.10. Estresse Oxidativo e Atividade Antioxidante

Os radicais livres são produtos das reações de oxidação que ocorrem naturalmente no metabolismo celular, pela exposição aos fatores exógenos (medicamentos, radiações gama e ultravioleta, fumo, dieta, etc.) ou por alguma disfunção biológica (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Eles possuem um ou mais elétrons não pareados o que os torna altamente reativos, instáveis e com meia-vida curta (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Eles estão envolvidos nos processos fisiológicos como: produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SÁ et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2014).

O excesso desses radicais é naturalmente removido pelos antioxidantes, que podem ser endógenos ou exógenos provenientes da alimentação (SÁ et al., 2012). Os antioxidantes podem ser classificados como enzimáticos, o que inclui a superóxido dismutase, catalase, glutationa peroxidase, NADPH-quinona oxidoreductase, e não enzimáticos, como: bioflavonas, vitaminas A, C e E, carotenoides, selênio, glutathione, dentre outros. As substâncias fenólicas, como os flavonoides também são conhecidos pelas suas características antioxidantes (SÁ et al., 2012). Essas substâncias podem atuar impedindo a formação de radicais livres, interceptando-os evitando o ataque sobre as biomoléculas, e no reparo das lesões (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Quando essa regulação sofre um desequilíbrio com o acúmulo dos radicais livres, o resultado é o estresse oxidativo. O estresse oxidativo pode ocasionar a indução de danos celulares como a “peroxidação de lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, aos carboidratos e ao DNA, causando danos às membranas e perda de fluidez da mesma” (SÁ et al., 2012). Esses danos estão relacionados com o surgimento de várias doenças como o câncer, envelhecimento precoce, cardiopatias, doenças degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, diabetes, artrite, inflamações crônicas, entre outras (BIANCHI; ANTUNES, 1999; SÁ et al., 2012).

As substâncias antioxidantes também desempenham importante papel na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica. Essas substâncias atuam na prevenção da oxidação dos produtos o que evita a modificação da cor, odor, sabor e a desaprovação pelo consumidor (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007). Os papéis que os antioxidantes desempenham no organismo e a sua aplicação na indústria são incentivo para a busca de mais substâncias provenientes de produtos naturais que possuam essas características e sirvam como substituintes aos antioxidantes sintéticos.

Algumas metodologias são empregadas para avaliar o potencial antioxidante de substâncias provenientes de produtos naturais. Dentre as técnicas que medem a capacidade de sequestro dos radicais livres está o ensaio com DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila). O DPPH possui uma coloração violeta e na presença de uma substância que age como doadora de átomos de hidrogênio, ele é reduzido à hidrazina, uma substância de coloração amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

Na literatura encontram-se a descrição do potencial antioxidante de plantas da família Rubiaceae. Alguns trabalhos recentes mostram que os extratos de acetato de etila e aquosos de folhas de *Palicourea guianensis* (VÁSQUEZ; ARISTIZABAL, 2013), o extrato metanólico de raízes de *Sabiaceae brasiliensis* (BATISTA et al., 2014) e o extrato etanólico de cascas do caule de *Guettarda uruguensis* apresentaram atividade antioxidante (DUARTE et al., 2014). Propriedades antioxidantes também foram observadas em seis substâncias produzidas pelo fungo endofítico *Camarops* sp. isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae) (ARAÚJO et al., 2013).

2.11. Resistência aos antibióticos e Atividade antimicrobiana

A população mundial vem crescendo de forma acelerada e juntamente com ela surgem cada vez mais problemas de saúde pública, como por exemplo, os micro-organismos resistentes aos antimicrobianos utilizados nos tratamentos de infecções (AMBROSE; CHRISTAPHER; BHORE, 2013; STROBEL, 2003).

As infecções hospitalares, atualmente denominadas como “infecções relacionadas à assistência em saúde” (IRAS) estão cada vez mais frequentes. Elas são relacionadas com a estrutura física inadequada dos hospitais, com a insuficiência do número de profissionais e acarretam no aumento da letalidade hospitalar, no tempo e nos custos da internação. A maior incidência de pacientes graves e imunocomprometidos e a resistência aos antimicrobianos contribuem para tornar as IRAS um grave problema de saúde pública (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

No ano de 2013, no Brasil, os principais responsáveis por causar infecções primárias de corrente sanguínea associadas ao uso de cateter venoso central em pacientes adultos, pediátricos e neonatos foram: *Staphylococcus* coagulase negativa, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *Candida* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA [ANVISA], 2014).

Dentre as notificações de cepas resistentes aos antimicrobianos em pacientes adultos, pediátricos e neonatos as taxas mais elevadas foram de *Staphylococcus* coagulase negativa com mais de 70% de resistência à oxacilina nos três grupos de pacientes, *S. aureus* resistente à oxacilina com 60,9%, 44,4% e 43,5 de resistência, respectivamente. Resistência aos carbapenêmicos nas cepas de *P. aeruginosa* foi observada em 37,4%, 29,7% e 37% em pacientes adultos, pediátricos e neonatos, respectivamente, e 80,7% em *Acinetobacter* spp. isolados de adultos (ANVISA, 2014).

Novas fontes de antimicrobianos capazes de atuar contra os micro-organismos são importantes ferramentas na luta contra a resistência microbiana, nesse âmbito surgem os micro-organismos endofíticos produtores de possíveis substâncias medicinais (STROBEL, 2003). Para o tratamento de infecções (bactérias, fungos, vírus e parasitas) cerca de 68% dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2012 eram produtos naturais, derivados ou inspirados neles (CRAGG et al., 2012).

Diversas técnicas podem ser aplicadas para a realização da triagem de extratos com atividade antimicrobiana. Os métodos mais utilizados são de difusão em ágar (poço, disco e *template*) e macro ou microdiluição em caldo. O

objetivo dessas metodologias é observar a inibição ou morte dos micro-organismos testes a partir da ação dos extratos avaliados (ALVES et al., 2008). Além da avaliação dessa capacidade, pode-se determinar a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração capaz de inibir a multiplicação do micro-organismo teste. Nesse procedimento pode-se distinguir as concentrações microstáticas e microbicidas (ELOFF, 1998).

Independente da técnica a ser empregada, ressalta-se a importância do meio de cultura, espessura do ágar, temperatura de incubação, tempo de leitura, contaminações, solubilidade do extrato, densidade do inóculo, atmosfera de CO₂, dentre outros critérios, que são fundamentais a serem considerados para a obtenção de resultados confiáveis (ALVES et al., 2008).

O potencial antimicrobiano pode ser observado em plantas da família Rubiaceae e seus micro-organismos endofíticos. Niño e colaboradores (2006) observaram atividades antifúngicas dos extratos diclorometano e metanol de *Gonzalagunia rosea* (Rubiaceae) contra *C. albicans* (CIM: 2,5 e 1,25 mg/mL, respectivamente) e *Fusarium solani* (CIM: 1,25 e 0,31 mg/mL, respectivamente).

O óleo essencial de *Mitracarpus frigidus* (Rubiaceae) apresentou concentração inibitória mínima de 250 µg/mL contra *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *P. aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*, 500 µg/mL contra *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*, 1.000 µg/mL contra *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* e *E. faecalis*, 8 µg/mL contra *Cryptococcus neoformans* e 63 µg/mL contra *C. albicans* (FABRI et al., 2012).

Dois fungos endofíticos do gênero *Penicillium* isolados de folhas de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae) produziram substâncias com atividade antifúngica. Dentre as substâncias isoladas, orcinol e 4-hidroximeleína apresentaram as maiores atividades contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* no teste de bioautografia (OLIVEIRA et al., 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar a bioprospecção química e biológica dos extratos de fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) e isolar alcaloides.

3.2. Objetivos Específicos

- Isolar os fungos endofíticos de *D. macrophylla*;
- Obter os extratos orgânicos dos fungos endofíticos de *D. macrophylla*;
- Realizar os ensaios de atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica com os extratos dos fungos endofíticos;
- Verificar a presença de alcaloides nos extratos fúngicos e selecionar um fungo produtor de alcaloides;
- Isolar e identificar os alcaloides presentes nos extratos do fungo selecionado;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e tóxica para células neoplásicas e não-neoplásicas, dos alcaloides isolados.

4. METODOLOGIA

4.1. Área de Coleta e Obtenção do Material Vegetal

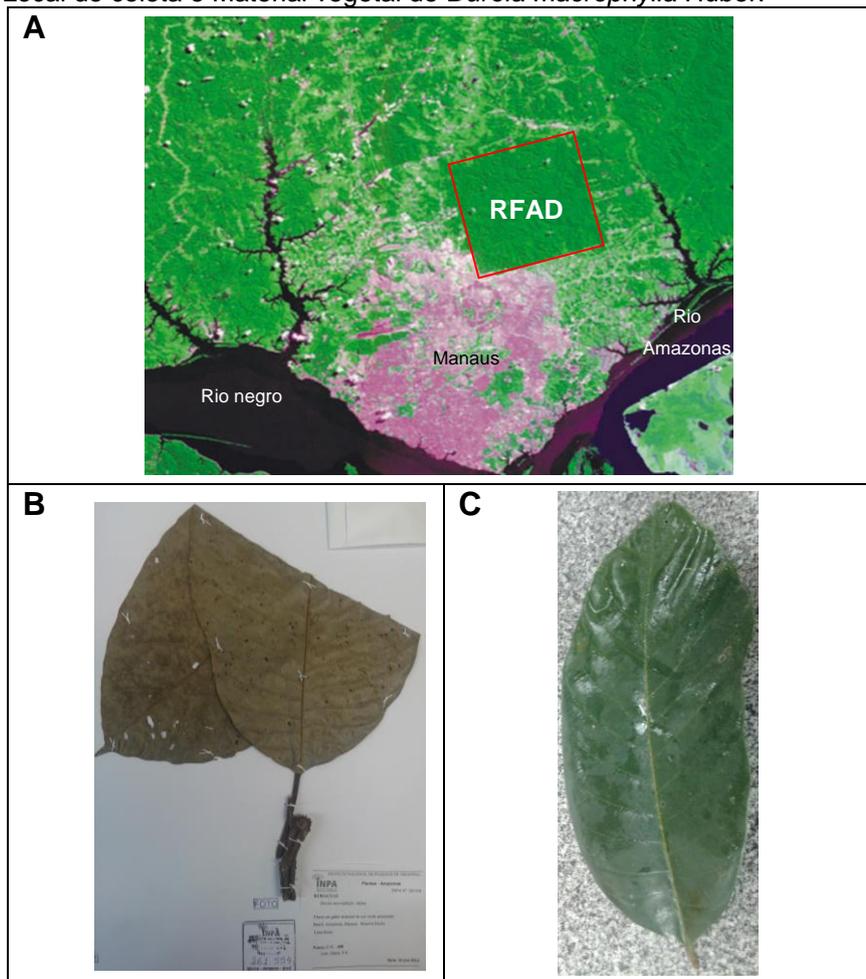
A coleta do material vegetal utilizado neste trabalho ocorreu na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Reserva Ducke), situada na periferia de Manaus, com acesso pelo Km 26 da estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010), Amazonas, Brasil (Figura 8).

A Reserva Ducke foi criada em 1963 e desde 1972 é administrada pelo Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Ela é classificada como floresta tropical úmida de terra firme, possui um clima tropical úmido, a estação chuvosa ocorre nos meses de novembro a maio, e nos meses de março e abril observa-se a maior taxa de precipitação. Entre junho e outubro ocorre a estação seca e geralmente o ápice é no mês de setembro (OLIVEIRA; BACCARO; BRAGA-NETO; MAGNUSSON, 2008). Na Reserva, a família objeto deste estudo é uma das maiores representantes, compreendendo 99 espécies distribuídas em 36 gêneros (TAYLOR; CAMPOS; ZAPPI, 2007). Os exemplares de *D. macrophylla* encontram-se nas florestas de baixio, vertente e platô, a época de floração ocorre em novembro e dezembro, e a frutificação de janeiro a junho (CAMPOS; BRITO, 1999).

As folhas de *D. macrophylla* do indivíduo localizado na Reserva Ducke (coordenadas: S 02° 55.848' W 059° 58.531) foram coletadas pela parte da tarde do dia 26 de junho de 2014. De acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) - Estação convencional de Manaus 82331, os dados climáticos no dia da coleta em Manaus eram: temperatura máxima: 29,5 °C, temperatura mínima: 26 °C, média de temperatura: 26,3 °C, umidade 89% e precipitação 0,5 mm.

Após a coleta, as amostras foram processadas no mesmo dia no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA. A exsiccata do material vegetal fértil foi depositada no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do INPA, número de depósito 261554 e autenticadas pela especialista em rubiáceas Dra. Charlotte M. Taylor, do Missouri Botanical Garden, St. Louis – USA.

Figura 8 - Local de coleta e Material vegetal de *Duroia macrophylla* Huber.



(Fonte: CBERS/INPE, 2004).

A: Imagem de satélite da Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD). B: Exsicata de *Duroia macrophylla* depositada no Herbário do INPA. C: Foto de uma das folhas de *Duroia macrophylla* utilizadas nesse trabalho.

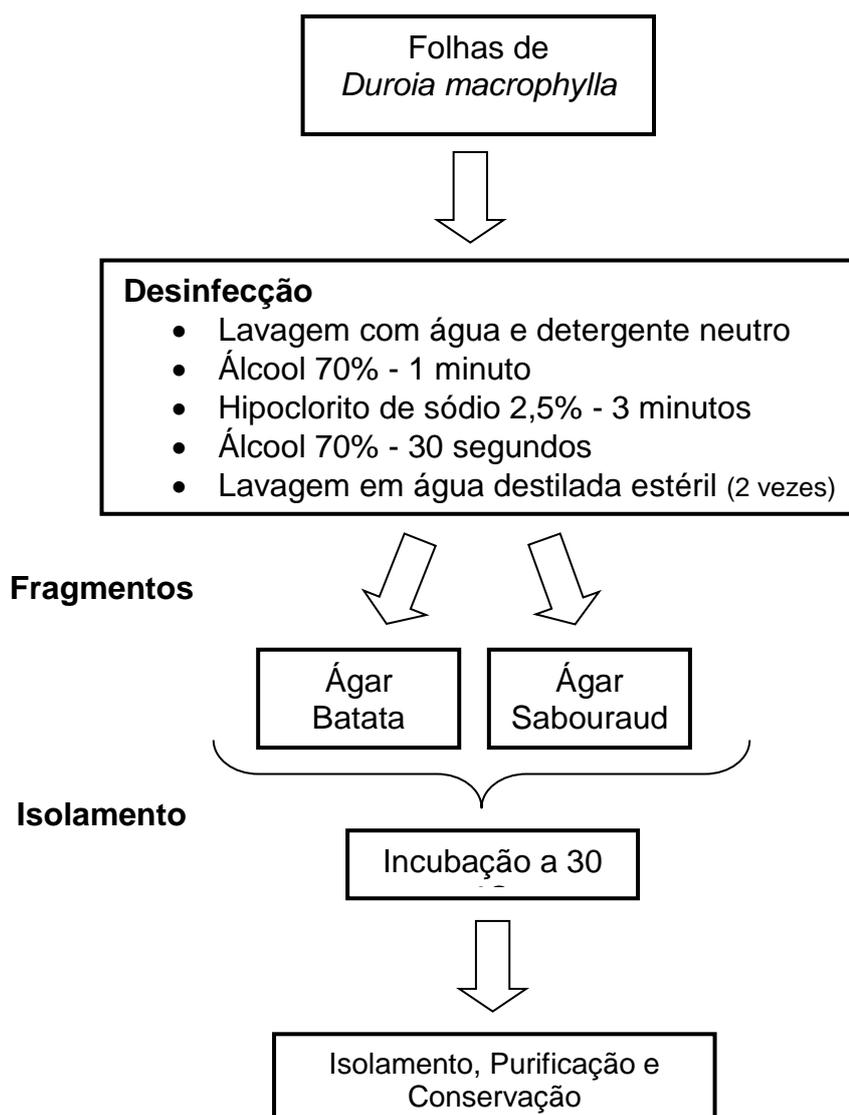
4.2. Desinfecção do Material Vegetal e Isolamento de Fungos Endofíticos

A desinfecção do material vegetal foi realizada para a retirada dos micro-organismos epifíticos. Cinco folhas saudáveis e com poucos sinais de herbivoria foram lavadas em água corrente com detergente líquido neutro. Na câmara de fluxo laminar (Pachane, PA 610), as folhas foram imersas sequencialmente em béqueres contendo agentes desinfetantes: álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2,5% por 3 minutos e álcool 70% por 1 minuto. Em seguida, o material vegetal foi imerso em dois béqueres com água destilada estéril dos quais retirou-se uma alíquota de 50 μ L para o controle da

assepsia que foi inoculada em uma placa de Petri contendo BDA (SOUZA et al., 2004).

As amostras foram cortadas em pequenos fragmentos (5 x 5 mm) que foram inoculados (cinco fragmentos por placa), em quintuplicata, em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA: Difco) e Ágar Sabourad (SB: Difco) suplementados com oxitetraciclina 125 µg/mL. As placas foram incubadas a 30 °C por 20 dias (Incubadora: Tecnal, TE-391) e durante esse período foi acompanhado o surgimento das hifas fúngicas para fora do tecido vegetal e elas foram transferidas para novas placas de Petri com meio BDA ou Ágar SB. Posteriormente o isolamento, os fungos foram submetidos à purificação e conservação (Figura 9) (SOUZA, 2006).

Figura 9 - Fluxograma de isolamento dos micro-organismos endofíticos de *Duroia macrophylla*.



A taxa de colonização (TC) foi calculada conforme (AZEVEDO, 1998):

$$Tc (\%) = \frac{\text{Número total de isolados} \geq 1}{\text{Número total de fragmentos}} \times 100$$

Eq. 1

4.3. Purificação e Conservação dos Micro-organismos

Após os isolamentos dos endófitos de *D. macrophylla*, os fungos foram submetidos à purificação para posterior conservação. Para os fungos classificados como *Mycelia sterilia*, realizaram-se repiques sucessivos e isolamento em três pontos para que ocorresse a sua purificação (SOUZA et al., 2004).

Com o objetivo de preservar as características dos micro-organismos isolados, eles foram submetidos às duas técnicas de conservação: 1) Congelamento: blocos do ágar com o crescimento fúngico foram transferidos para criotubos contendo caldo batata ou caldo SB 20% de glicerol e após um resfriamento gradual em refrigerador e freezer eles foram estocados a -80 °C (Ultrafreezer: Sanyo). 2) Água destilada/Castellani: cinco pedaços de meio (4-6 mm²) contendo o crescimento fúngico foram transferidos para tubos de penicilina de 10 mL contendo 5 mL de água destilada estéril, fechados com tampa de borracha e armazenados à temperatura ambiente.

A partir das observações macro e micromorfológicas (colônia: tipo de borda, raio de crescimento, relevo, textura, coloração; tipo de hifas, presença e formato de esporos) 21 fungos com características diferentes foram submetidos ao cultivo submerso para a obtenção dos metabólitos secundários.

Com base nos resultados da bioprospecção, selecionou-se um fungo para o prosseguimento do estudo por apresentar a produção de alcaloides e atividades biológicas. O fungo foi depositado na Coleção de Micro-organismos de Interesse Médico (INPA), com código de depósito LM 6227.

4.4. Identificação Fúngica

O fungo selecionado foi enviado para identificação molecular na Fundação André Tosello – Coleção de Culturas Tropical, Campinas – SP e as etapas do processo de extração de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento estão descritas a seguir.

Após o cultivo em Caldo SB, o DNA fúngico foi extraído utilizando-se o kit comercial ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprep (ZymoResearch). A amplificação do DNA alvo (região ITS1, 5.8S e ITS 2), através da PCR, se deu por meio dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) SR6R (5' AAGTATAAGTCGTAACAAGG 3') e LR1 (5' GGTTGGTTTCTTTCCT 3') (WHITE et al., 1990). Após corrida eletroforética em gel de TBE-agarose 1,5% (p/v), o produto foi purificado através do EasyPure PCR Purification Kit (TransGen Biotech), segundo as informações do fabricante. O produto purificado foi quantificado, aliquotado e acrescido dos respectivos oligonucleotídeos para o sequenciamento, que foi realizado na plataforma ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies).

A sequência consenso foi gerada (BioEdit) a partir das sequências obtidas pelos primers supracitados. A classificação taxonômica das amostras se baseou na comparação entre a sequência consenso e as depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) via MEGABLAST. A sequência única foi alinhada com as similares disponíveis no banco de dados e foi construída uma árvore de distância filogenética com auxílio do programa MEGA7.

4.5. Preparo dos Extratos Fúngicos

Os fungos isolados foram cultivados em BDA e Agar SB e após 8 dias de crescimento eles foram submetidos ao cultivo submerso. O cultivo submerso foi realizado em Erlenmeyers de 500 mL contendo 300 mL de caldo Sabouraud ou caldo Batata Dextrose acrescidos de 0,2% de Extrato de Levedura (de acordo com o meio em que os micro-organismos foram isolados). Quatro fragmentos do meio (6 x 6 mm) contendo o crescimento fúngico foram

inoculados nos Erlenmeyers que foram incubados a 26 °C sob agitação a 120 rpm (Shaker: Tecnal, TE-420).

Os fungos endofíticos foram incubados de 14 a 30 dias, de acordo com a observação de suas características morfofisiológicas durante o experimento (Tabela 2). O pH inicial dos meios de cultura eram: Caldo BD - 5,6 e Caldo SB - 5,8 e após o cultivo submerso a maioria dos fungos produziu substâncias que aumentaram o pH do meio. O período de incubação e o pH final resultante de cada cultivo submerso estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição dos fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* de acordo com o período de incubação e pH final do líquido metabólico.

Fungo	Período de Incubação (dias)	pH final
Dm SB 11		
Dm BDA 12b	20	5,0
Dm SB 33		
Dm SB 41b	20	8,0
DM SB 21		
Dm SB 35a	27	8,0
DM SB 41a	30	8,0
Dm SB 43		
Dm SB 15	20	7,5
Dm BDA 24		
Dm BDA 13	14	5,0
Dm BDA 21		
Dm BDA 41b	20	7,0
Dm BDA31		
Dm BDA 12c	15	5,0
Dm BDA 14	27	6,0
Dm BDA 25a		
DM BDA 35a	25	7,5
Dm BDA 42b		
Dm BDA 43	20	6,0
Dm BDA 53	26	7,5

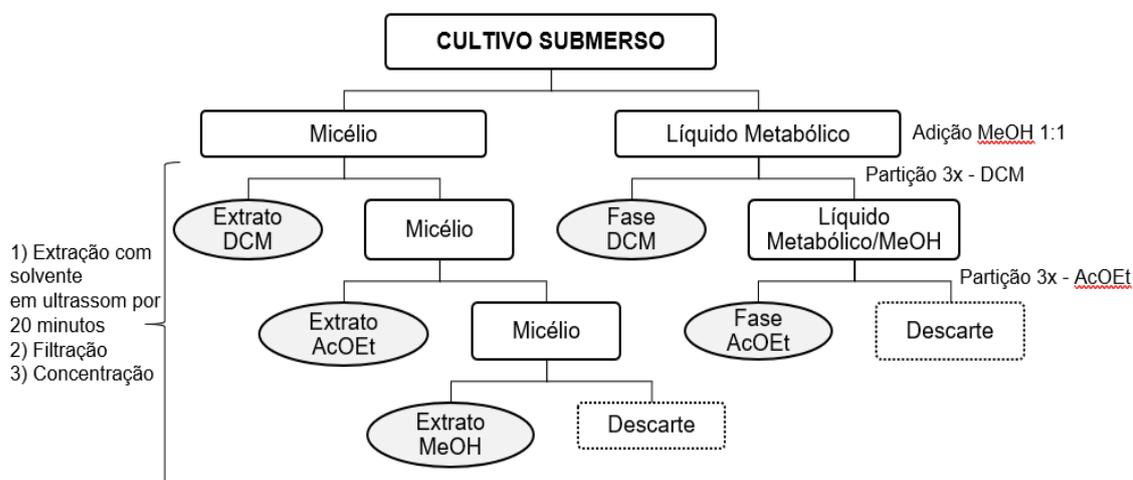
Após o término do cultivo submerso, utilizando um sistema a vácuo (kitassato, funil de Büchner e papel de filtro) os líquidos metabólicos foram filtrados e separados dos micélios, o pH dos líquidos metabólicos foi medido com um papel de indicador pH. Para realizar as extrações dos metabólitos secundários intra e extracelulares os micélios e os líquidos metabólicos foram submetidos às extrações com solventes de baixa a alta polaridade (Figura 10).

Os micélios foram transferidos para almofariz e com auxílio dos pistilos, na presença de diclorometano, eles foram macerados manualmente. Posteriormente o micélio foi inserido em um Erlenmeyer onde foram realizadas as extrações sequenciais com os solventes: diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). Foram realizadas de três a quatro extrações, para cada solvente, em um banho de ultrassom (Unique) durante 20 minutos por extração. Os extratos foram evaporados em evaporador rotatório a 40 °C.

As substâncias presentes nos líquidos metabólicos foram extraídas a partir de uma partição líquido-líquido. Preparou-se uma solução hidroalcoólica adicionando-se aos líquidos metabólicos o mesmo volume do solvente MeOH (1:1). Esta solução foi transferida para um funil de separação e foram realizadas pelo menos três extrações com os solventes DCM e AcOEt. Os extratos foram concentrados em rotaevaporador sob temperatura de 40 °C.

Após estarem completamente secos, os extratos foram pesados em balança analítica. As massas obtidas foram um importante critério para a realização dos ensaios biológicos e da ressonância magnética nuclear de ^1H .

Figura 10 - Fluxograma da preparação dos extratos dos metabólitos intra e extracelulares dos fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.



4.6. Prospecção Química dos Extratos

4.6.1. Análise Cromatográfica dos Extratos

Todos os extratos fúngicos foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando-se cromatofolhas de alumínio impregnadas com sílica 60 contendo indicador de fluorescência UV 254 nm (Merck, Germany). Com auxílio de capilares, os extratos foram aplicados nas placas que foram eluídas com solventes em diferentes proporções, de maneira a observar a maior separação entre as substâncias dos extratos. Como revelador físico empregou-se a luz ultravioleta nos comprimentos de onda UV 254 e 365 nm (revelador para duplas ligações conjugadas), e como reveladores químicos: vapores de iodo (substâncias contendo ligações duplas - manchas amareladas), reagente de Dragendorff (alcaloides, compostos nitrogenados heterocíclicos e aminas quaternárias – manchas de coloração alaranjada), sulfato cérico (terpenos – manchas roxas) e cloreto férrico (substâncias fenólicas – manchas azuladas) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997; WAGNER; BLADT, 1996).

4.6.2. Ressonância Magnética Nuclear

Os extratos provenientes de cada fungo endofítico que possuíam massa acima de 15 mg ou que apresentaram indícios de alcaloides na CCDC foram submetidos à Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (Bruker BioSpin AG, modelo Fourier 300 UltraShield, com frequência de 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C com sonda EasyProbe Dual 300 MHz S1 5mm Z-gradient). Para o processamento dos dados e análises dos espectros utilizou-se o software TopSpin 3.5pl7 (Bruker).

De acordo com a solubilidade, os extratos foram diluídos em solventes deuterados (clorofórmio-d ou DMSO- d_6). Todos os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

4.7. Atividades Química e Biológica

4.7.1. Ensaio de Toxicidade Frente à *Artemia salina* Leach

O ensaio de atividade citotóxica foi realizado de acordo com o desenvolvido por Meyer e colaboradores (1982) com adaptações. Neste ensaio foram testados todos os extratos metanólicos, os extratos provenientes da extração do líquido metabólico com Acetato de Etila dos fungos: Dm SB 11, Dm SB 33, Dm SB 43, Dm BDA 12b, Dm BDA 13, Dm BDA 12c, Dm BDA 14 e Dm BDA 24, provenientes do primeiro cultivo e todos os extratos fúngicos provenientes do segundo cultivo.

Para uma triagem inicial, os extratos foram testados em triplicata, na concentração de 1.000 µg/mL, solubilizados em DMSO 25%. Após esses resultados prosseguiu-se com o ensaio em diferentes concentrações apenas com os extratos que foram ativos.

Neste teste os ovos de *Artemia salina* Leach foram eclodidos durante 48 h em água do mar sintética (38 g/L de sal marinho) sob aeração e iluminação artificiais. Em uma placa de 24 poços transferiram-se dez náuplios para cada poço contendo os extratos fúngicos. Como controle negativo do ensaio utilizaram-se DMSO 25% e água do mar sintética. Após 24 h sob iluminação artificial contou-se os microcrustáceos mortos. Consideraram-se mortos os microcrustáceos que, mesmo com uma leve agitação no sistema, não apresentavam movimentos por mais de dez segundos. A CL₅₀ (concentração necessária para matar a metade dos organismos testes) foi determinada usando o software PoloPlus versão 1.0, com intervalo de confiança de 95%, e a média e desvio padrão foram calculados pelo programa Microsoft Excel 2013.

De acordo com a toxicidade, os extratos foram classificados em: inativos (CL₅₀ acima de 1.000 µg/mL), moderadamente ativos (CL₅₀ entre 100 e 900 µg/mL) ou fortemente ativos (DL₅₀ abaixo de 100 µg/mL) (ANDERSON et al., 1991; DAVID et al., 2001).

4.7.2. Ensaio Antioxidante

No ensaio antioxidante utilizou-se a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), onde os extratos metanólicos dos micélios do primeiro cultivo submerso foram avaliados quanto à capacidade sequestradora de radicais livres. O ensaio antioxidante foi realizado em triplicata, empregou-se como controle negativo água deionizada, como agente oxidante o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e como padrão de referência o ácido ascórbico.

Para o preparo da solução de ácido ascórbico, 44 mg foram solubilizados em 50 mL de água deionizada e a partir desta solução mãe prepararam-se as concentrações: 0; 88; 176; 352; 526 e 704 $\mu\text{g/mL}$. Para a solução de DPPH 2,8 mg foram solubilizados em 1 mL de DCM e posteriormente completou-se o volume para 100 mL com MeOH.

Para a construção da curva padrão adicionaram-se em microtubos 10 μL de ácido ascórbico (em diferentes concentrações) e 990 μL de DPPH e aguardaram-se 30 minutos em um local isento de iluminação. A ação antioxidante do padrão sobre o DPPH foi mensurada por um espectrofotômetro ($\lambda = 517 \text{ nm}$) (FENTOM, modelo Cirrus 80ST) originando diferentes absorbâncias com as quais se construiu a curva-padrão (Figura 25).

Após a verificação da linearidade da curva-padrão, o teste com os extratos fúngicos foi realizado. Os extratos foram testados na concentração de 0,5 mg/mL, solubilizados em MeOH. Adicionaram-se em microtubos 10 μL de extrato (0,5 mg/mL) e 990 μL de DPPH e aguardou-se 30 minutos em local escuro. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm e a partir da curva-padrão e das absorbâncias resultantes da ação dos extratos avaliou-se o potencial antioxidante dos extratos testados.

4.7.3. Ensaio Antibacteriano

Para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos endofíticos do primeiro cultivo submerso e dos extratos fúngicos do segundo cultivo submerso empregou-se a técnica de difusão em

Ágar conforme o manual M02-A11 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE [CLSI], 2012).

Neste ensaio utilizaram-se as cepas: *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Enterobacter cloacae* (ATCC 13047), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) cedidas pela Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária – CRMVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ. Os meios de cultura empregados foram o caldo e o ágar Müeller-Hinton e a temperatura de incubação de 35 ± 2 °C.

Os micro-organismos foram inoculados em tubos contendo meio líquido e após 24 h padronizou-se o inóculo na escala 0,5 de Mac Farland com auxílio do espectrofotômetro FENTOM (modelo Cirrus 80ST) no comprimento de onda de 625 nm, com absorvância variando entre 0,08 a 0,1 (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE [OPAS]; AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA [ANVISA]; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE [SVS], 2006). A suspensão padronizada continha aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/mL. Utilizando-se um swab estéril inoculou-se (*spread plate*) a cultura padronizada na superfície dos meios de cultura (4 mm de espessura) em três direções distintas. Poços de 6 mm de diâmetro foram feitos no ágar e 100 µL dos extratos (5 mg/mL solubilizados em DMSO 10%) foram cuidadosamente inseridos nos orifícios. As placas foram incubadas e após 16-18 h adicionou-se nas placas 10 mL de ágar bacteriológico 1% acrescido do revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio 0,2% e após incubação a 37 °C por 60 minutos aferiu-se os diâmetros dos halos de inibição (ALVES et al., 2008; OHARA, 1992). O ensaio foi realizado em duplicata e como controle positivo utilizou-se oxitetracilina (125 µg/mL) e como controle negativo DMSO 10%.

4.8. Obtenção de Extratos com Metabólitos Secundários de Interesse

De acordo com as análises químicas e biológicas dos extratos dos fungos endofíticos, foi selecionado um fungo (Dm SB 43) produtor dos metabólitos secundários de interesse para a obtenção de extratos em maior

quantidade. Com o objetivo de obter uma maior massa de extratos para prosseguir com as análises e fracionamentos, o fungo foi submetido ao cultivo submerso (item 4.4) na mesma condição realizada no primeiro cultivo, com um maior número de repetições, totalizando 3.000 mL de meio de cultura líquido.

Após o cultivo submerso, foram realizadas as extrações dos micélios e dos caldos metabólitos como descrito no item 4.5. Todos os extratos provenientes do segundo cultivo submerso foram submetidos às análises químicas por meio da Cromatografia em Camada Delgada Comparativa, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , e biológicas pelos ensaios antibacteriano e de toxicidade contra *Artemia salina*, como descritos nos itens 4.6.1, 4.6.2, 4.7.1 e 4.7.3 respectivamente.

4.9. Fracionamento dos extratos e purificação das substâncias

Para o isolamento e purificação das substâncias foram empregadas as técnicas de Cromatografia em Coluna (sílica gel 60 230-400 mesh - Merck e Sephadex LH-20[®] - Sigma Aldrich), Cromatografia Preparativa (sílica gel 60 para TLC – Macherey-Nagel) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE modelo UFLC[®], Shimadzu). Os parâmetros seguidos foram determinados a partir do comportamento dos extratos, do indicativo de pureza e das possíveis classes de substâncias observadas na Cromatografia em Camada Delgada (Merck, Germany).

Os extratos $_{\text{MDCM}}$, $_{\text{MAcOEt}}$ e $_{\text{FDCM}}$ do fungo Dm SB 43 provenientes do segundo cultivo foram selecionados para o fracionamento com o objetivo de isolar e caracterizar os alcaloides presentes neles. Essa seleção ocorreu levando-se em consideração os indícios de alcaloides observados nos espectros de RMN de ^1H e na CCDC (revelador Dragendorff), as atividades biológicas nos testes de citotoxicidade frente à *Artemia salina* e no ensaio antimicrobiano.

4.9.1. Fracionamento cromatográfico do extrato micélio-DCM

O extrato _mDCM (390,8 mg) foi fracionado através da cromatografia em coluna aberta (h= 54,5 cm, Ø= 1 cm) com sílica gel 60, 230-400 mesh (27,3 g). Os eluentes utilizados foram: DCM e MeOH, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade (Tabela 3). O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 50 mL. Foram coletadas 24 frações e após a CCDC as frações foram reunidas de acordo com a similaridade.

Tabela 3 - Eluentes utilizados no fracionamento do extrato _mDCM do fungo DM SB 43.

Frações	Eluentes
1-4	DCM 100%
5-9	DCM:MeOH 95:5
10-14	DCM:MeOH 9:1
15-19	DCM:MeOH 8:2
20-22	DCM:MeOH 7:3
23-24	MeOH 100%

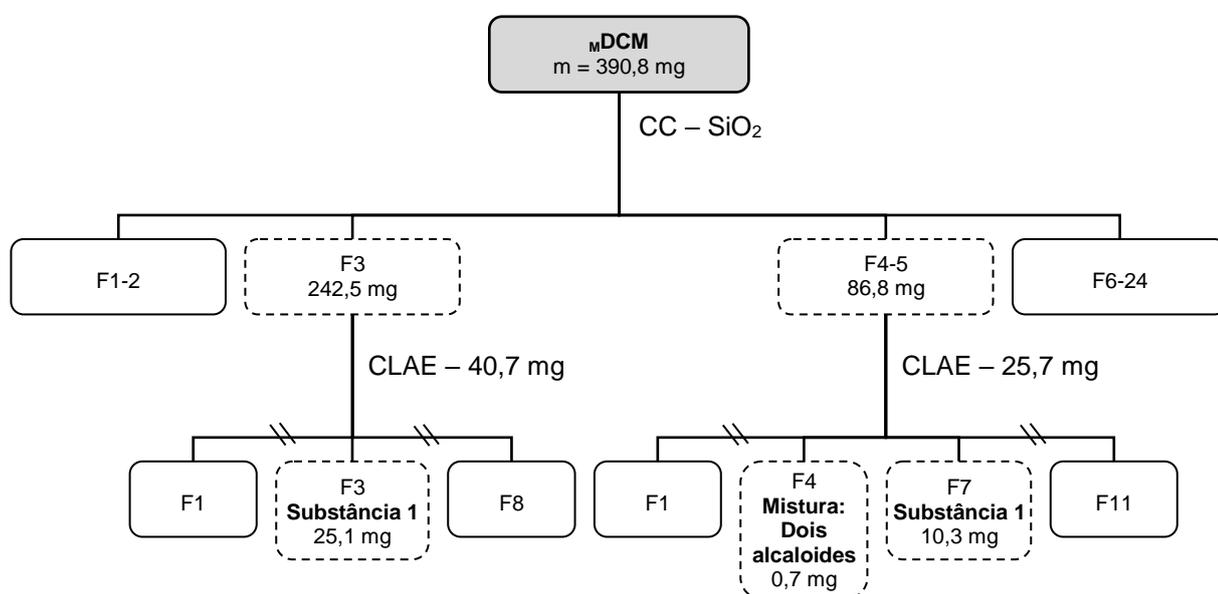
As frações F3 (242,5 mg) e F4/F5 (86,8 mg) demonstraram indícios de alcaloides verificados em CCDC revelada com reagente de Dragendorff (manchas alaranjadas), portanto, elas foram submetidas à purificação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) – Central Analítica, localizado na Universidade Federal do Amazonas. Os fracionamentos ocorreram em cromatográfico modelo UFLC® (Shimadzu) equipado com bomba LC-6AD (sistema binário), degaseificador DGU-20A5, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV, módulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 ou 500 µL). Foi utilizada uma coluna C18 (5 µm, tamanho 250 x 10 mm), marca Phenomenex. As corridas tiveram um tempo total de 35 minutos e as fases móveis utilizadas foram metanol e água miliQ 1% de ácido fórmico (pH2) nas seguintes condições: 20'-MeOH 60% e 15'-MeOH 100%.

Devido à grande quantidade de massa que essas frações possuíam, apenas parte delas foi utilizada (40,7 mg da F3 e 25,7 mg da fração F4-5) e o restante foi armazenado a -20 °C para um novo fracionamento, se necessário.

Esses fracionamentos resultaram no isolamento da **substância 1** (F3.F3 - 35,4 mg) e em uma fração com **dois alcaloides em mistura** (fração F4-5.F4 - 0,7 mg). Observa-se que a **substância 1** foi obtida em ambas corridas cromatográficas, com massa de 25,1 e 10,3 mg, respectivamente. Não foi possível realizar o isolamento dos alcaloides em mistura devido à resposta similar que seus componentes apresentaram diante das técnicas de separação utilizadas.

Todas as etapas do fracionamento deste extrato estão demonstradas na Figura 11.

Figura 11: Fluxograma do fracionamento do extrato m_{DCM} do fungo DM SB 43.



4.9.2. Fracionamento cromatográfico do extrato micélio- AcOEt

O extrato m_{AcOEt} (101,6 mg) do fungo Dm SB 43 foi fracionado através da cromatografia em coluna aberta ($h= 12,5$ cm, $\varnothing= 1,7$ cm) tendo como fase estacionária a sílica gel 60, 230-400 mesh (8,12 g). Os eluentes utilizados foram: DCM e MeOH, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade (Tabela 4). O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de 20 mL, exceto o primeiro sistema no qual utilizou-se aproximadamente 100 mL. Foram coletadas 33 frações e após serem analisadas por CCDC as frações foram reunidas de acordo com a similaridade.

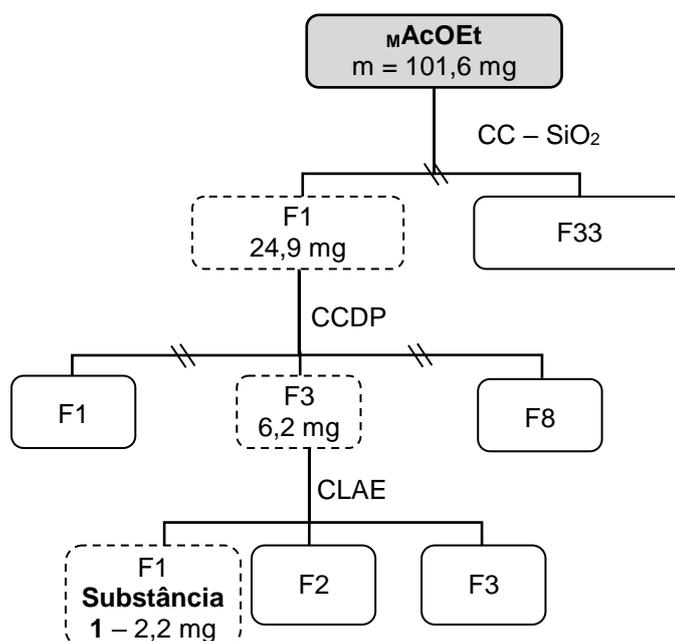
Tabela 4 - Eluentes utilizados no fracionamento do extrato m AcOEt do fungo Dm SB 43.

Frações	Eluentes
1-15	DCM 100%
16	DCM:MeOH 95:5
17	DCM:MeOH 9:1
18	DCM:MeOH 8:2
19-23	DCM:MeOH 6:4
24-28	DCM:MeOH 4:6
29-33	MeOH 100%

Apenas a fração 1 (24,9 mg) apresentou indícios de alcaloides verificados em CCDC revelada com Dragendorff (manchas alaranjadas). Essa fração foi submetida à purificação em Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), em uma placa 20 x 20 cm² e sistema de eluição AcOEt:Hexano 7:3, com 3 corridas. Obtiveram-se 8 frações, dentre elas, a fração F3 (6,2 mg) demonstrou indícios de alcaloides na CCDC. Para a purificação desta fração, realizou-se a técnica de CLAE, como demonstrada no item 4.9.1. Esse último fracionamento resultou em 3 frações, onde a fração 1, tratava-se de uma substância pura denominada **substância 1** (2,2 mg), anteriormente isolada no extrato m DCM.

Todas as etapas do fracionamento deste extrato estão demonstradas na Figura 12.

Figura 12- Fluxograma do fracionamento do extrato m_{AcOEt} do fungo DM SB 43.



4.9.3. Fracionamento cromatográfico do extrato da fase-DCM

O extrato F_{DCM} (373,5 mg) do fungo Dm SB 43 foi fracionado através da cromatografia em cartucho de Sep-pak Florisil (10 g). Os eluentes utilizados foram: DCM e MeOH, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade (Tabela 5). O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de aproximadamente 30 mL. Foram coletadas 18 frações e após a análise por CCDC as frações foram reunidas de acordo com a similaridade.

Tabela 5 - Eluentes utilizados no fracionamento do extrato m_{DCM} do fungo DM SB 43.

Frações	Eluentes
1-3	DCM 100%
4-7	DCM:MeOH 9:1
8-9	DCM:MeOH 8:2
10-12	DCM:MeOH 1:1
15-18	MeOH 100%

As frações F1-4 (125,3 mg) e F5 (166 mg) demonstraram indícios de alcaloides verificados em CCDC revelada com Dragendorff (manchas

alaranjadas) e foram submetidas a novos fracionamentos para o isolamento dos alcaloides.

4.9.3.1. Fracionamento cromatográfico de μ DCM-F1-4

O fracionamento da amostra F1-4 (125,3 mg) ocorreu em CC (h= 14 cm, \varnothing = 1,4 cm) com sílica gel 60, 230-400 mesh (10 g). Para a eluição utilizou-se os solventes: DCM, AcOEt e MeOH, puros ou em misturas binárias com ordem crescente de polaridade, de acordo com o demonstrado na Tabela 6. O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de 20 mL. Este fracionamento totalizou em 24 frações que após a análise por CCDC foram reunidas de acordo com a semelhança entre elas.

Tabela 6 - Eluentes utilizados no fracionamento de μ DCM.F1-4

Frações	Eluentes
1-5	DCM 100%
6-7	DCM:AcOEt 95:5
8-9	DCM:AcOEt 9:1
10-11	DCM:AcOEt 85:15
12-13	DCM:AcOEt 8:2
14-15	DCM:AcOEt 7:3
16-17	DCM:AcOEt 1:1
18-19	AcOEt 100%
20-21	AcOEt:MeOH 1:1
22-24	MeOH 100%

As frações F1-4.F2, F1-4.F3 e F1-4.F4 (121,07 mg) foram reunidas e apresentaram manchas alaranjadas na CCDC revelada com Dragendorff, portanto, prosseguiu-se com a purificação através de CC (h= 35 cm, \varnothing = 1 cm) com Sephadex. Utilizou-se como eluente o solvente MeOH e foram obtidas 21 frações. Essas frações foram analisadas por CCDC e após reunião das amostras similares, prosseguiu-se com a purificação da fração F1-4.F2-4.**F2-3** (101,9 mg), positiva quando revelada com Dragendorff.

Para a purificação da fração F1-4.F2-4.**F2-3** (101,9 mg) utilizou-se uma CC (h= 12 cm, Ø= 1,4 cm) de sílica. Para a eluição empregou-se DCM e MeOH, puros ou em misturas com grau de polaridade crescente. Foram adicionados à coluna aproximadamente 20 mL de cada sistema (Tabela 7).

Tabela 7 - Eluentes utilizados no fracionamento de $\text{FDCM.F1-4.F2-4.F2-3}$

Frações	Eluentes
1-10	DCM:MeOH 99:1
11-17	DCM:MeOH 6:4
18-25	DCM:MeOH 3:7
26-30	MeOH 100%

As frações F1-4.F2-4.F2-3.**F3-4** (41,3 mg) apresentaram indícios de alcaloides quando analisadas por CCDC e foram submetidas à purificação com Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, nas mesmas condições que o descrito no item 4.9.1. Essa purificação resultou em 12 frações e no isolamento da **substância 1** (16,2 mg).

4.9.3.2. Fracionamento cromatográfico de FDCM-F5

O fracionamento de F5 (166 mg) ocorreu em CC (h= 17,5 cm, Ø= 1,4 cm) com sílica gel 60, 230-400 mesh (11,62 g). Para a eluição utilizou-se os solventes: DCM e MeOH, puros e em misturas em ordem crescente de polaridade (Tabela 8). O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de 25 mL. Foram obtidas 24 frações e após a CCDC foram reunidas de acordo com a semelhança entre elas.

Tabela 8 - Eluentes utilizados no fracionamento de FDCM.F5

Frações Coletadas	Eluentes
1-6	DCM 100%
7-9	DCM:MeOH 98:2
10-13	DCM:MeOH 95:5
14-16	DCM:MeOH 9:1
17-18	DCM:MeOH 8:2
19-20	DCM:MeOH 7:3
21-22	DCM:MeOH 1:1
23-24	MeOH 100%

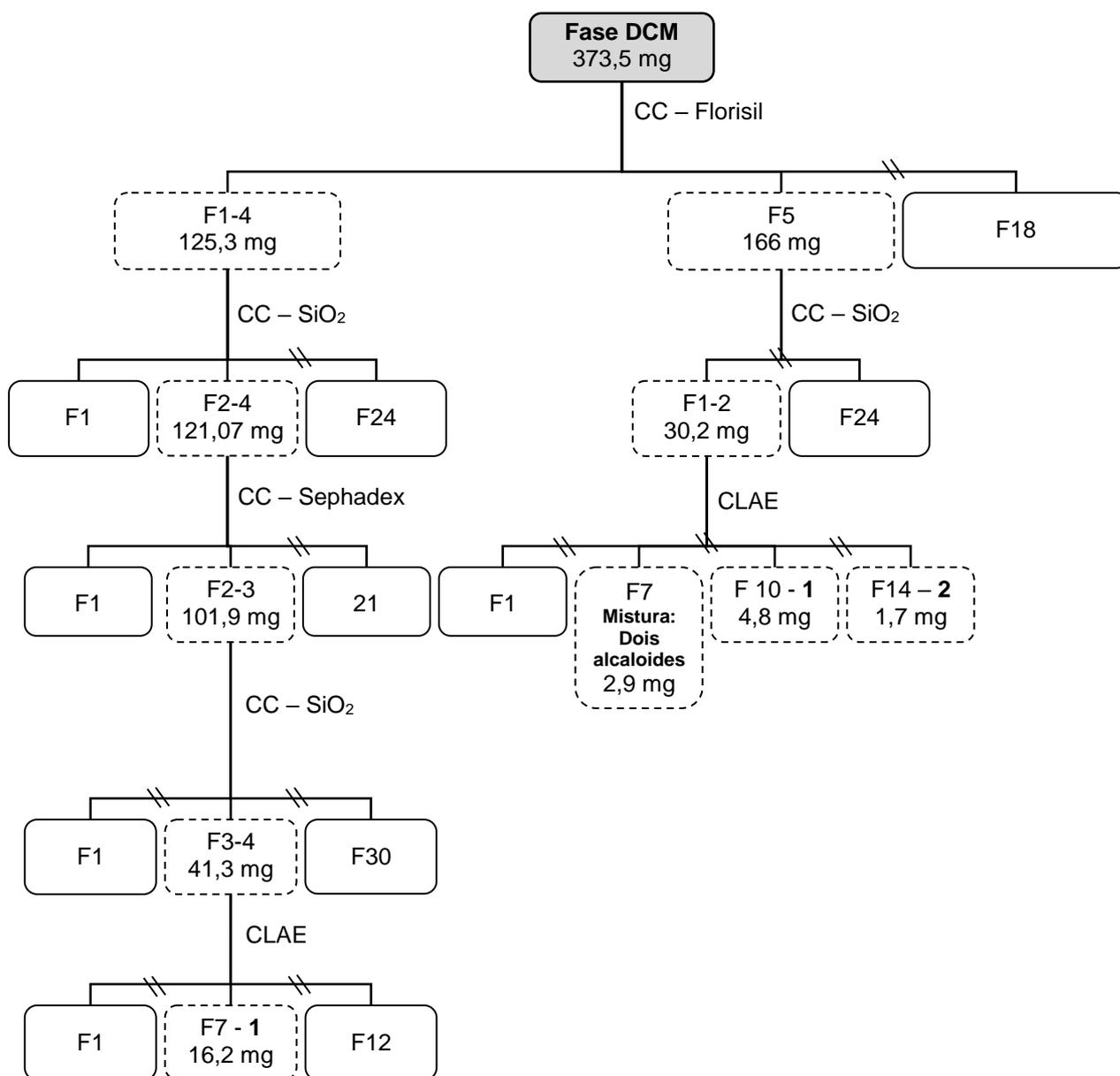
As frações F5.F1 e F5.F2 foram reunidas (30,2 mg) e submetidas à purificação por CLAE, por apresentarem resultado positivo na CCDC revelada com Dragendorff (manchas alaranjadas). Essa purificação ocorreu nas mesmas condições que a do item 4.9.1.

Essa purificação resultou em 14 frações, no isolamento da **substância 1** (4,8 mg), da **substância 2** (1,7 mg) e na fração F7 que continha uma **mistura de dois alcaloides** (2,9 mg). A mistura de alcaloides foi idêntica a obtida no extrato micélio-DCM (item 5.9.1.1).

Todas etapas de fracionamento e obtenção das substâncias do extrato FDCM estão descritos na Figura 13.

Na cromatografia líquida de alta eficiência realizada em todos os fracionamentos descritos acima foram obtidas frações com substâncias quimicamente relevantes (como por exemplo terpenos). Entretanto, não foi possível dar prosseguimento ao isolamento dessas substâncias, por ainda estarem em frações complexas e com pouca massa.

Figura 13 - Fluxograma do fracionamento do extrato rDCM do fungo Dm SB 43.



4.10. Identificação das substâncias isoladas

As substâncias isoladas foram identificadas através da análise dos espectros de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio e de Carbono treze (^1H e ^{13}C , uni e bidimensionais) em CDCl_3 e de espectrometria de massas (Espectrômetro modelo MircoTOF-Q II, Brucker Daltonics, fonte de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+), resolução de 17500 FWHM).

4.11. Ensaio Antitumoral

Os extratos provenientes do segundo cultivo submerso e uma substância isolada (1) foram submetidos ao ensaio antitumoral usando o método Alamar Blue™ (AHMED; GOGAL; WALSH, 1994). O teste foi realizado no Laboratório de Atividade Biológica (Biophar), na Universidade Federal do Amazonas sob a supervisão da Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos.

Foram utilizadas as linhagens neoplásicas MCF7 (adenocarcinoma de mama), HCT 116 (carcinoma de coloretal) e DU-145 (carcinoma de próstata), e a linhagem celular não neoplásica MRC-5 (fibroblasto humano). Todas as células foram cultivadas em meio de cultivo DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico (estreptomicina e penicilina), mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

Todas as amostras foram dissolvidas em dimetil-sulfóxido (DMSO), e diluídas em meio de cultura para a concentração final de 50 µg/mL para os extratos e 20 µM para a substância.

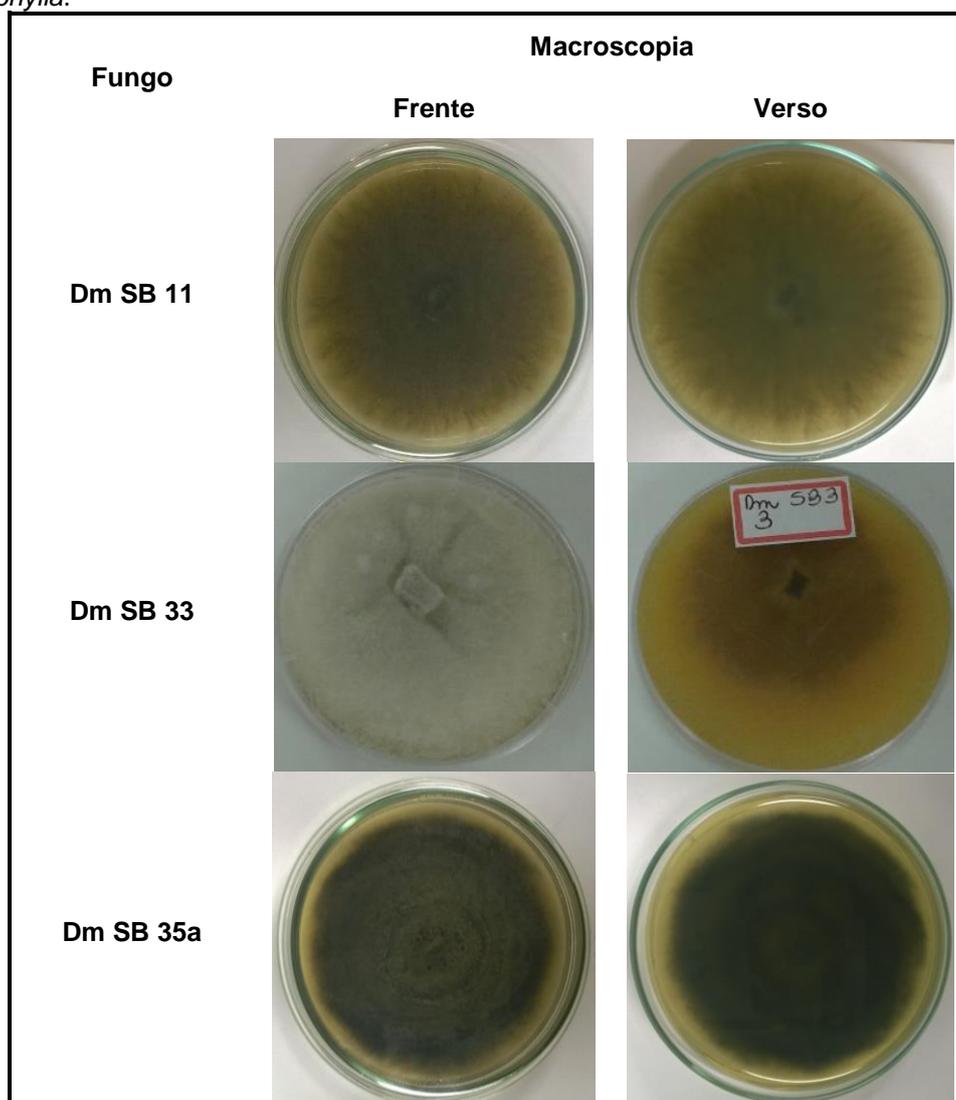
As células foram cultivadas em garrafa de cultura com meio DMEM completo, e para o teste foram transferidas para placas de 96 poços (10⁴ células/poço). As placas foram incubadas por 24 h em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO₂. Posteriormente, a substância e os extratos foram adicionados aos poços e a placa permaneceu incubada por 48 horas nas mesmas condições. Como controle negativo utilizou-se DMSO 0,2% e doxorubicina (10 µM) como controle positivo. Após 48 h, 10 µL da solução de uso de Alamar Blue™ (solução estoque 0,4% 1:20 em meio de cultura sem soro fetal bovino) foi adicionada em cada poço. Após 3 h de exposição ao Alamar Blue™, a fluorescência foi medida usando-se um leitor de placas de elisa (marca Beckman e Coulter), (465 nm de emissão e 540 nm de excitação). Os resultados foram analisados e comparados aos controles do teste.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

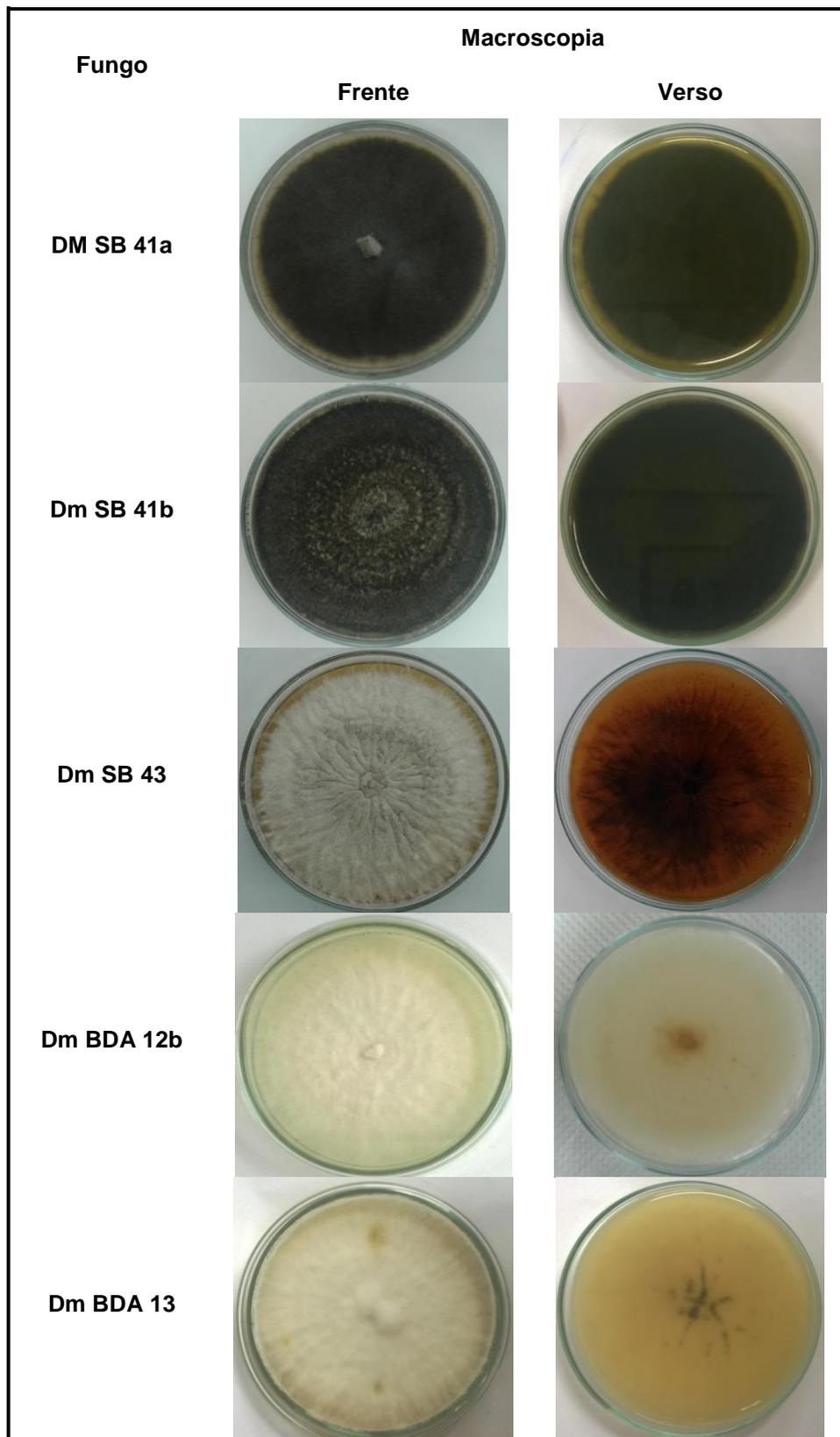
5.1. Isolamento dos Fungos Endofíticos e Taxa de Colonização

Foram isolados e purificados 47 fungos endofíticos a partir de 50 fragmentos foliares, resultando em uma taxa de colonização de 94%. De acordo com as características morfológicas, macro e microscópicas (colônia: tipo de borda, raio de crescimento, relevo, textura, coloração; tipo de hifas, presença e formato de esporos) selecionaram-se 21 fungos diferentes para a realização das fermentações submersas (Figura 14).

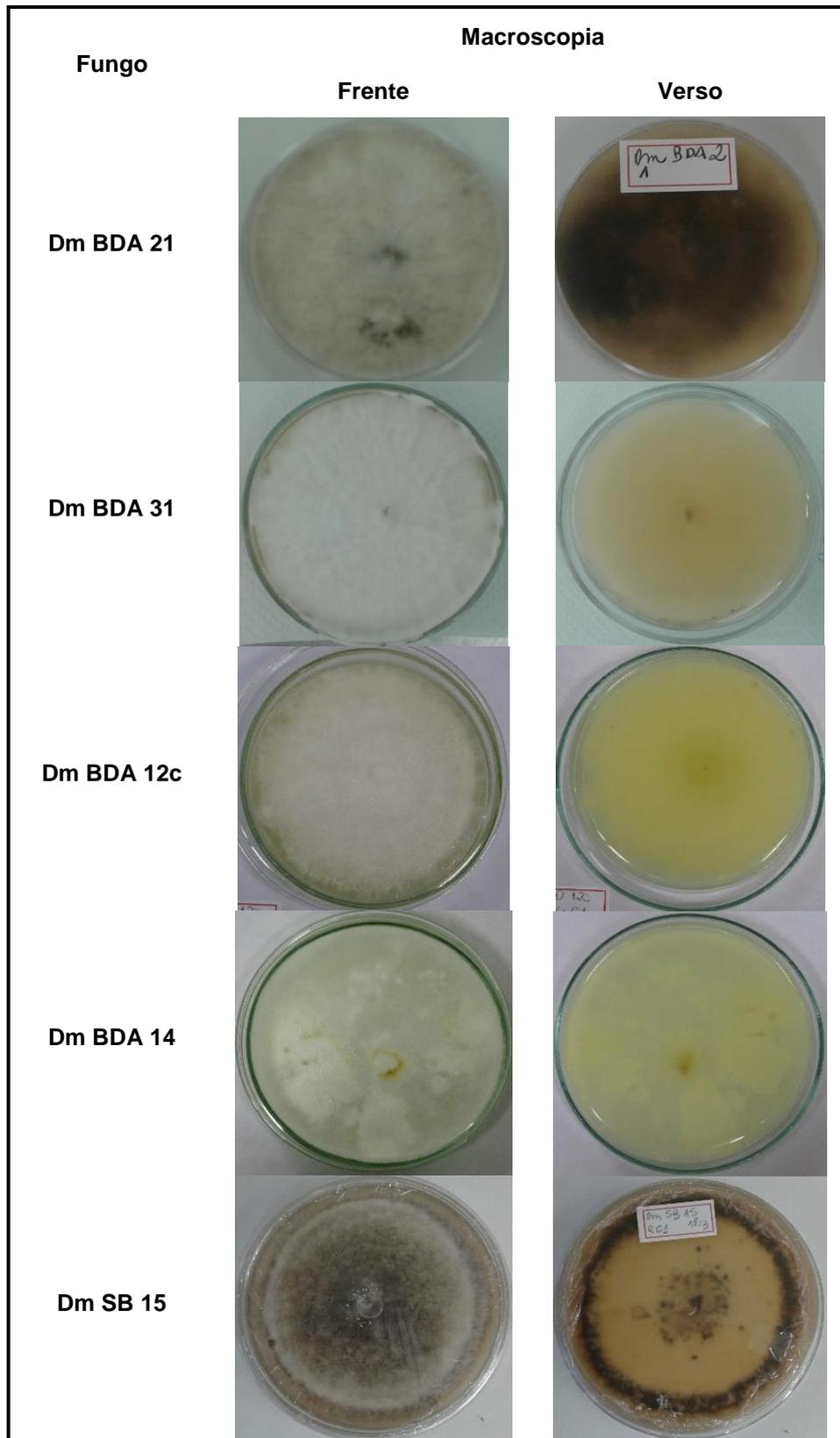
Figura 14 - Características macroscópicas dos fungos endofíticos isolados de *Duroia macrophylla*.



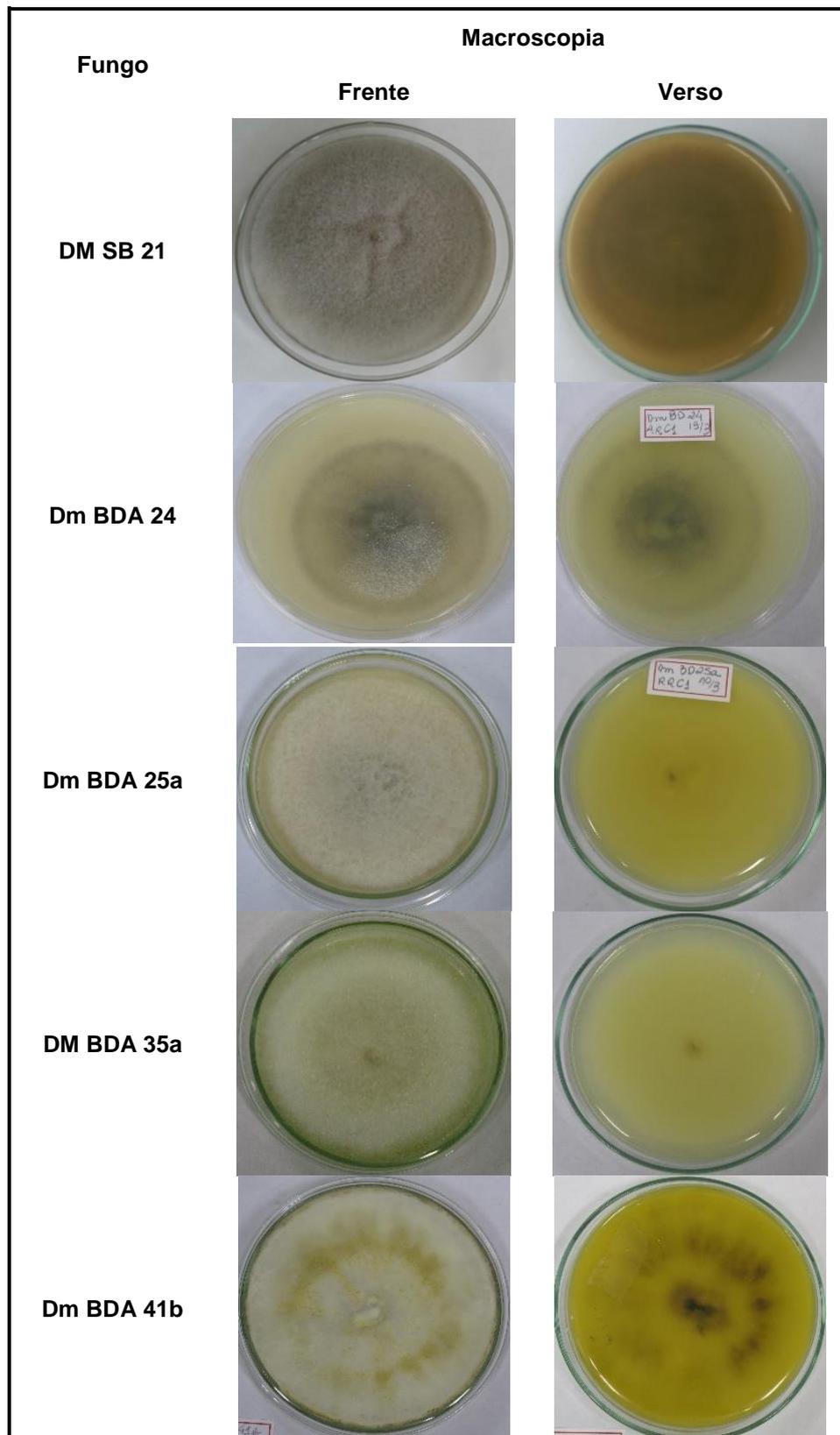
Continuação da Figura 14 - Características macroscópicas dos grupos dos fungos endofíticos isolados de *Duroia macrophylla*.



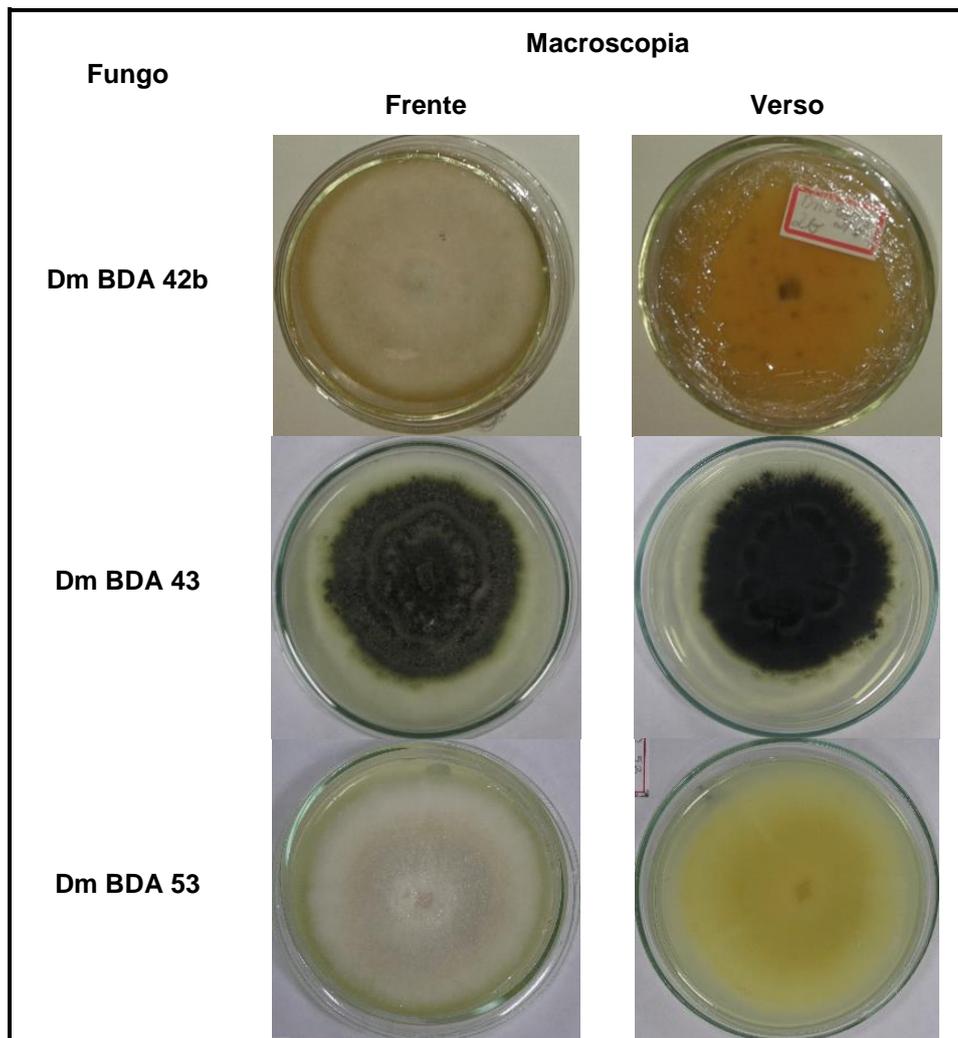
Continuação da Figura 14 - Características macroscópicas dos grupos dos fungos endofíticos isolados de *Duroia macrophylla*.



Continuação da Figura 14 - Características macroscópicas dos grupos dos fungos endofíticos isolados de *Duroia macrophylla*.



Continuação da Figura 14 - Características macroscópicas dos grupos dos fungos endofíticos isolados de *Duroia macrophylla*.



Ao analisar os micro-organismos isolados, observa-se que a comunidade de fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* é diversa, sendo composta por fungos morfologicamente distintos, bem como ocorre em outras espécies da família Rubiaceae. A seguir estão descritos alguns trabalhos que apresentam essa diversidade fúngica em hospedeiros de Rubiaceae.

A presença de fungos endofíticos em *Mussaenda luteola* foi analisada e registrada por Gunasekaran, Sathiavelu e Arunachalam (2017). A partir das folhas eles isolaram *Aspergillus* sp. e *Xylaria* sp., e a partir das folhas e caule obtiveram os fungos *Alternaria* sp. e *Penicillium* sp.

Vieira e colaboradores (2012) isolaram das folhas de *Ixora coccinea* os seguintes gêneros: *Curvularia*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Pestalotiopsis*, *Phoma* e *Xylaria*, dentre estes, os mais frequentes foram: *Phoma* e *Curvularia*.

Vinte e dois diferentes fungos foram isolados a partir de folhas de *Coffea arabica*: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Hypoxilan* sp., *Phomopsis* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Phoma herbarum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Xylaria* sp., *Colletotrichum crassipes*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *Pseudohalonectria lútea*, *Staninwardia* sp., *Alternaria alternata*, *Periconia* sp., *Paracyclothyrium* sp., *Libertella* sp., *Phomopsis stipata*, *Myrothecium roridum*, *Microascus* sp., *Leptosphaeria* sp., *Microsphaeropsis* sp., *Microsphaeropsis* sp. e *Guignardia* sp. (FERNANDES et al., 2009).

Outros fungos descritos em espécies de rubiáceas são: *Camarops* sp., *Curvularia geniculata*, *Sporormiella minimoides*, *Acreminium furcatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Xylaria cubensis*, *Xylaria grammica*, *Nemania diffusa*, *Mycoleptodiscus indicus*, *Trichoderma atroviride*, dentre outros (ANDRIOLI et al., 2012; CHOMCHEON et al., 2010; GUBIANI, 2011; LEYTE-LUGO et al., 2013; OKANE et al., 2012; PU et al., 2013).

Observa-se que o isolamento e a bioprospecção dos endófitos em espécies de rubiáceas ocorre em várias regiões do mundo: Equador, Indonésia, México, Tailândia, China, Espanha, Estados Unidos, Malásia, Colômbia, Havaí, Porto Rico, Bolívia, etc (BARNES et al., 2016; CHOMCHEON et al., 2010; CUMMINGS et al., 2016; FORCINA et al., 2015; ILYAS et al., 2009; LEYTE-LUGO et al., 2013; MACIA-VICENTE et al., 2008; MAEHARA et al., 2010; MEI et al., 2012; RIVERA-CHÁVEZ et al., 2013; VEGA et al., 2010; WU et al., 2015; ZHENG et al., 2012).

No Brasil existem relatos de endófitos dessa família em *Coffea arabica*, *Alibertia macrophylla*, *Palicourea marcgravii* e *Borreria verticillata* (ANDRIOLI et al., 2012; CAFÊU et al., 2005; FERNANDES et al., 2009; GUBIANI, 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

A descrição de fungos endofíticos associados ao gênero *Duroia* é extremamente escassa. Além desta pesquisa com endófitos de *Duroia macrophylla* encontra-se na literatura apenas o estudo com *Duroia hirsuta* que possibilitou o isolamento de *Stelliosphaera formicum*, uma nova espécie

fúngica com atividade contra *S. aureus* (FORCINA et al., 2015). Portanto, a presente pesquisa possui um importante papel para a contribuição do conhecimento de endófitos e de seus extratos em espécies de *Duroia*.

5.2. Parte 1: Obtenção dos Extratos Fúngicos para a Realização da Triagem Inicial

As extrações do cultivo submerso dos 21 fungos resultaram em diferentes quantidades de extratos e, em todos os casos, os extratos Micélio-MeOH apresentaram maior massa (de 190,2 a 714,4 mg) (Tabela 9).

Tabela 9 - Massas dos extratos dos fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.

Fungo	Massa dos Extratos (mg)				
	Micélio			Fase	
	_M DCM	_M AcOEt	_M MeOH	_F DCM	_F AcOEt
Dm SB 11	6,6	7,5	254,8	19,6	96,8
Dm SB 33	2,5	5,4	250,6	0	68,4
Dm SB 35a	4,8	13,7	555,8	26	41,9
Dm SB 41a	64,8	6,2	450,3	21	21,4
Dm SB 41b	18	21,3	460,0	7,5	0
Dm SB 43	4,4	5,0	464,9	23	85,5
Dm BDA 12b	0,7	3,7	550,0	21,5	57,6
Dm BDA 13	4,0	8,9	664,0	22,3	51,4
Dm BDA 21	58,2	13,3	271,6	4,4	4,8
DM BDA 31	3,5	4,4	502,2	31,8	79
Dm BDA 12c	2,3	9,6	463,3	20,2	103
Dm BDA14	0	4,0	390,8	15,3	70
Dm SB 15	3,4	6,7	501,6	19,6	15
Dm SB 21	2,8	10,9	714,4	31,3	45,4
Dm BDA 24	0	2,5	272,6	9,5	309,7
Dm BDA 25a	0,4	2,5	190,2	30	83,9
Dm BDA 35a	1,0	1,8	270,5	9,9	17
Dm BDA 41b	0,1	4,7	302,8	9,6	33,9
Dm BDA 42b	0,6	1,9	254,2	7,7	27,2
Dm BDA 43	2,5	5,5	406,8	8,7	70
Dm BDA 53	1,9	3,7	318,8	4,3	12,3

_MDCM – extrato micélio-diclorometano, _MAcOEt – extrato micélio-acetato de etila, _MMeOH – extrato micélio-metanol, _FDCM – fase-diclorometano, _FAcOEt – fase-acetato de etila.

5.3. Parte 1: Prospecção Química dos Extratos

A prospecção química dos extratos revelou indícios de substâncias com duplas ligações, substâncias fenólicas, alcaloides, terpenos, açúcares e graxas. A presença de alcaloides foi detectada nos extratos diclorometânicos dos micélios dos fungos Dm SB 43 e Dm BDA 41b e nos líquidos metabólicos extraídos com DCM (fase-DCM) dos fungos Dm SB 43, Dm BDA 13 e Dm BDA 21 como apresentado a seguir.

5.3.1. Análise Cromatográfica dos Extratos

Os extratos resultantes da extração dos micélios com DCM foram eluídos em sistema DCM/AcOEt 8:2 e seus resultados estão mostrados na Tabela 10 e na Figura 15. Os extratos 6 e 7, 13 e 14 apresentaram-se semelhantes nos sistemas de eluição e reveladores utilizados.

Dentre esses extratos dois apresentaram indícios de alcaloides: SB 43 e BDA 41b. As manchas que foram positivas no revelador de Dragendorff também apresentam fluorescência na UV 254 nm, como na maioria dos alcaloides (WAGNER; BLADT, 1996).

Todos os extratos apresentaram fluorescência na luz UV nos dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) e manchas amarronzadas na presença de vapores de iodo, indicando a presença de substâncias com ligações com ligações duplas e duplas ligações conjugadas.

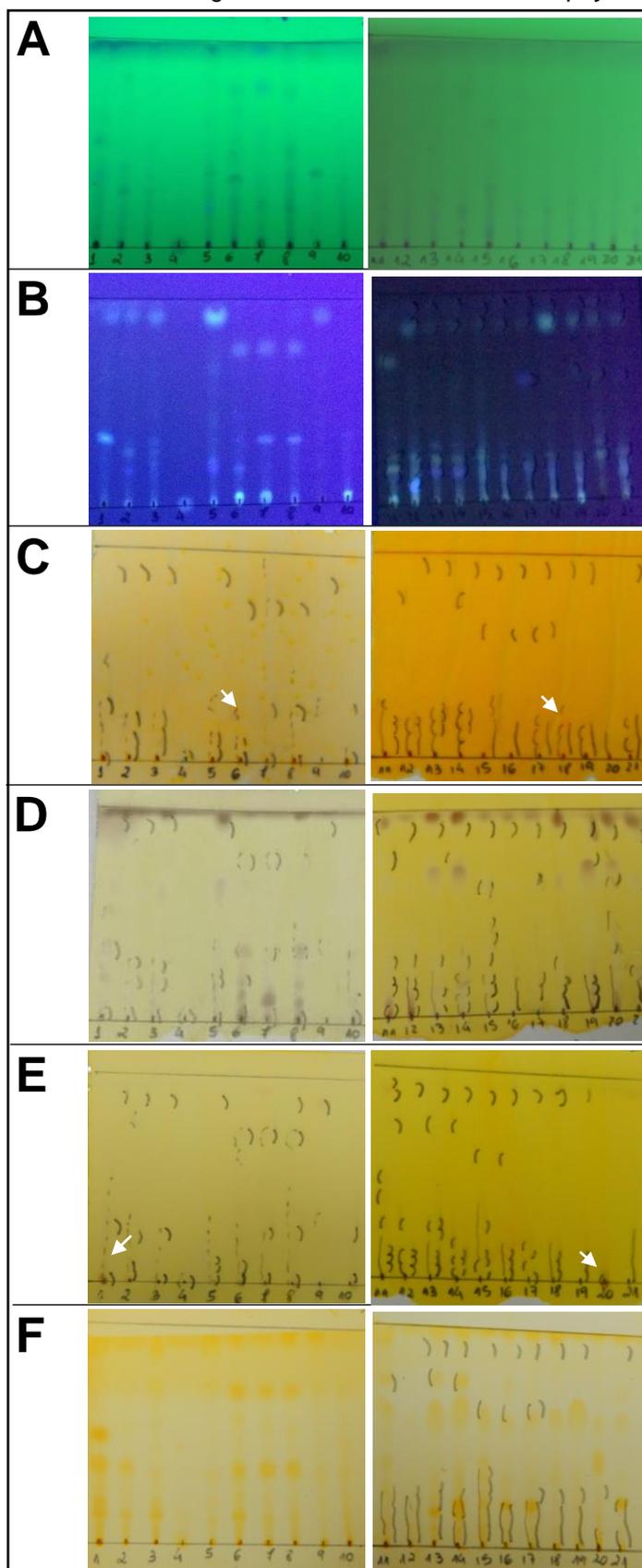
Apenas três extratos não demonstraram a presença de terpenos (manchas roxas em $Ce(SO_4)_2$) e dois extratos possuem indícios de substâncias fenólicas (revelador $FeCl_3$).

Tabela 10 - Resultados da análise em CCDC dos extratos diclometânicos dos micélios dos 21 fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.

Nº	Fungo	Reveladores					
		UV 254 nm	UV 365 nm	Dragendorff	Ce(SO ₄) ₂	FeCl ₃	Iodo
1	Dm SB 11	+	+	-	+	+	+
2	Dm SB 33	+	+	-	-	-	+
3	Dm SB 35a	+	+	-	+	-	+
4	DM SB 41a	+	+	-	-	-	+
5	Dm SB 41b	+	+	-	+	-	+
6	Dm SB 43	+	+	+	+	-	+
7	Dm BDA 12b	+	+	-	+	-	+
8	Dm BDA 13	+	+	-	+	-	+
9	Dm BDA 21	+	+	-	-	-	+
10	Dm BDA31	+	+	-	+	-	+
11	Dm BDA 12c	+	+	-	+	-	+
12	Dm BDA 14	+	+	-	+	-	+
13	Dm SB 15	+	+	-	+	-	+
14	DM SB 21	+	+	-	+	-	+
15	Dm BDA 24	+	+	-	+	-	+
16	Dm BDA 25a	+	+	-	+	-	+
17	DM BDA 35a	+	+	-	+	-	+
18	Dm BDA 41b	+	+	+	+	-	+
19	Dm BDA 42b	+	+	-	+	-	+
20	Dm BDA 43	+	+	-	+	+	+
21	Dm BDA 53	+	+	-	+	-	+

+ presença de manchas, - ausência de manchas

Figura 15 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada dos extratos diclorometânicos dos micélios dos 21 fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.



A: UV 254 nm, B: UV 365 nm, C: Dragendorff, D: sulfato cérico, E: cloreto férrico, F: iodo.
Sistema de Eluição: DCM/AcOEt 8:2.

Os extratos resultantes da extração dos micélios com AcOEt foram eluídos em sistema DCM:AcOEt 9:1 e seus resultados estão mostrados na Tabela 11 e na Figura 16. Os extratos 2 e 3 apresentaram-se semelhantes nos sistemas de eluição e reveladores utilizados.

Nenhum extrato de m AcOEt foi positivo para a presença de alcaloides (Revelador Dragendorff). Todos apresentaram fluorescência na luz UV 254 nm e manchas marrons em iodo, portanto há indícios de substâncias com ligações duplas. Apenas um extrato não foi revelado na luz UV 365 nm, portanto não possui substâncias com duplas ligações conjugadas.

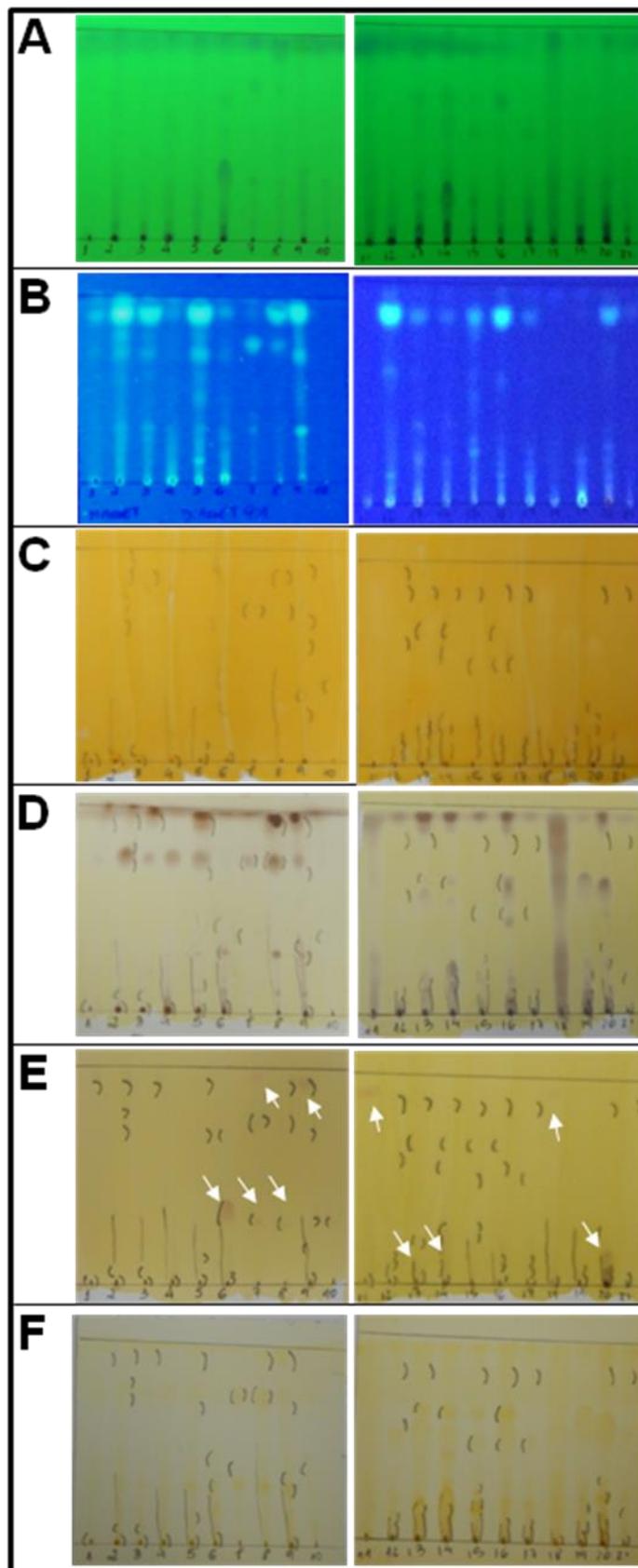
O revelador sulfato cérico reagiu com todos extratos exceto um que não deve possuir terpenos em sua composição. Observaram-se manchas azuis esverdeadas em nove extratos na presença de cloreto férrico, indicando a presença de substâncias fenólicas.

Tabela 11 - Resultados da análise em CCDC dos extratos de acetato de etila dos micélios dos 21 fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.

Nº	Fungo	Reveladores					
		UV 254 nm	UV 365 nm	Dragendorff	Ce(SO ₄) ₂	FeCl ₃	Iodo
1	Dm SB 11	+	+	-	+	-	+
2	Dm SB 33	+	+	-	+	-	+
3	Dm SB 35a	+	+	-	+	-	+
4	DM SB 41a	+	+	-	+	-	+
5	Dm SB 41b	+	+	-	+	-	+
6	Dm SB 43	+	+	-	+	+	+
7	Dm BDA 12b	+	+	-	+	+	+
8	Dm BDA 13	+	+	-	+	+	+
9	Dm BDA 21	+	+	-	+	+	+
10	Dm BDA31	+	-	-	-	-	+
11	Dm BDA 12c	+	+	-	+	+	+
12	Dm BDA 14	+	+	-	+	-	+
13	Dm SB 15	+	+	-	+	+	+
14	DM SB 21	+	+	-	+	+	+
15	Dm BDA 24	+	+	-	+	-	+
16	Dm BDA 25a	+	+	-	+	-	+
17	DM BDA 35a	+	+	-	+	-	+
18	Dm BDA 41b	+	+	-	+	+	+
19	Dm BDA 42b	+	+	-	+	-	+
20	Dm BDA 43	+	+	-	+	+	+
21	Dm BDA 53	+	+	-	+	-	+

+ presença de manchas, - ausência de manchas

Figura 16 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada dos extratos de acetato de etila dos micélios dos 21 fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.



A: UV 254 nm, B: UV 365 nm, C: Dragendorff, D: sulfato cérico, E: cloreto férrico, F: iodo.
Sistema de Eluição: DCM/AcOEt 9:1.

Os extratos resultantes da extração dos micélios com MeOH foram eluídos em sistema DCM/Acetona 9:1 e seus resultados estão mostrados na Tabela 12 e na Figura 16. Os extratos 2 e 3 apresentaram-se semelhantes nos sistemas de eluição e reveladores utilizados.

Todos os extratos apresentaram-se positivos para os reveladores UV 254 nm, UV 365 nm, $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ e iodo, indicando a presença de substâncias com ligações duplas, ligações duplas conjugadas e terpenos.

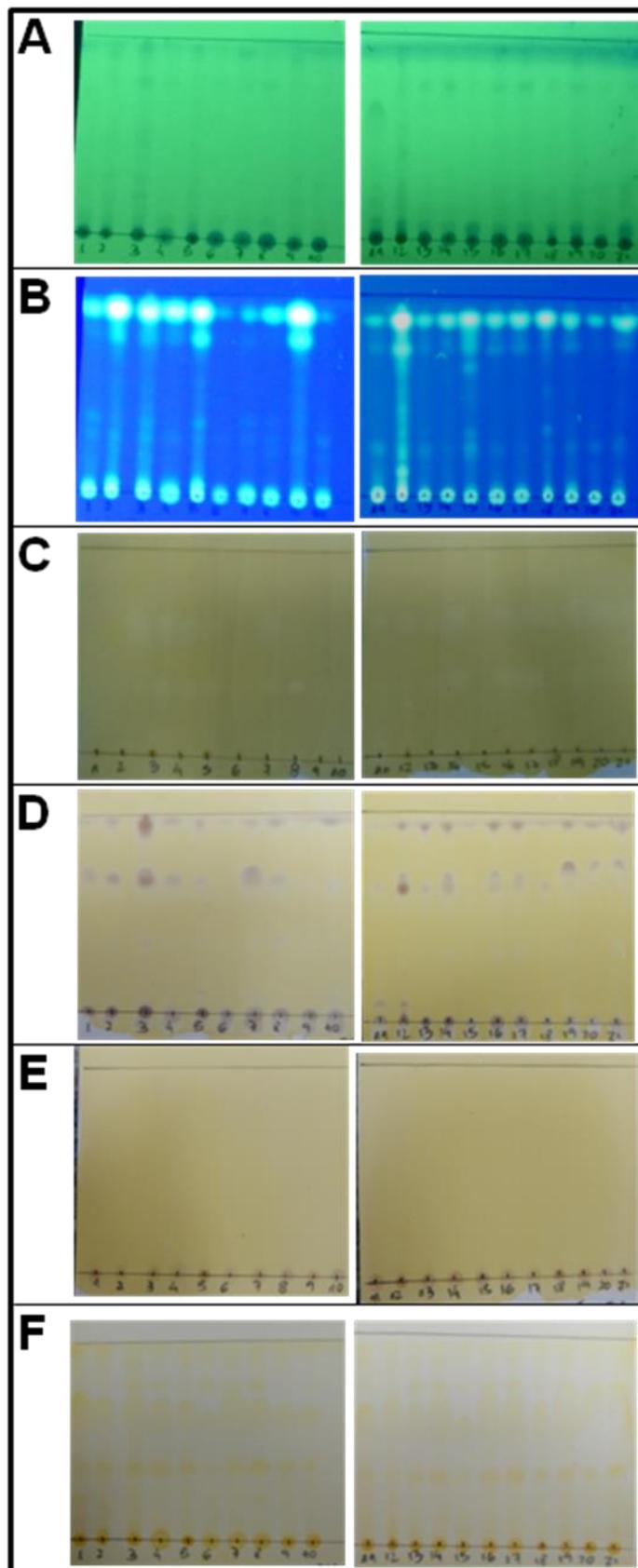
Apenas um extrato não apresentou indícios de substâncias fenólicas e nenhum apresentou manchas alaranjadas no revelador Dragendorff.

Tabela 12 - Resultados da análise em CCDC dos extratos de metanólicos dos micélios dos 21 fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.

Nº	Fungo	Reveladores					
		UV 254 nm	UV 365 nm	Dragendorff	$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	FeCl_3	Iodo
1	Dm SB 11	+	+	-	+	+	+
2	Dm SB 33	+	+	-	+	+	+
3	Dm SB 35a	+	+	-	+	+	+
4	DM SB 41a	+	+	-	+	-	+
5	Dm SB 41b	+	+	-	+	+	+
6	Dm SB 43	+	+	-	+	+	+
7	Dm BDA 12b	+	+	-	+	+	+
8	Dm BDA 13	+	+	-	+	+	+
9	Dm BDA 21	+	+	-	+	+	+
10	Dm BDA31	+	+	-	+	+	+
11	Dm BDA 12c	+	+	-	+	+	+
12	Dm BDA 14	+	+	-	+	+	+
13	Dm SB 15	+	+	-	+	+	+
14	DM SB 21	+	+	-	+	+	+
15	Dm BDA 24	+	+	-	+	+	+
16	Dm BDA 25a	+	+	-	+	+	+
17	DM BDA 35a	+	+	-	+	+	+
18	Dm BDA 41b	+	+	-	+	+	+
19	Dm BDA 42b	+	+	-	+	+	+
20	Dm BDA 43	+	+	-	+	+	+
21	Dm BDA 53	+	+	-	+	+	+

+ presença de manchas, - ausência de manchas

Figura 17 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada dos extratos metanólicos dos micélios dos 21 fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.



A: UV 254 nm, B: UV 365 nm, C: Dragendorff, D: sulfato cérico, E: cloreto férrico, F: iodo. Sistema de Eluição: DCM/Acetona 9:1.

Os extratos resultantes da partição dos líquidos metabólicos com DCM foram eluídos em sistema DCM/AcOEt 9:1 e seus resultados estão mostrados na Tabela 13 e na Figura 18. Os extratos 2, 3 e 4, 13 e 14 apresentaram-se semelhantes entre si nos sistemas de eluição e reveladores utilizados.

Todos os extratos apresentam indícios de substâncias com duplas ligações, duplas ligações conjugadas e terpenos (positivos nos reveladores: iodo, UV 254 nm, UV 365 nm e $Ce(SO_4)_2$).

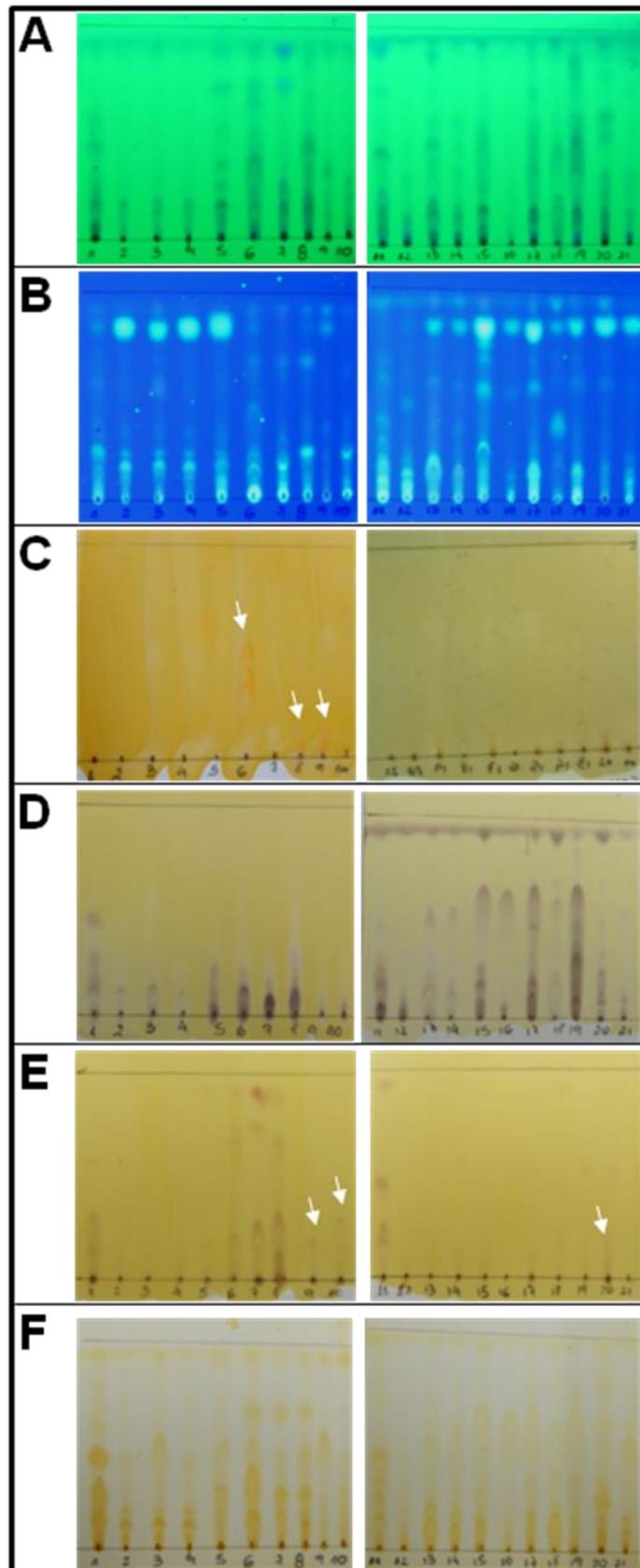
Três extratos possuem indicativos da presença de alcaloides (manchas alaranjadas em Dragendorff) e oito de substâncias fenólicas ($FeCl_3$). As manchas que foram positivas no revelador de Dragendorff também apresentam fluorescência na UV 254nm, como na maioria dos alcaloides (WAGNER; BLADT, 1996).

Tabela 13 - Resultados da análise em CCDC das partições com diclorometano dos líquidos metabólicos dos 21 fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.

Nº	Fungo	Reveladores					
		UV 254 nm	UV 365 nm	Dragendorff	$Ce(SO_4)_2$	$FeCl_3$	Iodo
1	Dm SB 11	+	+	-	+	+	+
2	Dm SB 33	+	+	-	+	-	+
3	Dm SB 35a	+	+	-	+	-	+
4	DM SB 41a	+	+	-	+	-	+
5	Dm SB 41b	+	+	-	+	-	+
6	Dm SB 43	+	+	+	+	+	+
7	Dm BDA 12b	+	+	-	+	+	+
8	Dm BDA 13	+	+	+	+	+	+
9	Dm BDA 21	+	+	+	+	+	+
10	Dm BDA31	+	+	-	+	+	+
11	Dm BDA 12c	+	+	-	+	+	+
12	Dm BDA 14	+	+	-	+	-	+
13	Dm SB 15	+	+	-	+	-	+
14	DM SB 21	+	+	-	+	-	+
15	Dm BDA 24	+	+	-	+	-	+
16	Dm BDA 25a	+	+	-	+	-	+
17	DM BDA 35a	+	+	-	+	-	+
18	Dm BDA 41b	+	+	-	+	-	+
19	Dm BDA 42b	+	+	-	+	-	+
20	Dm BDA 43	+	+	-	+	+	+
21	Dm BDA 53	+	+	-	+	-	+

+ presença de manchas, - ausência de manchas

Figura 18 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada das partições com diclorometano dos líquidos metabólicos dos 21 fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.



A: UV 254 nm, B: UV 365 nm, C: Dragendorff, D: sulfato cérico, E: cloreto férrico, F: iodo. Sistema de Eluição: DCM/AcOEt 9:1.

Os extratos resultantes da partição dos líquidos metabólicos com AcOEt foram eluídos em sistema DCM/Acetona 8:2 e seus resultados estão descritos na Tabela 14 e na Figura 19.

Todos os extratos foram positivos para os reveladores: UV 254 nm, UV 365 nm e iodo, portanto suas composições têm indícios de substâncias com duplas ligações e duplas ligações conjugadas.

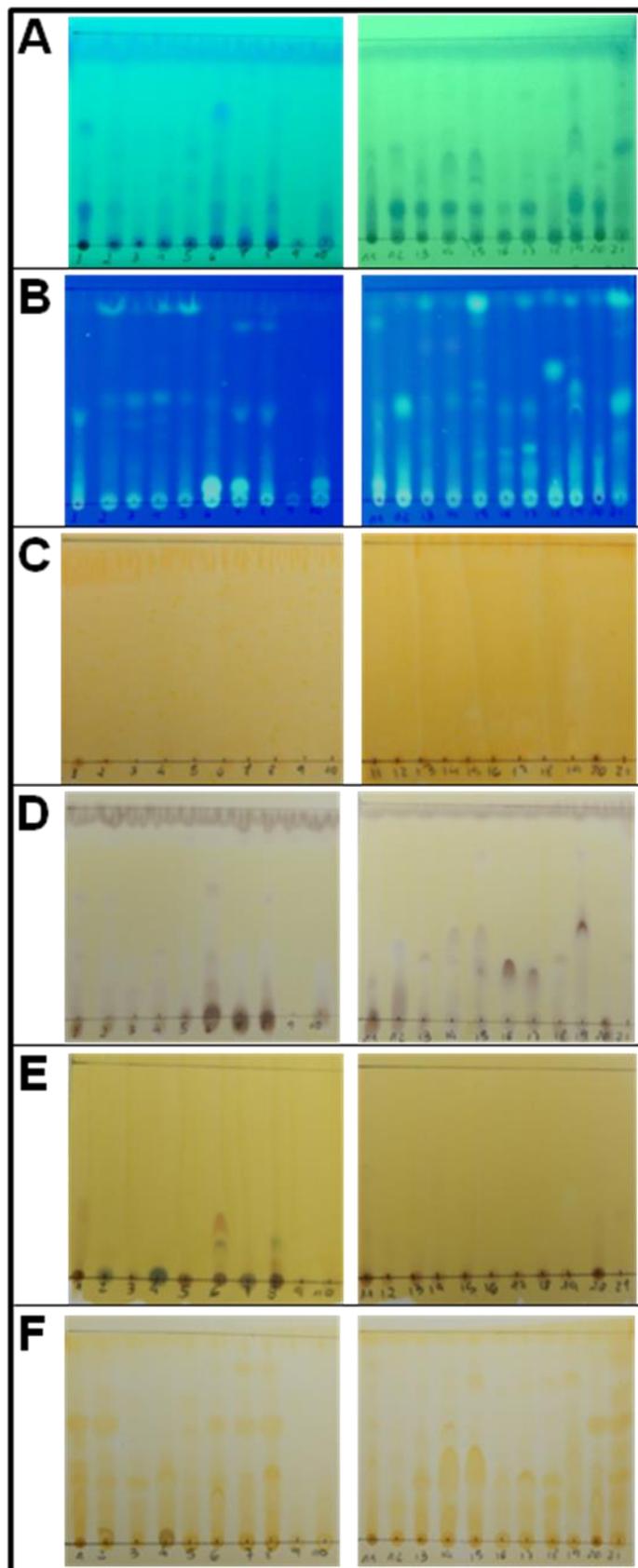
Nenhum extrato foi positivo para a presença de alcaloides (Dragendorff), todos exceto um, têm indicativos de terpenos e dezesseis foram positivos para a presença de substâncias fenólicas (FeCl₃).

Tabela 14 - Resultados da análise de CCDC das partições com acetato de etila dos líquidos metabólicos dos 21 fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.

Nº	Fungo	Reveladores					
		UV 254 nm	UV 365 nm	Dragendorff	Ce(SO ₄) ₂	FeCl ₃	Iodo
1	Dm SB 11	+	+	-	+	+	+
2	Dm SB 33	+	+	-	+	+	+
3	Dm SB 35a	+	+	-	+	-	+
4	DM SB 41a	+	+	-	+	+	+
5	Dm SB 41b	+	+	-	+	+	+
6	Dm SB 43	+	+	-	+	+	+
7	Dm BDA 12b	+	+	-	+	+	+
8	Dm BDA 13	+	+	-	+	+	+
9	Dm BDA 21	+	+	-	-	-	+
10	Dm BDA31	+	+	-	+	-	+
11	Dm BDA 12c	+	+	-	+	+	+
12	Dm BDA 14	+	+	-	+	+	+
13	Dm SB 15	+	+	-	+	+	+
14	DM SB 21	+	+	-	+	+	+
15	Dm BDA 24	+	+	-	+	+	+
16	Dm BDA 25a	+	+	-	+	-	+
17	DM BDA 35a	+	+	-	+	+	+
18	Dm BDA 41b	+	+	-	+	+	+
19	Dm BDA 42b	+	+	-	+	+	+
20	Dm BDA 43	+	+	-	+	+	+
21	Dm BDA 53	+	+	-	-	-	+

+ presença de manchas, - ausência de manchas

Figura 19 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada das partições com acetato de etila dos líquidos metabólicos dos 21 fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.



A: UV 254 nm, B: UV 365 nm, C: Dragendorff, D: sulfato cérico, E: cloreto férrico, F: iodo. Sistema de Eluição DCM/Acetona 8:2.

Do total de 105 extratos fúngicos obtidos nesse estudo, as análises de cromatografia em camada delgada comparativa revelaram indícios de substâncias com duplas ligações em todos eles, exceto um extrato. Todos possuem indicativos de substâncias com duplas ligações conjugadas, cinco foram positivos para a presença de alcaloides, cinco não apresentaram indícios de terpenos e sessenta foram positivos para a presença de substâncias fenólicas.

Portanto, apesar de somente quatro fungos terem indícios da presença de alcaloides, ressalta-se que os demais fungos isolados nesse trabalho possuem um metabolismo variado e podem ser utilizados em pesquisas posteriores para o isolamento de outras substâncias de interesse da química de produtos naturais.

5.3.2. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos dos fungos que apresentaram indícios de alcaloides na CCDC estão mostrados nas Figuras 20 à 24.

O espectro do extrato mDCM do fungo Dm SB43 apresentou sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos, hidrogênios metínicos e metilênicos ligados a carbono com duplas ligações, hidrogênios de carbonos carbinólicos, de hidrogênios ligados a carbonos de duplas ligações isoladas e conjugadas. Além desses sinais observa-se no espectro de RMN de ^1H do extrato rDCM do fungo Dm BDA 13 um sinal (9,69 ppm) que pode indicar a presença de aldeído e a ausência de sinais de hidrogênios metínicos e metilênicos ligados a carbono com duplas ligações (Figuras 20, 21 e 22). O espectro do extrato rDCM do fungo Dm SB43 é semelhante ao do extrato mDCM do mesmo fungo, exceto pelo sinais característicos de hidrogênios metilênicos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

Os espectros do extrato mDCM do fungo Dm BDA 41b apresentou sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos de alcanos alifáticos, hidrogênios característicos de triglicerídeos e de carbono de dupla ligação isolada (Figura 23). O espectro do extrato rDCM Dm BDA 21 apresentou sinais

característicos de hidrogênios metílicos e de alcanos olefínicos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

Os espectros dos demais fungos apresentaram uma grande variedade de sinais e seus extratos podem ser selecionados para estudos posteriores para a obtenção de outras classes de substâncias (Figuras 67 a 73 em Anexos).

Figura 20 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato diclorometânico do micélio do fungo endófito Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

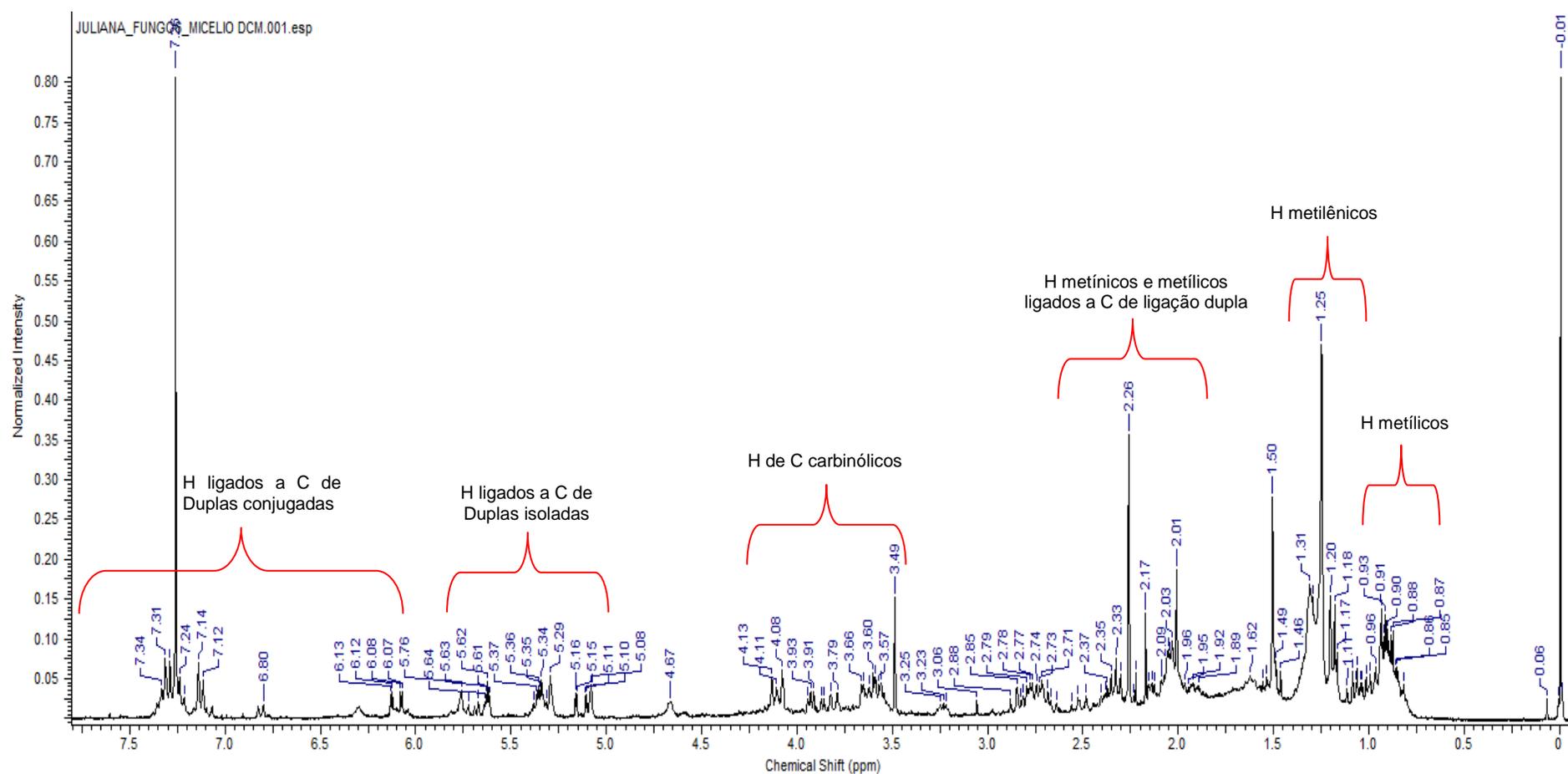


Figura 21 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO) da fase diclorometânica do líquido metabólico do fungo endófito Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

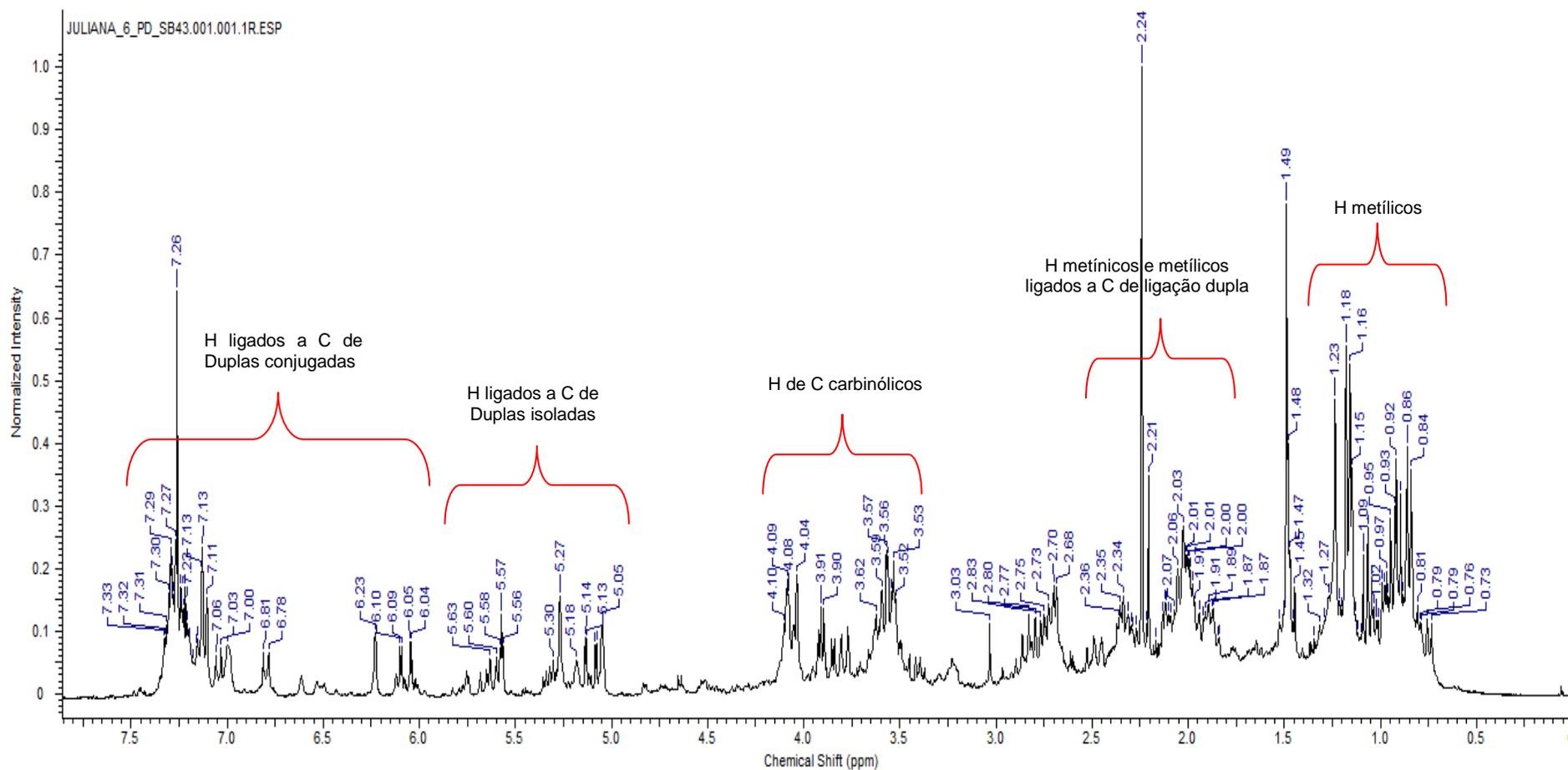


Figura 22 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO) da fase diclorometânica do caldo metabólico do fungo endófito Dm BDA 13 de *Duroia macrophylla*.

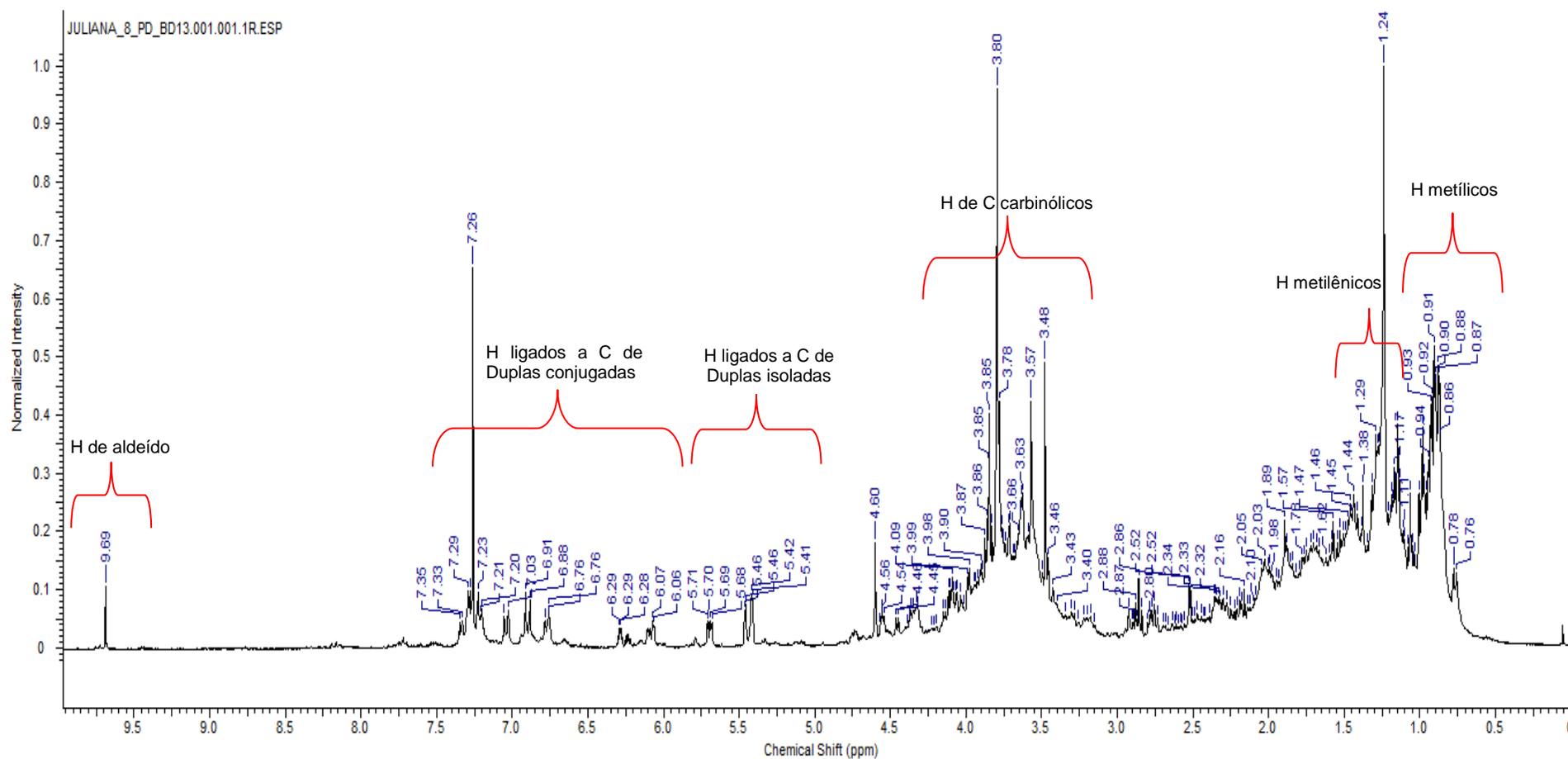


Figura 23 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato diclorometânico do micélio do fungo endofítico Dm BDA 41b de *Duroia macrophylla*.

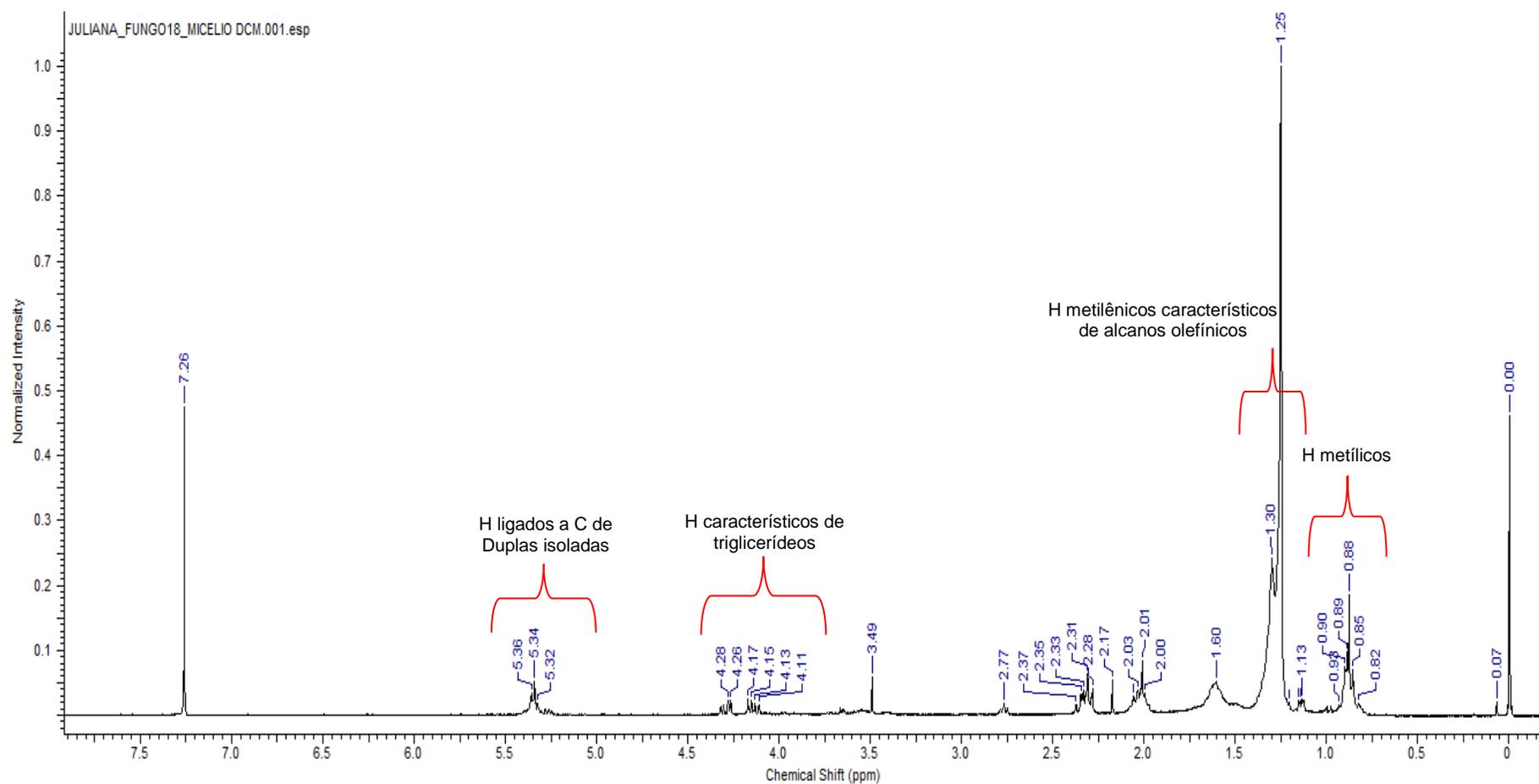
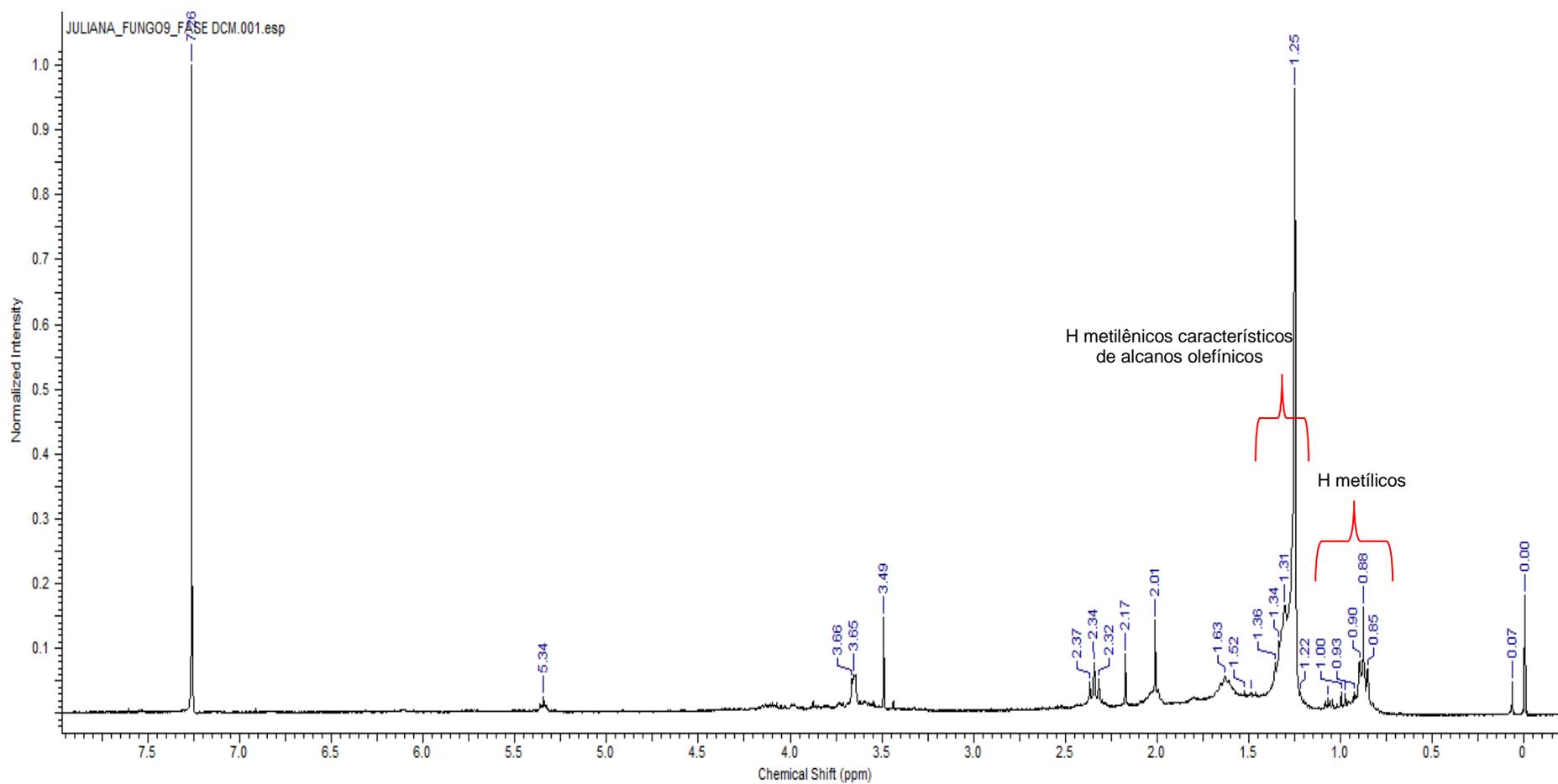


Figura 24 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fase diclorometânica do caldo metabólico do fungo endófito Dm BDA 21 de *Duroia macrophylla*.



5.4. Parte 1: Atividades Química e Biológica

5.4.1. Ensaio de Toxicidade Frente à *Artemia salina* Leach

No teste de toxicidade contra *A. salina* os extratos que apresentaram CL_{50} abaixo de 1.000 $\mu\text{g/mL}$ foram os provenientes da partição fase-acetato de etila (F_{AcOEt}) dos líquidos metabólicos dos fungos Dm SB 43 e Dm BDA 12c. Com CL_{50} de 109,5 e 605,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, eles foram classificados com atividade moderada (Tabela 15).

Tabela 15 - Resultados do ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* das fases de Acetato de Etila do primeiro cultivo submerso dos fungos endofíticos Dm SB 43 e Dm BDA 12c de *Duroia macrophylla*.

Dm SB 43 F_{AcOEt}				Dm BDA 12c F_{AcOEt}			
Extratos $\mu\text{g/mL}$	%	CL_{50}	Intervalo de Confiança 95%	Extratos $\mu\text{g/mL}$	%	CL_{50}	Intervalo de Confiança 95%
500	100			1000	100		
400	100			700	83	605,5	567,8 – 645,2
300	97	109,5	91,9 – 128,0	500	10	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
200	87	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	250	0		
100	33						
50	13						

F_{AcOEt} – fase-acetato de etila.

% - Média do Percentual de Mortos.

CL_{50} – concentração letal para matar 50% das larvas de *Artemia salina*

A atividade tóxica observada neste trabalho soma-se com os dados encontrados na literatura, onde substâncias derivadas de espécies de fungos endofíticos podem se apresentar tóxicas frente a esse microcrustáceo.

O fungo *Aspergillus* sp. isolado de *Bauhinia guianensis* (Fabaceae) da Amazônia brasileira produz as substâncias citocalasina B e H. Essas substâncias apresentaram alta toxicidade contra *A. salina* com CL_{50} de 24,9 e 69,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (FEITOSA et al., 2016).

Fusapofilina A produzida por *Fusarium proliferatum* isolado de *Bruguiera sexangula* (Rhizophoraceae), na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de matar 49,5 % das larvas de *A. salina* (LIU et al., 2013).

Os resultados obtidos nesse teste são importantes para uma pré-avaliação dos extratos fúngicos e monitoramento de suas bioatividades. Após essa triagem, os extratos podem ser encaminhados para uma avaliação mais específica, como os testes de atividade antitumoral (HARADA, 2009; MEYER et al., 1982).

5.4.2. Ensaio Antioxidante

Os extratos metanólicos foram avaliados quanto às suas capacidades de inibir o radical DPPH. A curva padrão de ácido ascórbico construída para este ensaio encontra-se na Figura 25. Os resultados deste teste estão expressos em equivalente em ácido ascórbico (padrão), onde quanto mais próximo de 1 mais ativo (Tabela 16).

Não foi observada nenhuma atividade antioxidante significativa nos extratos fúngicos testados na concentração de 0,5 mg/mL, apesar de os espectros de RMN de ^1H apresentarem sinais na região de hidrogênios aromáticos. Portanto, esses sinais não devem ser de substâncias fenólicas ou esse tipo de substância encontra-se em uma baixa quantidade no extrato.

Figura 25 - Curva padrão de ácido ascórbico do ensaio antioxidante.

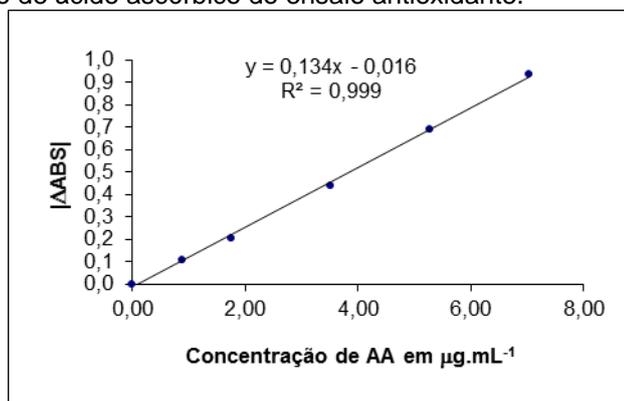


Tabela 16 - Resultado do ensaio antioxidante dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*.

Fungo	Valores Médios		
	$ \Delta\text{ABS}_{517} $	$[\text{AA}]_{\text{eq}}$	Equivalência
Dm SB 11	0,013	0,152	37,766
Dm SB 33	0,006	0,161	31,491
Dm SB 35a	0,008	0,176	30,619
DM SB 41a	0,006	0,166	32,566
Dm SB 41b	0,007	0,169	31,897
Dm SB 43	0,006	0,164	32,002
Dm BDA 12b	0,010	0,193	26,188
Dm BDA 13	0,001	0,129	47,117
Dm BDA 21	0,001	0,047	106,087
Dm BDA31	0,002	0,136	39,352
Dm BDA 12c	0,017	0,246	20,350
Dm BDA 14	0,005	0,082	72,187
Dm SB 15	0,006	0,163	31,889
DM SB 21	-0,020	-0,031	-223,460
Dm BDA 24	-0,017	-0,011	1336,607
Dm BDA 25a	0,001	0,047	111,262
DM BDA 35a	0,004	0,149	34,956
Dm BDA 41b	-0,013	0,019	-169,862
Dm BDA 42b	0,000	0,042	126,202
Dm BDA 43	0,017	0,248	22,548
Dm BDA 53	0,004	0,077	75,614

$|\Delta\text{ABS}| = \text{ABS}_{\text{controle(média)}} - \text{ABS}_{\text{medida}}$

$[\text{AA}]_{\text{eq}} = (|\Delta\text{ABS}| - a)/b$, a= coeficiente linear da curva de ácido ascórbico, b= coeficiente angular da curva de ác. ascórbico.

Equivalência = $[\text{Extrato}] / [\text{AA}]_{\text{eq}}$

Apesar de não terem sido observadas atividades antioxidantes nos extratos fúngicos testados neste trabalho, outras pesquisas com fungos endofíticos de rubiáceas tiveram sucesso ao revelar potencial antioxidante dos seus endófitos. O extrato acetato de etila do fungo *Alternaria* sp. associado a *Mussaenda luteola* (Rubiaceae) demonstrou elevado teor de flavonoides e ação antioxidante (85,2%) na concentração de 300 µg/mL (GUNASEKARAN; SATHIAVELU; ARUNACHALAM, 2017). Nove substâncias fenólicas foram produzidas por *Camarops* sp. (fungo endofítico de *Alibertia macrophylla* - Rubiaceae), dentre elas, seis podem estar envolvidas na atividade antioxidante observada no extrato bruto fúngico (ARAÚJO et al., 2013).

5.4.3. Ensaio Antibacteriano

Os resultados do ensaio de atividade antimicrobiana e os diâmetros dos halos de inibição estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Atividade antibacteriana dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*, com halos de inibição (mm).

Fungos	Micro-organismos							
	SE	ECI	SA	AB	EC	PA	KP	CF
Dm SB 11	10	10	0	0	0	0	10	0
Dm SB 33	0	9	10	11	0	11	0	0
Dm SB 35a	0	9	0	0	0	0	0	11
Dm SB 41a	0	8	0	0	0	0	0	12
Dm SB 41b	0	9	0	10	0	0	10	0
Dm SB 43	13	0	0	10	0	0	13	0
Dm BDA 12b	11	11	0	0	0	0	0	0
Dm BDA 13	0	9	0	9	0	0	11	0
Dm BDA 21	0	9	0	9	0	0	0	11
DM BDA 31	0	9	0	0	0	0	0	0
Dm BDA 12c	0	9	0	0	0	0	0	0
Dm BDA14	0	9	0	0	0	11	0	11
Dm SB 15	0	8	0	0	0	0	0	0
Dm SB 21	0	0	0	0	0	0	0	0
Dm BDA 24	0	0	0	0	0	0	0	0
Dm BDA 25a	0	9	0	0	0	0	0	0
Dm BDA 35a	0	8	0	0	0	0	0	0
Dm BDA 41b	0	8	0	0	0	0	0	0
Dm BDA 42b	0	9	0	0	0	0	0	0
Dm BDA 43	0	9	0	0	0	0	0	0
Dm BDA 53	0	0	0	0	0	0	0	0

Halos de inibição dos controles positivos (mm): *Staphylococcus epidermidis* (SE) – 45, *Enterobacter cloace* (ECI) – 30, *Staphylococcus aureus* (SA) – 27, *Acinetobacter baumannii* (AB) – 25, *Escherichia coli* (EC) – 27, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) – 20, *Klebsiella pneumoniae* (KP) – 28 e *Citrobacter freundii* (CF) – 35.

Os extratos apresentaram atividade contra pelo menos um micro-organismo teste, exceto os extratos dos fungos Dm SB 21, Dm BDA 24 e Dm BDA 53.

O extrato do fungo Dm SB 33 apresentou o maior espectro de atividade, sendo ativo contra quatro bactérias: *E. cloacae*, *S. aureus*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (9, 10, 11 e 11 mm, respectivamente). Os maiores halos de inibição do ensaio foram observados para o extrato do fungo Dm SB 43 contra *S. epidermidis* e *K. pneumoniae* (13 mm).

Apenas o extrato do fungo Dm SB 33 demonstrou atividade contra *S. aureus* (halo de 10 mm). Não foram observadas atividades contra *E. coli* em nenhum extrato testado.

Observa-se que dentre os 21 fungos testados, 18 apresentaram atividade antibiótica contra pelo menos um micro-organismo. Tal fato reafirma o potencial que esses micro-organismos podem apresentar.

Dentre os 21 fungos isolados nesta pesquisa observa-se um perfil de atividade antimicrobiana diferente entre os endófitos. Tal fato foi também observado por Gunasekaran, Sathiavelu e Arunachalam (2017) onde o fungo *Alternaria* sp. apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*E. coli*: 11,5 mm, *P. aeruginosa*: 10 mm, *B. subtilis*: 9,3 mm e *S. aureus*: 10,7 mm), enquanto *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. endófitos da mesma planta (*Mussaenda luteola* - Rubiaceae) foram ativos apenas contra bactérias Gram-negativas: *E. coli* (10 e 8,9 mm) e *P. aeruginosa* (9,2 e 8,6 mm).

A família Rubiaceae está entre as famílias mais representativas com endófitos que possuem atividades antibacteriana, antifúngica e antiparasita (MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA; SÁNCHEZ, 2017). Corroborando com esta pesquisa, na literatura existem relatos de endófitos de rubiáceas que também apresentam atividade antimicrobiana:

Na pesquisa com endófitos de *Coffea arabica* (Rubiaceae) foram isolados 22 fungos endofíticos, destes, 18 apresentaram atividade contra *S. aureus*, 13 contra *E. coli* e oito contra *C. albicans* (FERNANDES et al., 2009).

Souza e colaboradores (2004) investigaram as atividades antimicrobianas de endófitos de *Pausicorea longiflora* (Rubiaceae). Dois

isolados de *Aspergillus niger* e uma espécie não identificada foram ativos contra *E. coli* (halos de inibição: 13, 19 e 12 mm). Onze isolados, dentre eles, *A. niger* e *Colletotrichum* sp., apresentaram atividade contra *S. aureus* (halos de inibição de 10 a 21 mm). Atividades contra *B. subtilis* foram observadas em nove endófitos (*A. niger*, *Colletotrichum* sp. e espécies não identificadas) que apresentaram halos de inibição de 10 até 36 mm. Foi observada atividade antimicrobiana contra *Bacillus* sp. em treze endófitos (*A. niger*, *Colletotrichum* sp., *Xylaria* sp. e espécies não identificadas) com halos de inibição entre 10 e 25 mm. Nenhum dos isolados foi ativo contra *A. flavus*.

Portanto, considerando que o surgimento de micro-organismos resistentes aos antibióticos impulsiona o aumento das pesquisas que desenvolvam novas alternativas a esses medicamentos, reafirma-se que os endófitos apresentam-se como uma alternativa, por serem potenciais produtores de substâncias antimicrobianas (MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA; SÁNCHEZ, 2017).

5.5. Parte 2: Obtenção dos extratos para o fracionamento cromatográfico

De acordo com as análises químicas e biológicas o fungo Dm SB 43 foi selecionado para um segundo cultivo submerso para obtenção de maiores quantidades de extratos. As massas dos extratos decorrentes desse segundo cultivo estão descritas na tabela Tabela 18.

Tabela 18 - Massas dos extratos do fungo endófito SB 43 de *Duroia macrophylla*.

Extratos do fungo Dm SB 43 (mg)				
_m DCM	_m AcOEt	_m MEOH	_f DCM	_f AcOEt
525,7	191,7	4.752,7	493,0	1.107,2

_mDCM – extrato micélio-Diclorometano, _mAcOEt – extrato micélio-acetato de etila, _mMeOH – extrato micélio-metanol, _fDCM – fase-diclorometano, _fAcOEt – fase-acetato de etila.

5.6. Parte 2: Prospecção Química dos Extratos

A prospecção química dos extratos do fungo endofítico Dm SB 43 revelou indícios de substâncias com duplas ligações, substâncias fenólicas, alcaloides, terpenos, açúcares e graxas.

5.6.1. Análise Cromatográfica dos Extratos

Os extratos resultantes do segundo cultivo submerso do fungo Dm SB 43 foram submetidos à CCDC com os seguintes sistemas: $MDCM$ – AcOEt/MeOH 8:2, $MAcOEt$ – DCM/MeOH 9:1, $MMeOH$ – AcOEt/MeOH/H₂O 100:13:17, $FDCM$ – DCM/MeOH 8:2 e $FAcOEt$ – DCM/MeOH 7:3, e seus resultados podem ser observados na Tabela 19 e Figura 26.

Os extratos $MDCM$, $MAcOEt$ e $FDCM$ apresentaram indícios da presença de alcaloides (manchas alaranjadas quando revelados por Dragendorff) na CCDC.

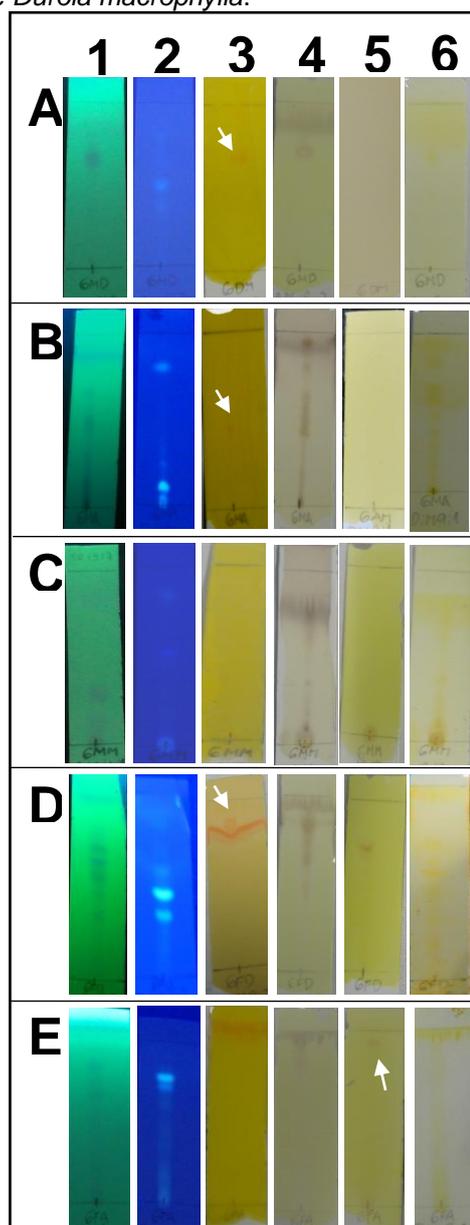
Tabela 19 - Resultados da análise de classes químicas, em placas cromatográficas, dos extratos do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

Extrato	Reveladores					
	UV 254 nm	UV 365 nm	Dragendorff	Ce(SO ₄) ₂	FeCl ₃	Iodo
$MDCM$	+	+	+	+	-	+
$MAcOEt$	+	+	+	+	-	+
$MMeOH$	+	+	-	+	-	+
$FDCM$	+	+	+	+	+	+
$FAcOEt$	+	+	-	+	+	+

+ presença de manchas, - ausência de manchas

$MDCM$ – extrato micélio-diclorometano, $MAcOEt$ – extrato micélio-acetato de etila, $MMeOH$ – extrato micélio-metanol, $FDCM$ – fase-diclorometano, $FAcOEt$ – fase-acetato de etila.

Figura 26 - Fotos das placas de cromatografia em camada delgada dos extratos do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.



1:UV 254 nm, 2: UV 365 nm, 3: Dragendorff, 4: sulfato cérico, 5: cloreto férrico, 6: iodo.

A: $_m$ DCM – extrato micélio-Diclorometano, B: $_m$ AcOEt – extrato micélio-acetato de etila, C: $_m$ MeOH– extrato micélio-metanol, D: $_f$ DCM – fase-diclorometano, E: $_f$ AcOEt – fase-acetato de etila.

Sistemas: $_m$ DCM – AcOEt/MeOH 8:2, $_m$ AcOEt – DCM/MeOH 9:1, $_m$ MeOH – AcOEt/MeOH/H₂O 100:13:17, $_f$ DCM – DCM/MeOH 8:2 e $_f$ AcOEt – DCM/MeOH 7:3.

Como observado na cromatografia em camada delgada, o fungo Dm SB 43 foi capaz de produzir uma variedade de metabólitos diferentes, o que corrobora com o descrito na literatura para o gênero ao qual ele pertence.

O gênero *Xylaria* possui a capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários com diferentes esqueletos de carbonos como: sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos glicosilados, esteroides, compostos

contendo nitrogênio, substâncias aromáticas, derivados de pirona e policetídeos. Contudo, os principais tipos são os sesquiterpenos e as substâncias nitrogenadas (SONG et al., 2014).

5.6.2. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos do fungo Dm SB 43 provenientes do segundo cultivo submerso estão apresentados nas Figuras 27 a 31.

O espectro do extrato $_{\text{mDCM}}$ apresenta sinais característicos de hidrogênios metílicos, metínicos, de hidrogênios de carbonos carbinólicos e de hidrogênios ligados a carbonos de duplas ligações isoladas e conjugadas (Figura 27). Além desses sinais, no espectro do extrato $_{\text{mAcOEt}}$ encontram-se os sinais característicos de hidrogênios de triglicerídeos e de hidrogênios metilênicos de cadeia alifática (Figura 28) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

No espectro do extrato $_{\text{mMeOH}}$ são observados sinais característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos, de hidrogênios de carbonos carbinólicos e de hidrogênios ligados a carbonos de duplas ligações isoladas e conjugadas (Figura 29) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

Na Figura 32 observa-se que os extratos apresentam semelhança de sinais em algumas regiões como pode ser visualizado, por exemplo, entre os extratos micélio-DCM e micélio-AcOEt. A fase-DCM também é similar a estes, entretanto uma maior quantidade de sinais pode ser observada. Os espectros dos extratos micélio-MeOH, fase-DCM e fase-AcOEt demonstraram uma maior quantidade de sinais na região de H aromáticos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2012).

Figura 27 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato diclorometânico do micélio proveniente do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

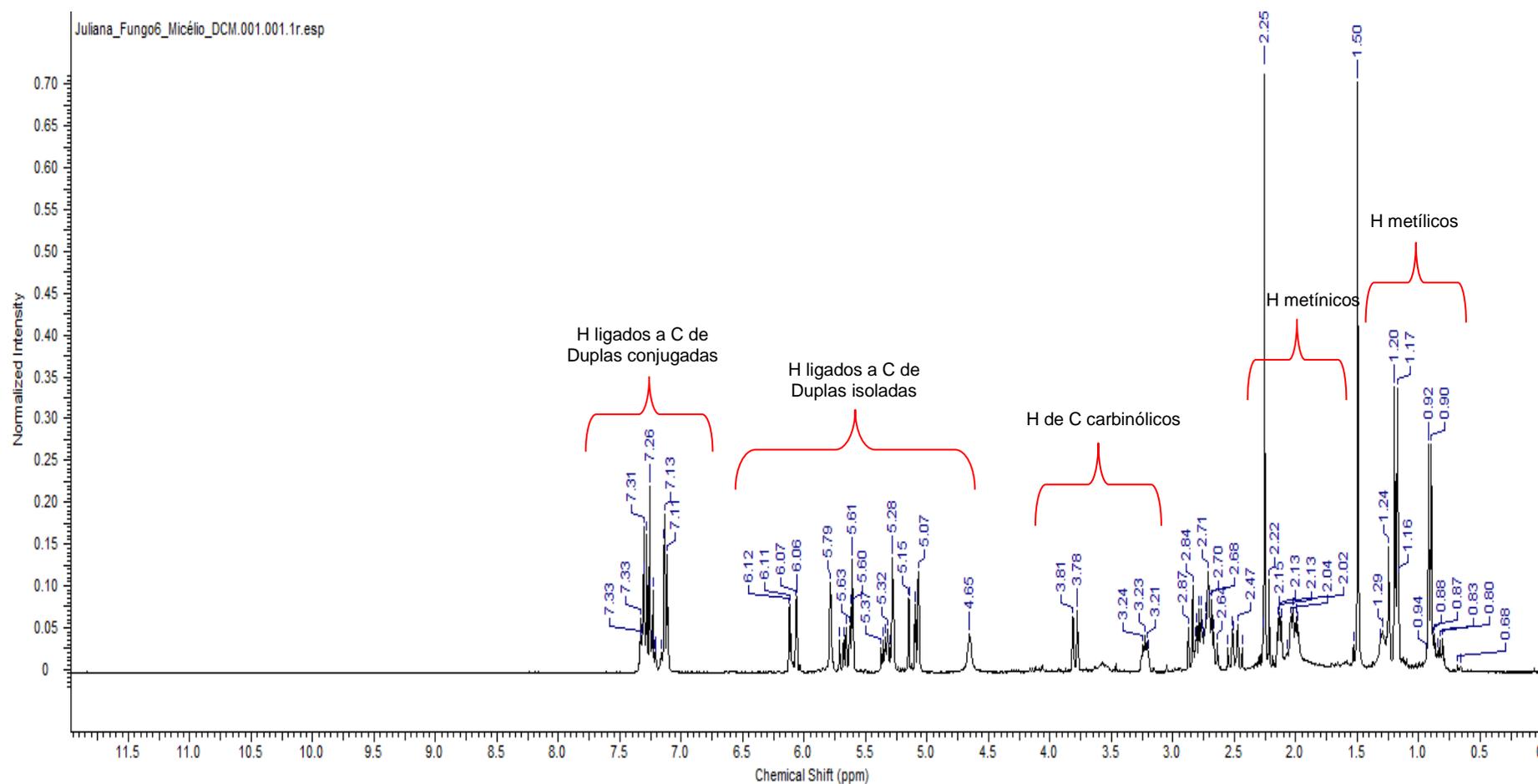


Figura 28 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do extrato de acetato de etila do micélio proveniente do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

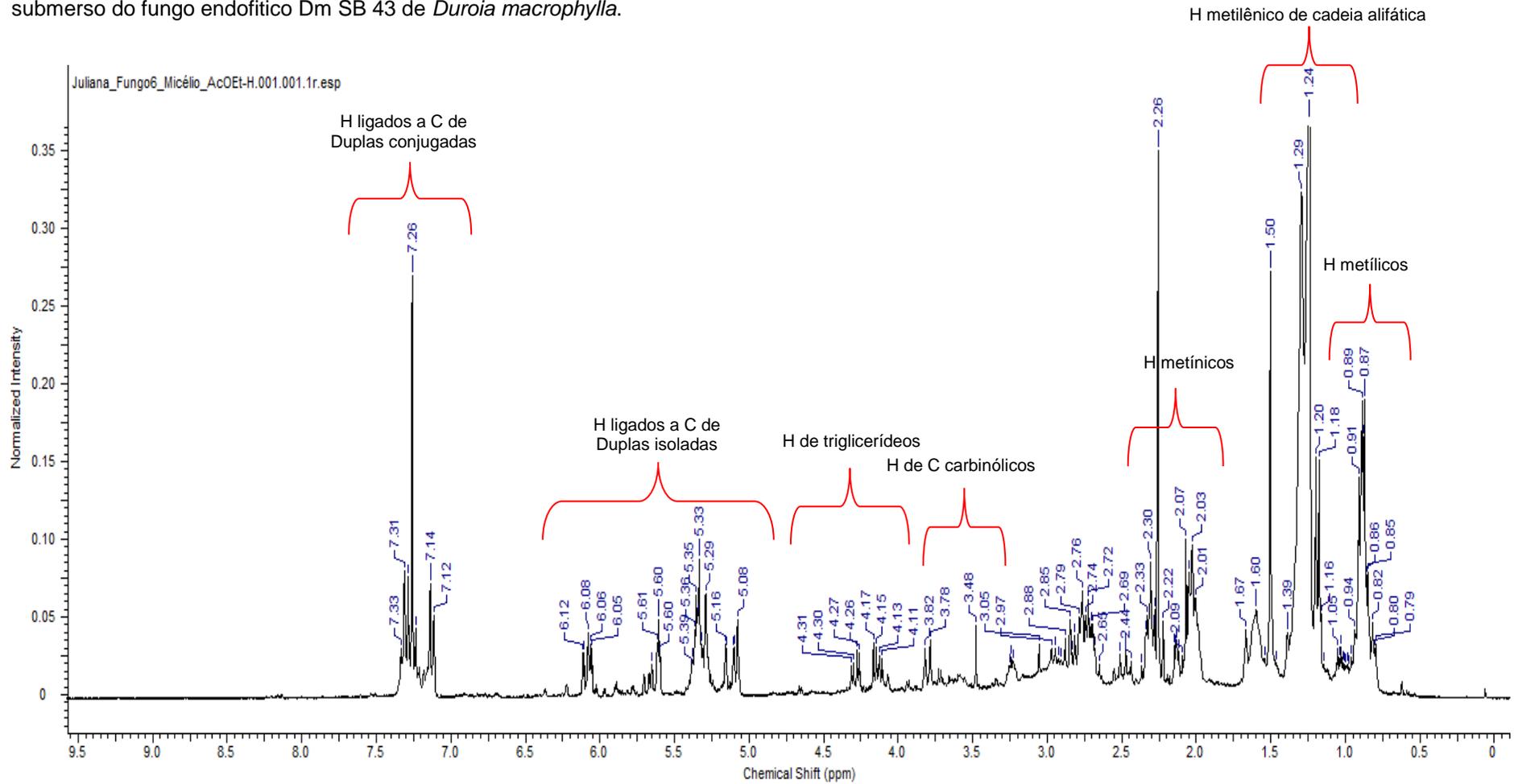


Figura 29 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO) do extrato metanólico do micélio proveniente do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

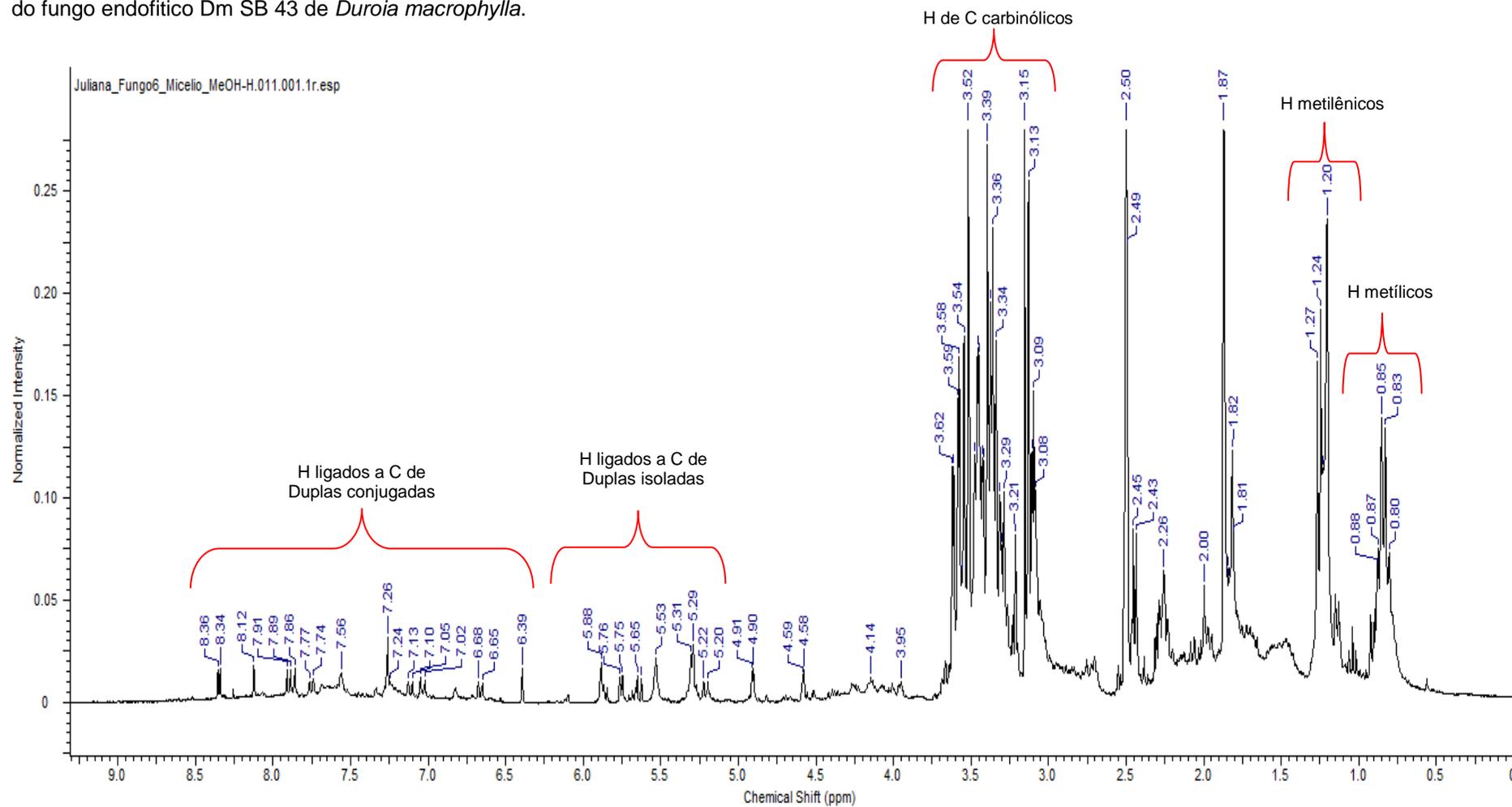


Figura 30 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da fase diclorometânica do líquido metabólico proveniente do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

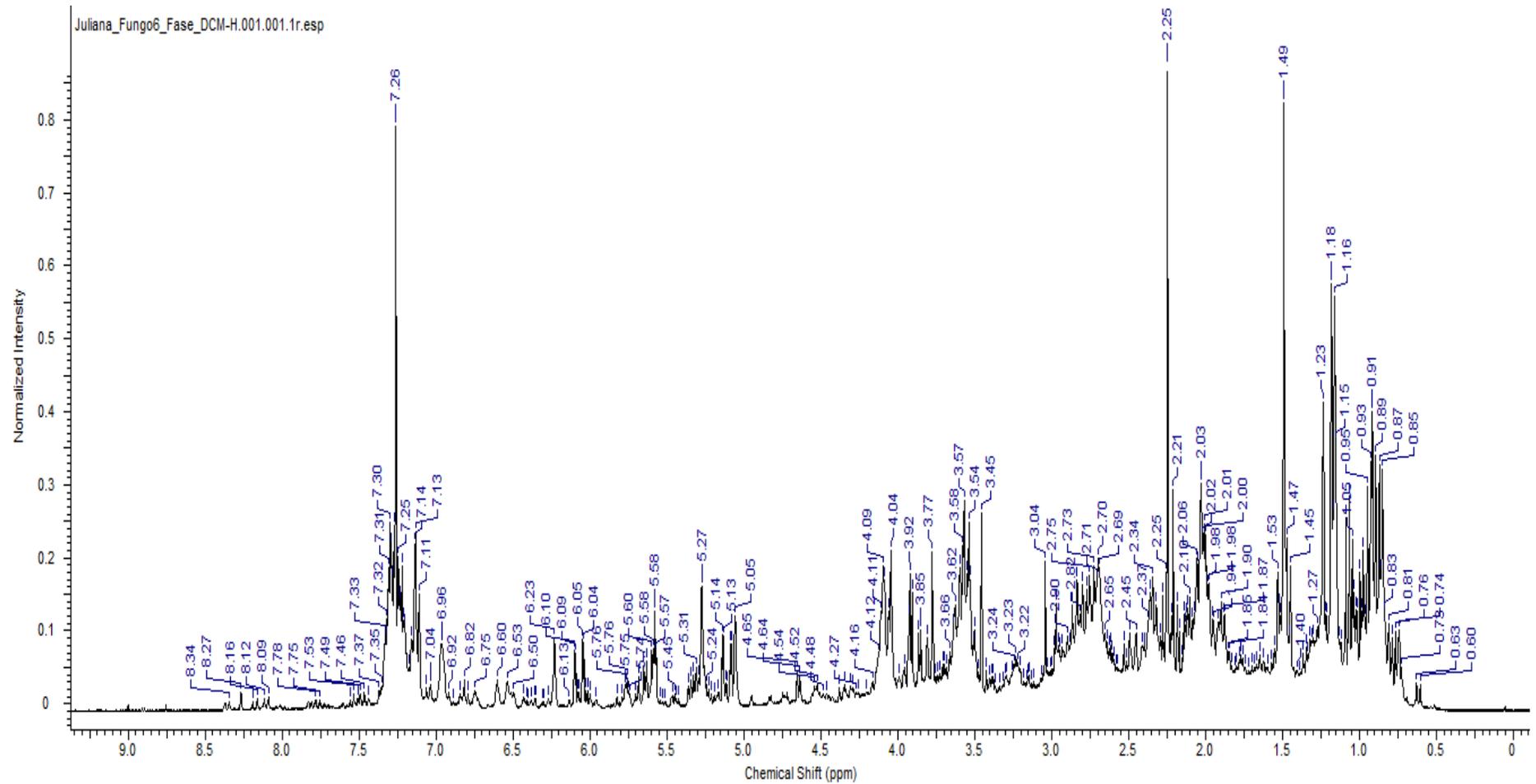


Figura 31 - Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz, DMSO) da fase de acetato de etila do líquido metabólico proveniente do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

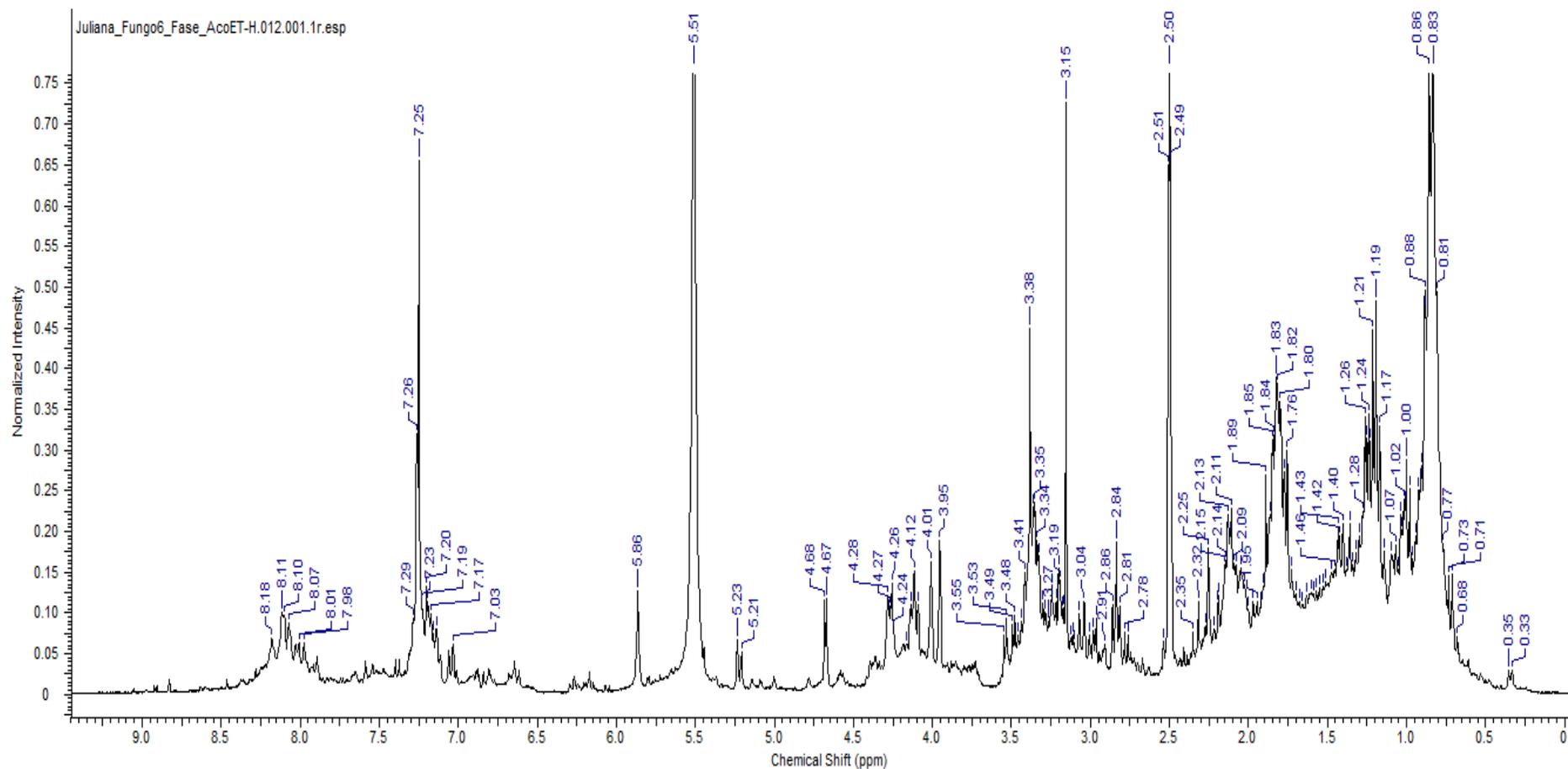
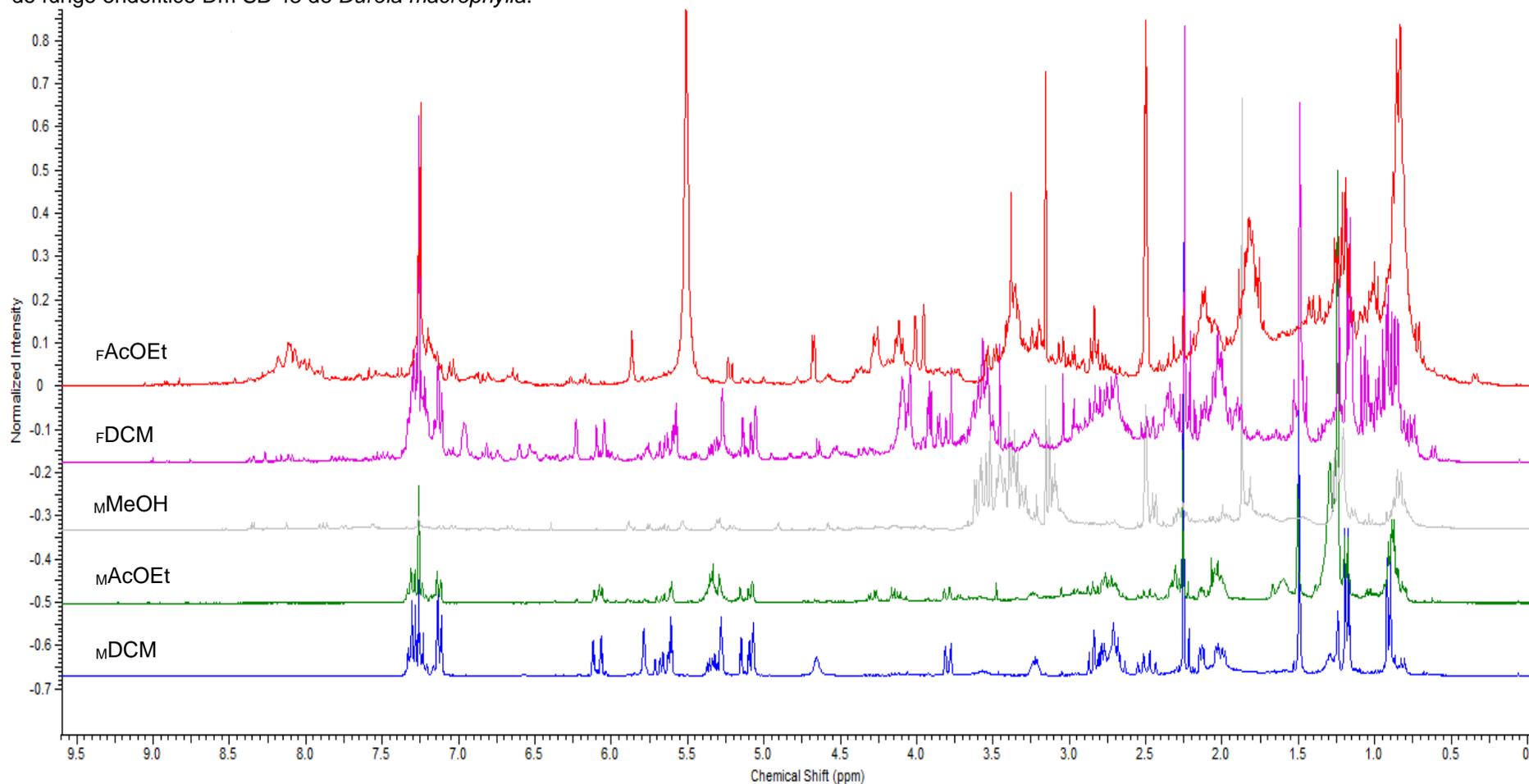


Figura 32 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) dos extratos e líquidos metabólicos do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.



CDCl_3 : MDCM , MAcOEt , FDCM ; DMSO : MMeOH e FAcOEt .

MDCM – extrato micélio-Diclorometano, MAcOEt – extrato micélio-acetato de etila, MMeOH – extrato micélio-metanol, FDCM – fase-diclorometano, FAcOEt – fase-acetato de etila.

5.7. Identificação Fúngica

O fungo selecionado para o prosseguimento desta pesquisa foi o Dm SB 43. Trata-se de um fungo filamentososo de micélio aéreo curto, pulverulento, branco com manchas escuras, conídios acinzentados e verso rugoso (Figura 33).

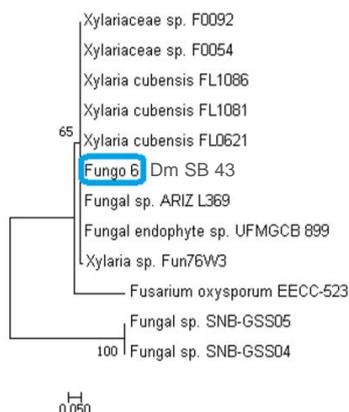
Figura 33 - Características macroscópicas do fungo endofítico SB 43 isolado de *Duroia macrophylla*.



Para a identificação molecular do fungo Dm SB 43 a sequência de DNA obtida foi analisada na plataforma do GenBank. Os resultados revelaram que a amostra com a identidade mais próxima (Ident e Query Cover 99%) é de um fungo endofítico de código UFMGCB_899 (número de acesso: FJ466726.1). Infelizmente não existem relatos na literatura sobre a identificação desta amostra.

Com base na análise de distância da árvore filogenética, entre o fungo SB 43 e as sequências similares obtidas no GenBank, o fungo SB 43 foi identificado como: *Xylaria* sp. (Figura 34).

Figura 34 - Árvore de distância filogenética a partir do gene 18S rRNA. Construída com o auxílio do software MEGA 7.0 pelo método de Neighbor-Joining com parâmetro Kimura-2, e Bootstrap de 1000 réplicas.



A presente pesquisa é a primeira a relatar o fungo *Xylaria* sp. em uma espécie do gênero *Duroia*. Entretanto, dentro da família Rubiaceae são encontrados registros de isolamento de fungos do gênero *Xylaria* em: *Mussaenda luteola*, *Ixora coccinea*, *Palicourea longiflora*, *Palicourea marcgravii*, *Morinda citrifolia* e *Coffea arabica* (CAFÊU et al., 2005; FERNANDES et al., 2009; GUNASEKARAN; SATHIAVELU; ARUNACHALAM, 2017; SOUZA et al., 2004; VIEIRA et al., 2012; WU et al., 2015).

O gênero *Xylaria* pertence à família Xylariaceae, uma das mais representativas do filo Ascomycota. Esses fungos habitam principalmente os trópicos e geralmente são encontrados como saprófitos, participando da decomposição da madeira, e como endófitos. Várias atividades biológicas são relatadas a partir de substâncias produzidas por este gênero: antimicrobiana, anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória e antiviral (ORACHAIPUNLAP et al., 2016).

Conforme a variedade de substâncias produzidas por *Xylaria* sp., há uma ampla diversidade de atividades biológicas que essas substâncias podem apresentar desde atividades antimicrobianas, antimaláricas até citotóxicas para células tumorais (SONG et al., 2014). Pesquisas com fungos do gênero *Xylaria* também têm parte nessas descobertas, como o descrito por Cafêu e colaboradores (2005) que isolaram cinco substâncias de *Xylaria* sp. endofítico de *Palicourea marcgravii*: ácido 2-hexilideno-3-metilbutanodióico, citocalasina D, 7-declorogriseofulvina, citocalasina B e griseofulvina. Eles observaram que as duas primeiras substâncias apresentaram atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* comumente conhecidos como fitopatógenos.

A pesquisa desenvolvida por Orachaipunlap e colaboradores (2016) em quatro espécies botânicas (*Cinnamomum iners*, *Shorea siamensis*, *Fernandoa adenophylla*, *Quercus semiserrata*) resultou no isolamento de 125 fungos endofíticos, dentre esses o gênero *Xylaria* encontrado em um número muito significativo: 64 fungos. Três fungos desse gênero apresentaram atividades biológicas relevantes: uma cepa (*Xylaria* sp. 1) possui um amplo espectro antimicrobiano sendo ativo contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, e *C. albicans*, e citotoxicidade contra células Jurkat – linfócitos T (IC₅₀ 2,94

µg/mL). Outro fungo (*Xylaria* sp. 9) inibiu fortemente todas as bactérias testadas (*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*) e o fungo *Xylaria* sp. 2 apresentou citotoxicidade contra a linhagem celular HEK293 (IC₅₀ 2,94 µg/mL).

O fungo UFMG CB_899 que apresentou a identidade mais próxima ao fungo deste trabalho foi isolado de folhas de *Trixis vauthieri* DC. (Asteraceae) em Minas Gerais (ROSA et al., 2010). Para o isolamento dele foi utilizado o meio BDA e para o cultivo submerso o meio MEC (2% extrato de malte, 0,1% de peptona e 1,5% de glicose) sob agitação de 150 rpm, a 28 °C por nove dias. Os metabólitos presentes no caldo fermentado foram extraídos com acetato de etila e submetidos aos testes biológicos na concentração de 20 µg/mL. Os extratos desse fungo apresentaram inibição de 43, 66 e 84% na viabilidade celular das células tumorais UACC-62 (melanoma), MCF-7 (câncer de mama) e TK-10 (câncer de rim), respectivamente, além de baixa atividade contra *T. cruzi* (17% de inibição da enzima recombinante tripanotona redutase) e *L. amazonensis* (14% de letalidade). Observa-se portanto, a similaridade entre esses dois fungos, mesmo sendo isolados de hospedeiros diferentes e em biomas diferentes, situação que pode ocorrer em micro-organismos endofíticos (SCHULZ; BOYLE, 2005).

5.8. Parte 2: Atividade Biológica

5.8.1. Ensaio de Toxicidade Frente à *Artemia salina* Leach

Todos os extratos resultantes do segundo cultivo submerso do fungo Dm SB 43 apresentaram CL₅₀ abaixo de 1.000 µg/mL (Tabela 20). Os extratos micélio-DCM, fase-acetato de etila e micélio-acetato de etila foram considerados fortemente ativos e o extrato micélio metanol apresentou-se moderadamente ativo.

Em todas as concentrações testadas os extratos micélio-DCM e fase-DCM foram classificados como muito ativos, pois mataram todas as larvas de *A. salina* em todos os poços, o que impossibilitou a determinação precisa da CL₅₀ (ANDERSON et al., 1991).

Tabela 20 - Resultados do Teste de toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos do segundo cultivo submerso do fungo Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

Extratos ($\mu\text{g/mL}$)	Média do Percentual de Mortos						CL_{50}	Intervalo de Confiança 95%
	500	400	300	200	100	50		
$_{\text{M}}\text{DCM}$	100	100	100	100	100	100	< 50 $\mu\text{g/mL}$	-
$_{\text{M}}\text{AcOEt}$	100	100	100	100	93	57	46,2 $\mu\text{g/mL}$	29,9 – 56,2 $\mu\text{g/mL}$
$_{\text{M}}\text{MeOH}$	63	43	30	10	3	0	426,6 $\mu\text{g/mL}$	362,5 – 546,4 $\mu\text{g/mL}$
$_{\text{F}}\text{DCM}$	100	100	100	100	100	77	< 50 $\mu\text{g/mL}$	-
$_{\text{F}}\text{AcOEt}$	97	83	77	37	20	0	203,8 $\mu\text{g/mL}$	155,4 – 255,4 $\mu\text{g/mL}$

$_{\text{M}}\text{DCM}$ – extrato micélio-diclorometano, $_{\text{M}}\text{AcOEt}$ – extrato micélio-acetato de etila, $_{\text{M}}\text{MeOH}$ – extrato micélio-metanol, $_{\text{F}}\text{DCM}$ – fase-diclorometano, $_{\text{F}}\text{AcOEt}$ – fase-acetato de etila. CL_{50} – concentração letal necessária para matar 50% das larvas de *Artemia salina*.

Apesar dos extratos provenientes do cultivo submerso de *Xylaria* sp. obtidos neste estudo terem sido classificados como muito ativos ou moderadamente ativos no teste de toxicidade frente a *Artemia salina*, sabe-se que esta metodologia é empregada como uma triagem de extratos bioativos (HARADA, 2009; MEYER et al., 1982). Por isso, é necessário dar prosseguimento na busca de específicas atividades biológicas, como o ensaio antitumoral, realizado nesta pesquisa e apresentado e discutido no final do trabalho (item 5.11.3).

5.8.2. Ensaio Antioxidante

Os extratos e líquidos metabólicos do fungo Dm SB 43 provenientes do segundo cultivo submerso na concentração de 0,5 mg/mL não apresentaram atividade antioxidante significativa ao serem avaliados no ensaio com DPPH (Tabela 21).

Tabela 21 - Resultado do ensaio antioxidante dos extratos provenientes do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*.

Extrato	Valores Médios		
	$ \Delta\text{ABS}_{517} $	$[\text{AA}]_{\text{eq}}$	Equivalência (mg extrato/mg ácido ascórbico)
$_{\text{M}}\text{DCM}$	-0,022	-0,044	-148,259
$_{\text{M}}\text{AcOEt}$	0,004	0,074	70,869
$_{\text{M}}\text{MeOH}$	0,004	0,149	35,421
$_{\text{F}}\text{DCM}$	-0,011	0,036	-220,168
$_{\text{F}}\text{AcOEt}$	0,002	0,131	41,961

$_{\text{M}}\text{DCM}$ – extrato micélio-diclorometano, $_{\text{M}}\text{AcOEt}$ – extrato micélio-acetato de etila, $_{\text{M}}\text{MeOH}$ – extrato micélio-metanol, $_{\text{F}}\text{DCM}$ – fase-diclorometano, $_{\text{F}}\text{AcOEt}$ – fase-acetato de etila.

$|\Delta\text{ABS}| = \text{ABS}_{\text{controle(média)}} - \text{ABS}_{\text{medida}}$

$[\text{AA}]_{\text{eq}} = (|\Delta\text{ABS}| - a)/b$, a= coeficiente linear da curva de ácido ascórbico, b= coeficiente angular da curva de ác. ascórbico.

Equivalência = $[\text{Extrato}]/[\text{AA}]_{\text{eq}}$

Apesar dos extratos provenientes da *Xylaria* sp. não terem apresentado atividade antioxidante, algumas pesquisas demonstram que fungos deste gênero podem ter essa atividade. Os polissacarídeos intracelulares do micélio de *Xylaria nigripes* (endófito de *Tectona grandis*, Lamiaceae) apresentam atividade antioxidante com CL_{50} de 1.412, 174,25 e 35,56 $\mu\text{g/mL}$ em três metodologias utilizadas (HUNG et al., 2015). Os extratos metanólicos do fungo *Xylaria* sp. endófito de *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) possuem em sua composição flavonoides e apresentaram atividade antioxidante de até 82,42% na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ (LIU et al., 2007).

A capacidade de produzir substâncias que sequestram radicais livres varia nos diferentes isolados no gênero, por isso é importante haver a pesquisa desta atividade nas diferentes cepas isoladas, de maneira que não seja descartado nenhum fungo com potencial antioxidante antes de ser confirmado pelo teste de toxicidade.

5.8.3. Ensaio Antibacteriano

Os resultados do ensaio de atividade antimicrobiana e os diâmetros dos halos de inibição dos extratos de *Xylaria* sp. (Dm SB 43) provenientes do segundo cultivo submerso estão apresentados na Tabela 22.

Dos cinco extratos testados, apenas o extrato micélio-MeOH e a fase-DCM não apresentaram atividade antibacteriana.

O extrato micélio-acetato de etila apresentou o maior espectro de atividade, sendo ativo contra quatro bactérias: *E. cloacae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. freundii* (8, 8, 8 e 9 mm, respectivamente). O maior halo de inibição do teste (10 mm) foi observado na fase-acetato de etila contra *S. aureus*.

Observou-se atividades contra *E. cloacae* e *C. freundii* apenas em extratos provenientes de micélio onde encontram-se os metabólitos intracelulares. Diferentemente do que ocorreu com as atividades contra *S. epidermidis* e *S. aureus* que foram observadas tanto em extrato quanto na fase, ambos do mesmo solvente de extração (acetato de etila).

Não foram observadas atividades contra *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* em nenhum extrato ou fase provenientes do segundo cultivo submerso. As atividades anteriormente encontradas no extrato micélio-MEOH do primeiro cultivo não foram observadas com o mesmo extrato obtido no segundo cultivo.

Tabela 22 - Atividade antibacteriana dos extratos provenientes do segundo cultivo submerso do fungo endofítico Dm SB 43 de *Duroia macrophylla*, com halos de inibição (mm).

Extrato	Micro-organismos							
	SE	ECI	SA	AB	EC	PA	KP	CF
_m DCM	0	8	0	0	0	0	0	9
_m AcOEt	8	8	8	0	0	0	0	9
_m MeOH	0	0	0	0	0	0	0	0
_f DCM	0	0	0	0	0	0	0	0
_f AcOEt	9	0	10	0	0	0	0	0

_mDCM – extrato micélio-Diclorometano, _mAcOEt – extrato micélio-acetato de etila, _mMeOH – extrato micélio-metanol, _fDCM – fase-diclorometano, _fAcOEt – fase-acetato de etila.

Halos de inibição dos controles positivos (mm): *Staphylococcus epidermidis* - (SE) – 45, *Enterobacter cloacae* (ECI) – 30, *Staphylococcus aureus* (SA) - 27, *Acinetobacter baumannii* (AB) – 25, *Escherichia coli* (EC) – 27, *Pseudomonas aeruginosa* (PA) – 20, *Klebsiella pneumoniae* (KP) – 28 e *Citrobacter freundii* (CF) – 35.

Corroborando com estes resultados, atividades antibacterianas podem ser observadas em outros estudos com extratos de espécies de *Xylaria* sp. O fungo *Xylaria* sp. endófito de *Paulicorea longiflora* (Rubiaceae) apresentou

atividade apenas contra *Bacillus* sp. (halo de inibição: 15 mm), sendo inativo contra: *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *A. flavus* (SOUZA et al., 2004). O ácido elvolico isolado de *Xylaria* sp. endófito de *Anoectochilus setaceus*) teve atividade antibacteriana contra *B. subtilis* e *S. aureus* em baixas concentrações: 2 e 4 µg/mL, respectivamente (RATNAWEERA et al., 2014).

Uma triagem de atividade antimicrobiana de *Xylaria hypoxylon* demonstrou um amplo espectro de ação desta cepa. Ela foi capaz de inibir dezessete bactérias dentre elas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* e *E. coli* (CANLI; AKATA; ALTUNER, 2016). Atividade contra *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *E. coli* também foram registradas em xylarias endófitas de *Croton lechleri* (Euphorbiaceae). Com esses dados observa-se que fungos do gênero *Xylaria* podem apresentar atividades antimicrobianas que podem variar conforme a cepa isolada. Portanto, é importante a realização desse teste com os fungos isolados nas novas pesquisas.

5.9. Fracionamentos dos Extratos e Purificação das Substâncias

O fracionamento dos extratos selecionados resultou no isolamento da substância 1 (48,3 mg), encontrada em todos os extratos fracionados, da substância 2 (1,7 mg), presente no extrato _FDCM e na mistura de dois alcaloides presentes nos extratos _FDCM e _MDCM (3,6 mg).

Observa-se que o extrato _MDCM apresentou uma maior quantidade da substância 1 (25,1 mg). Além disso, ressalta-se que apenas parte desse extrato foi utilizado para o fracionamento, portanto, pode-se inferir que ainda é possível isolar em torno de 148 mg da substância 1 do extrato micélio-DCM armazenado, alcançando um rendimento total de 38,1%.

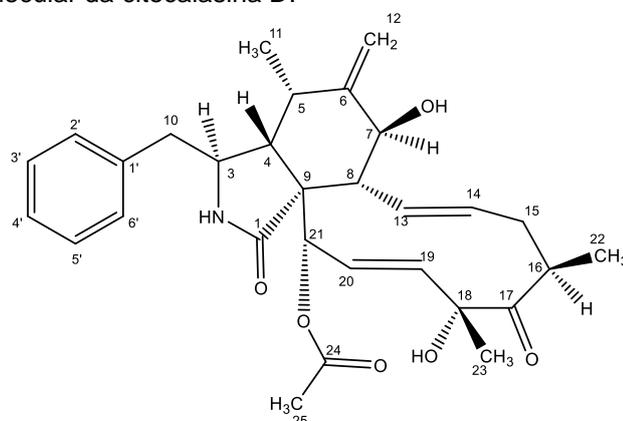
5.10. Identificação das Substâncias Isoladas

Para a identificação das substâncias foi realizada a comparação dos dados espectroscópicos e espectrométricos (RMN ¹H e ¹³C, COSY, HSQC, HMBC e EM) com as informações contidas na literatura.

5.10.1. Substância 1

A substância 1 isolada (48,3 mg), apresentou-se como cristais brancos em formato de agulha e quando analisada por CCDC, ficou alaranjada com o revelador Dragendorff. Após observação dos dados espectroscópicos e espectrométricos e comparação com a literatura, ela foi identificada como citocalasina D (Figura 35) (AMARAL, 2009; CAFÊU et al., 2005; ZANARDI, 2010).

Figura 35 - Estrutura Molecular da citocalasina D.



Na espectrometria de massas de alta resolução (ESI+) (Figura 36) observa-se o pico de m/z 508,2716 u e duas fragmentações na fonte de m/z 490,2610 e 448,2497 u correspondentes à perda de água e de ácido acético (AMARAL et al., 2017). A massa molecular foi calculada em 507,2716 u e associada com as informações dos espectros de RMN (¹³C e ¹H), determinou-se a fórmula molecular: C₃₀H₃₇NO₆.

Figura 36 - Espectro de massas de alta resolução da substância 1.



Os átomos de hidrogênio observados no espectro 1D de RMN de ^1H (Figura 37) foram atribuídos aos carbonos de acordo com o mapa de correlações HSQC (Figura 46). As ampliações do espectro de ^1H e do mapa de correlações HSQC encontram-se nas figuras 38 a 45 e 47, respectivamente.

Os sinais δ_{H} 0,95 (*d*), 1,20 (*d*), 1,51 (*s*), e 2,26 (*s*), que integram para 3 hidrogênios, são referentes aos hidrogênios das metilas dos carbonos C-11, C-22, C-23 e C-25, respectivamente. Além disso, a metila em δ_{H} 2,26 (C-25) é considerada “típica em citocalasina com um grupo acetato na forma de radical” (CAFÊU et al., 2005).

Os sinais δ_{H} 7,13 (H-2' e H-6': *m*, 2H), 7,24 (H-4': *m*, 1H) e 7,31 (H-3' e H-5': *m*, 2H) são de hidrogênios de anel aromático ligados aos carbonos δ_{C} 129,07, 127,09, 128,93, respectivamente.

No espectro de ^1H observam-se sinais de hidrogênios olefínicos δ_{H} 5,69 (H-13; *dd*, $J=16,0$; 10,0 Hz; 1H), 5,35 (H-14; *ddd*, $J=16,0$; 10,5; 5,2 Hz), 5,14 (H-19; *dd*, $J=15,8$; 2,4 Hz; 1H) e 6,11 (H-20; *dd*, $J=15,8$; 2,6 Hz; 1H). As geometrias *trans* das ligações duplas ($\Delta^{13,14}$ e $\Delta^{19,20}$) foram confirmadas pelas constantes de acoplamento iguais (16,0 e 15,8 Hz, respectivamente) dos sinais dos hidrogênios adjacentes. De acordo com o HSQC, os hidrogênios olefínicos estão ligados aos carbonos de deslocamento químico δ_{C} 130,59 (C-13) e 134,13 (C-14) da dupla ligação $\Delta^{13,14}$ e 127,59 (C-19), 132,28 (C-20) da dupla ligação $\Delta^{19,20}$.

Os sinais δ_{H} 2,67 (H-10a: *m*, 1H) e 2,82 (H-10b: *m*, 1H) correspondem aos hidrogênios benzílicos e o singlete com deslocamento químico 5,52 ppm (RMN de ^1H) não apresentou correlações com carbono no mapa de correlações HSQC, portanto está ligado a um heteroátomo.

Figura 38 - Ampliação da região entre 0,95 e 1,51 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).

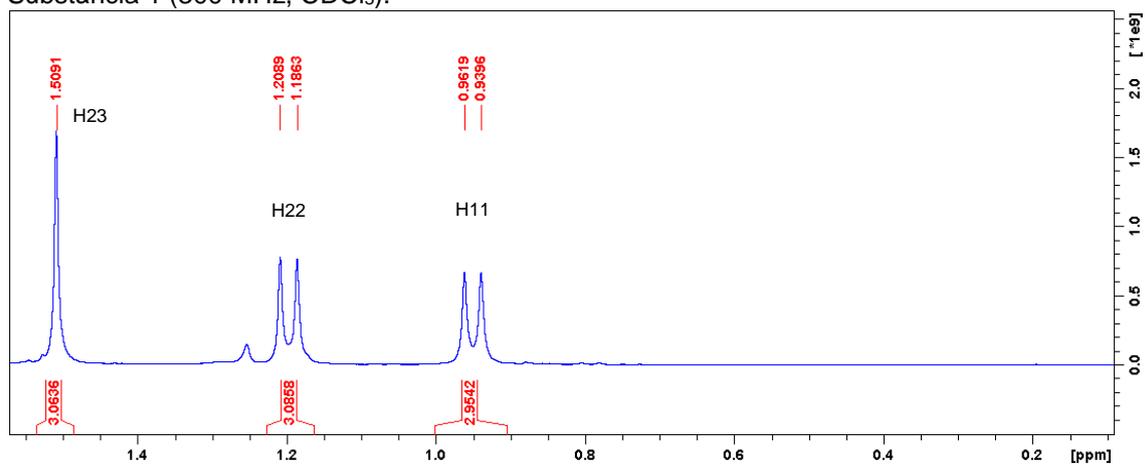


Figura 39 - Ampliação da região entre 2,02 e 2,51 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).

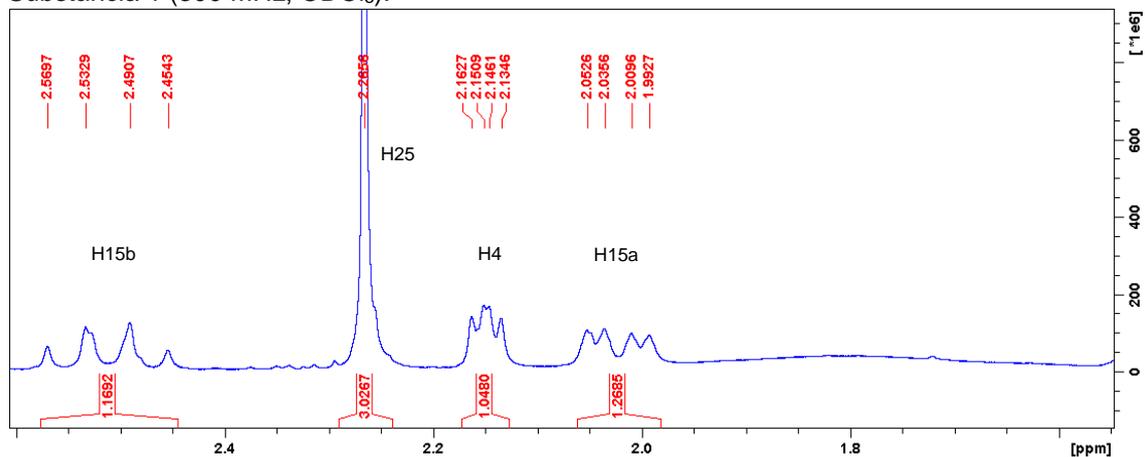


Figura 40 - Ampliação da região entre 2,67 e 2,85 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).

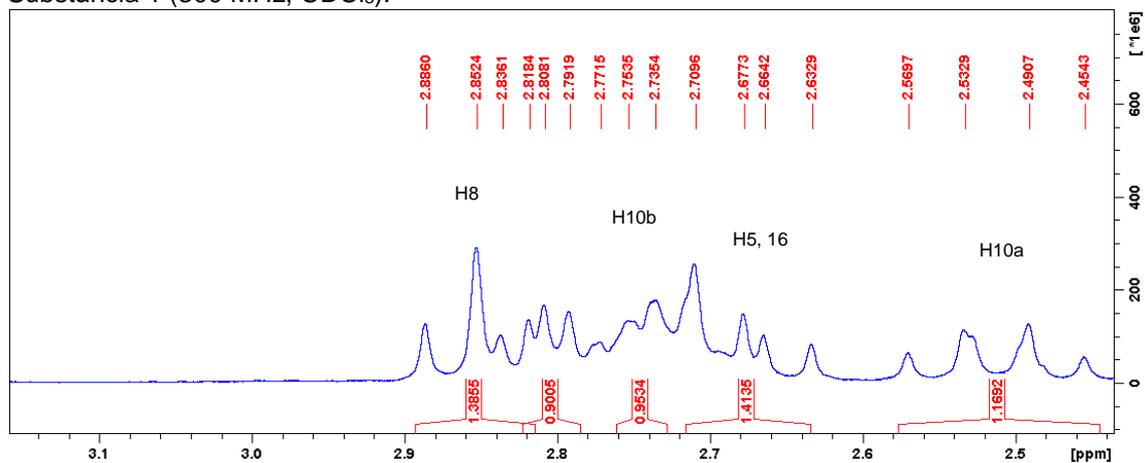


Figura 41 - Ampliação da região entre 3,23 e 3,81 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).

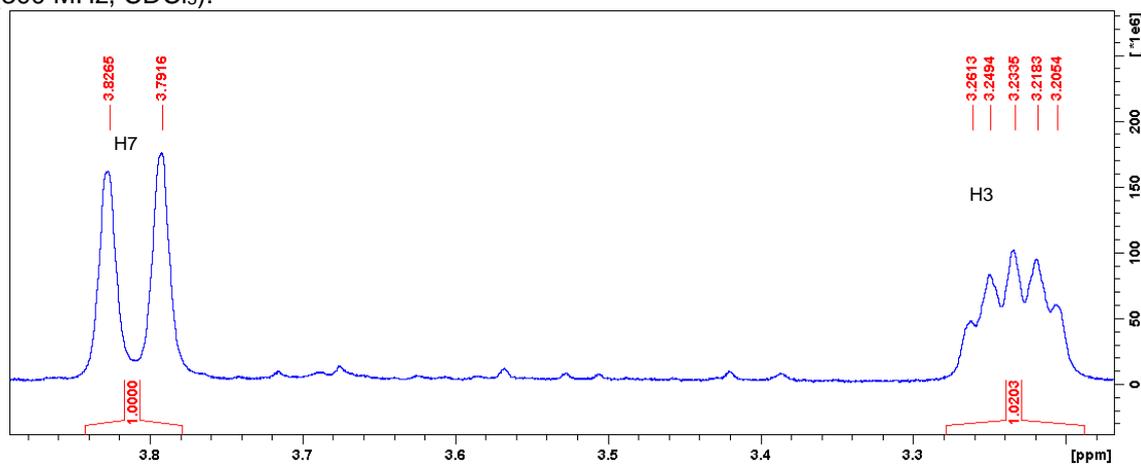


Figura 42 - Ampliação da região entre 5,09 e 5,35 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).

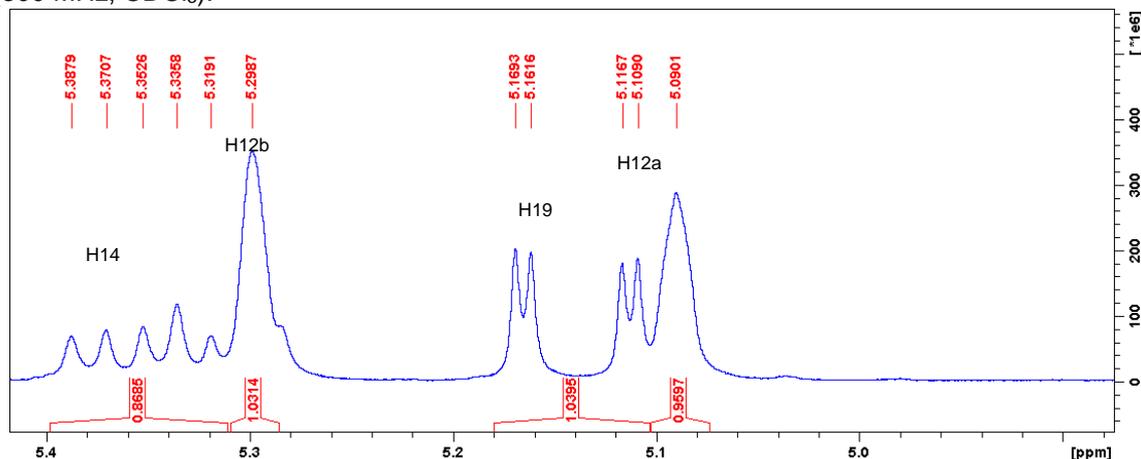


Figura 43 - Ampliação da região entre 5,52 e 5,69 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).

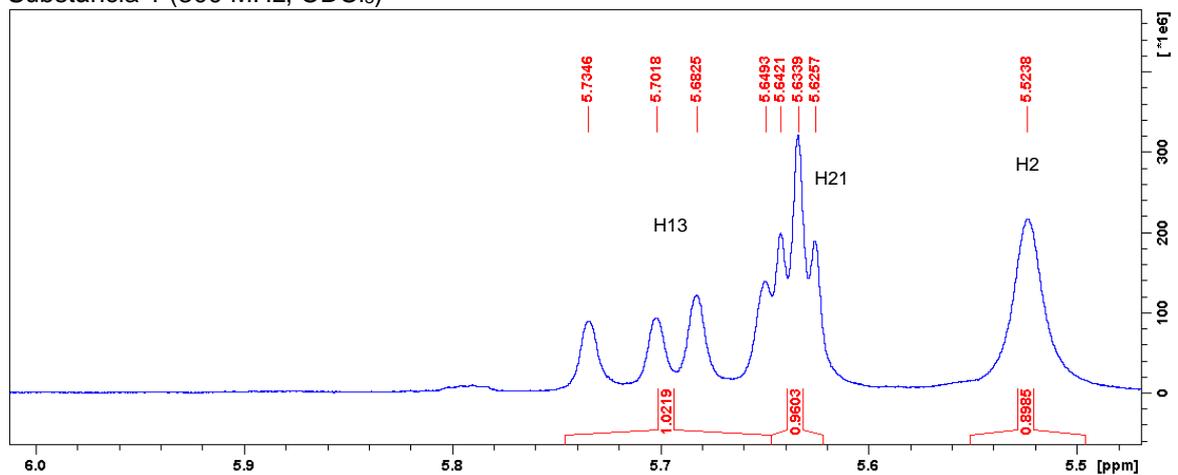


Figura 44 - Ampliação da região entre 6,08 e 6,14 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3)

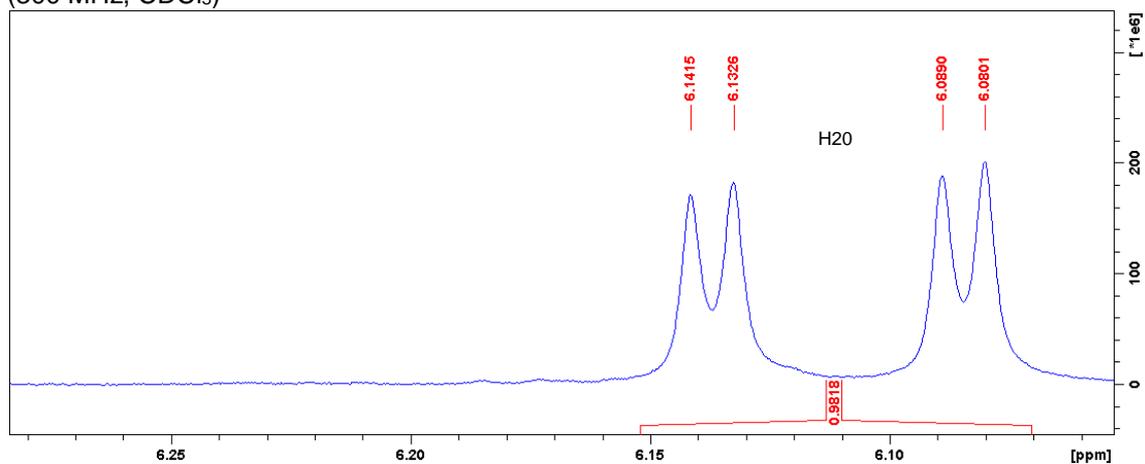


Figura 45 - Ampliação da região entre 7,13 e 7,31 ppm do espectro de RMN de ^1H da Substância 1 (300 MHz, CDCl_3).

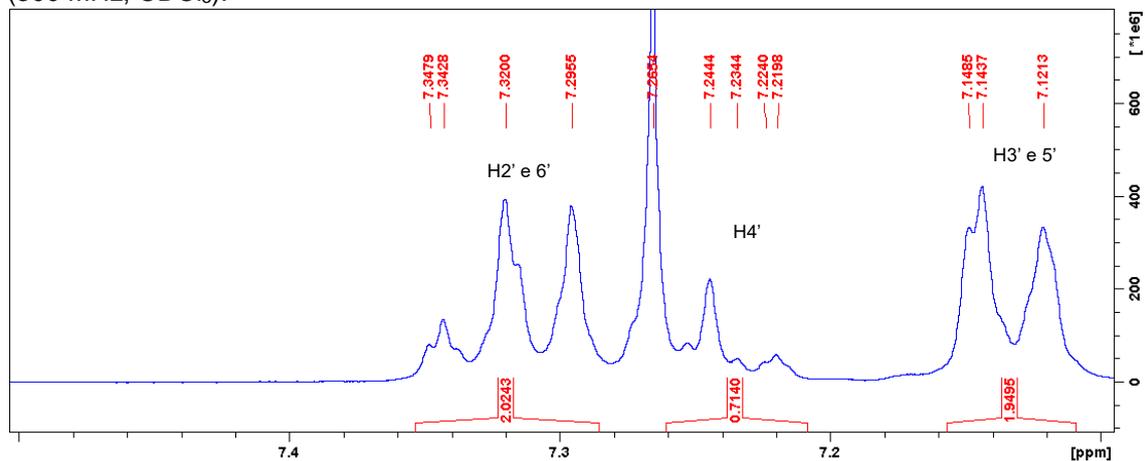


Figura 46 - Mapa de correlação HSQC (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz; CDCl_3) – Substância 1

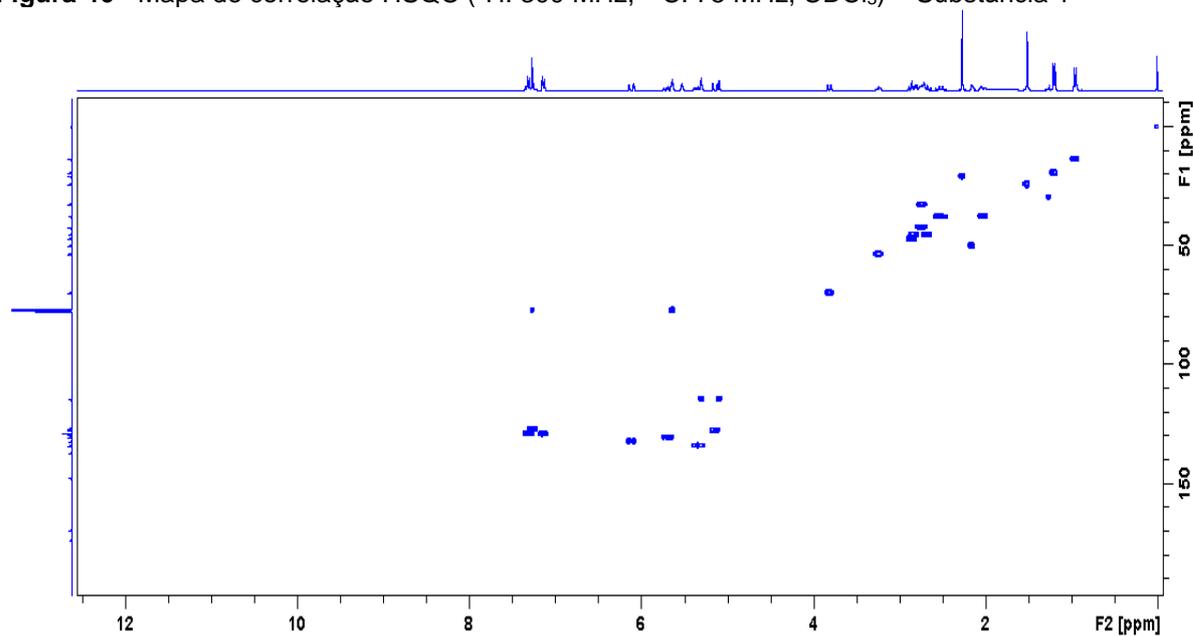
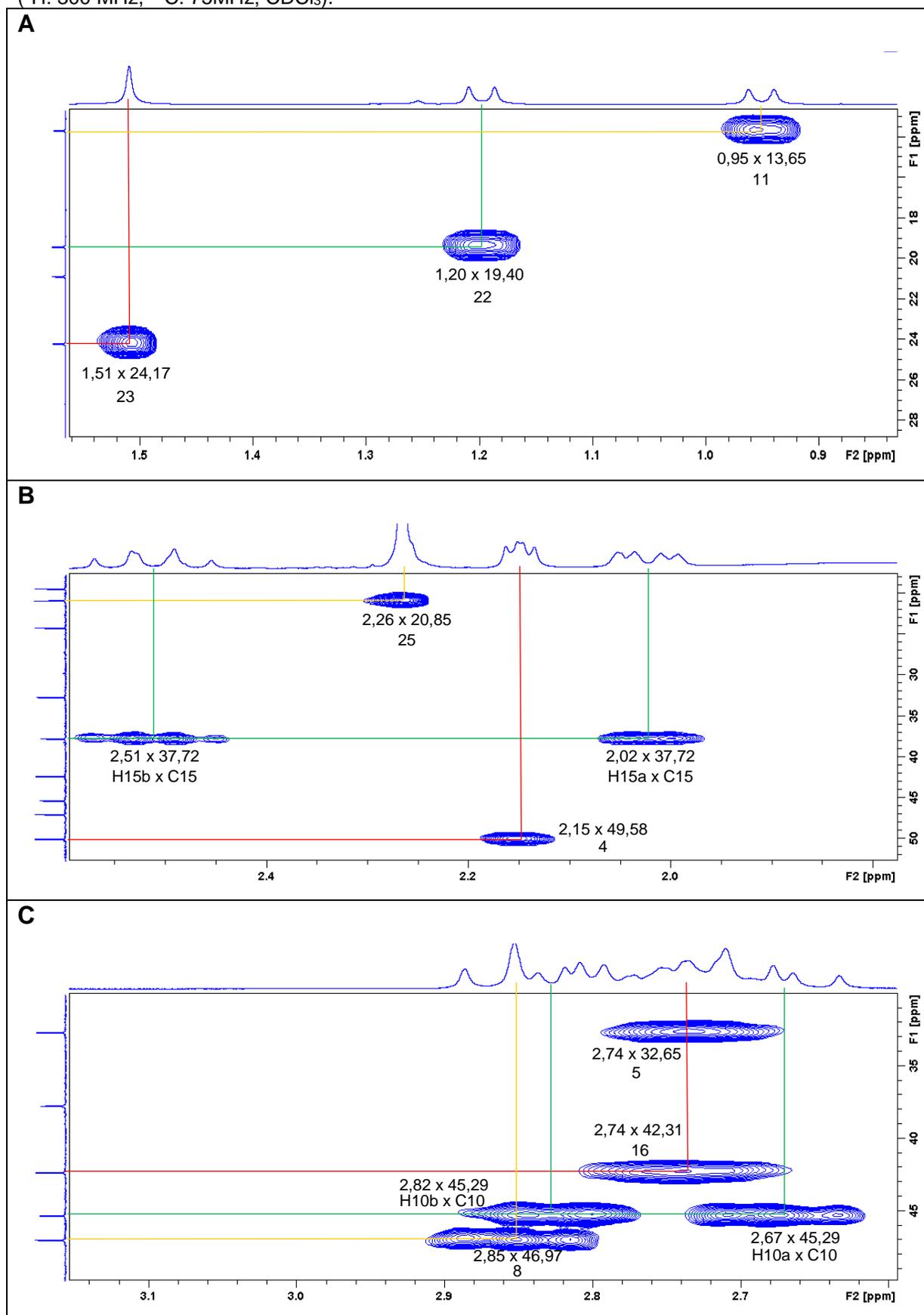
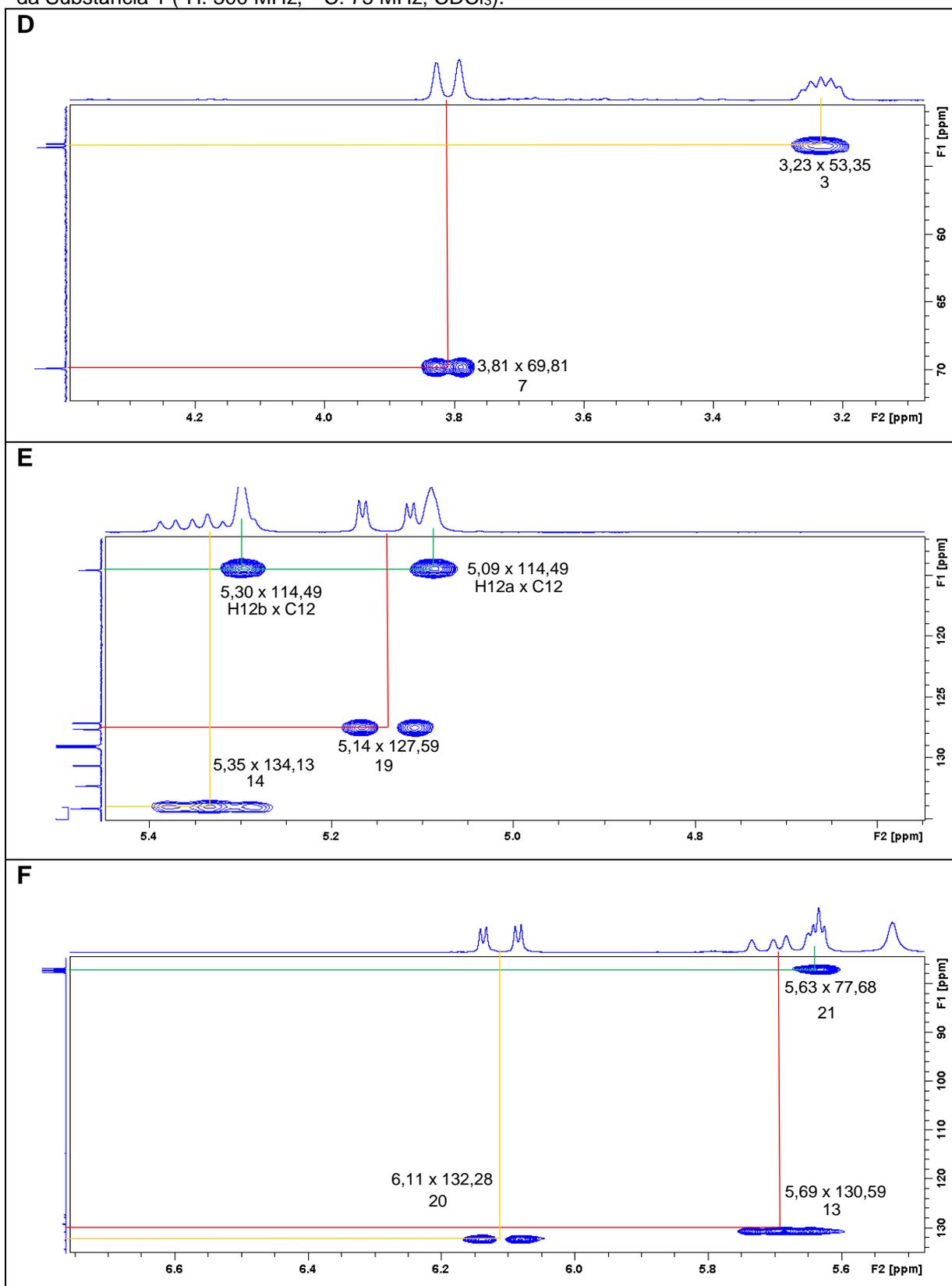


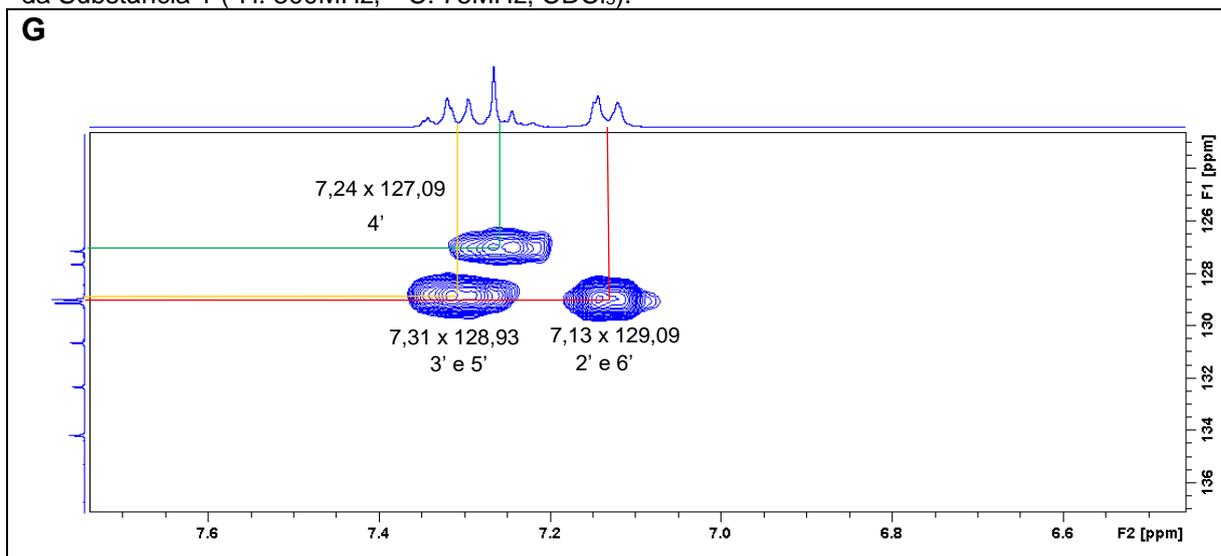
Figura 47 - Ampliação das regiões dos hidrogênios do mapa de correlações HSQC da Substância 1 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75MHz; CDCl_3).



Continuação da Figura 47 - Ampliação das regiões dos hidrogênios do mapa de correlações HSQC da Substância 1 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz; CDCl_3).



Continuação da Figura 47 - Ampliação das regiões dos hidrogênios do mapa de correlações HSQC da Substância 1 (^1H : 300MHz, ^{13}C : 75MHz; CDCl_3).

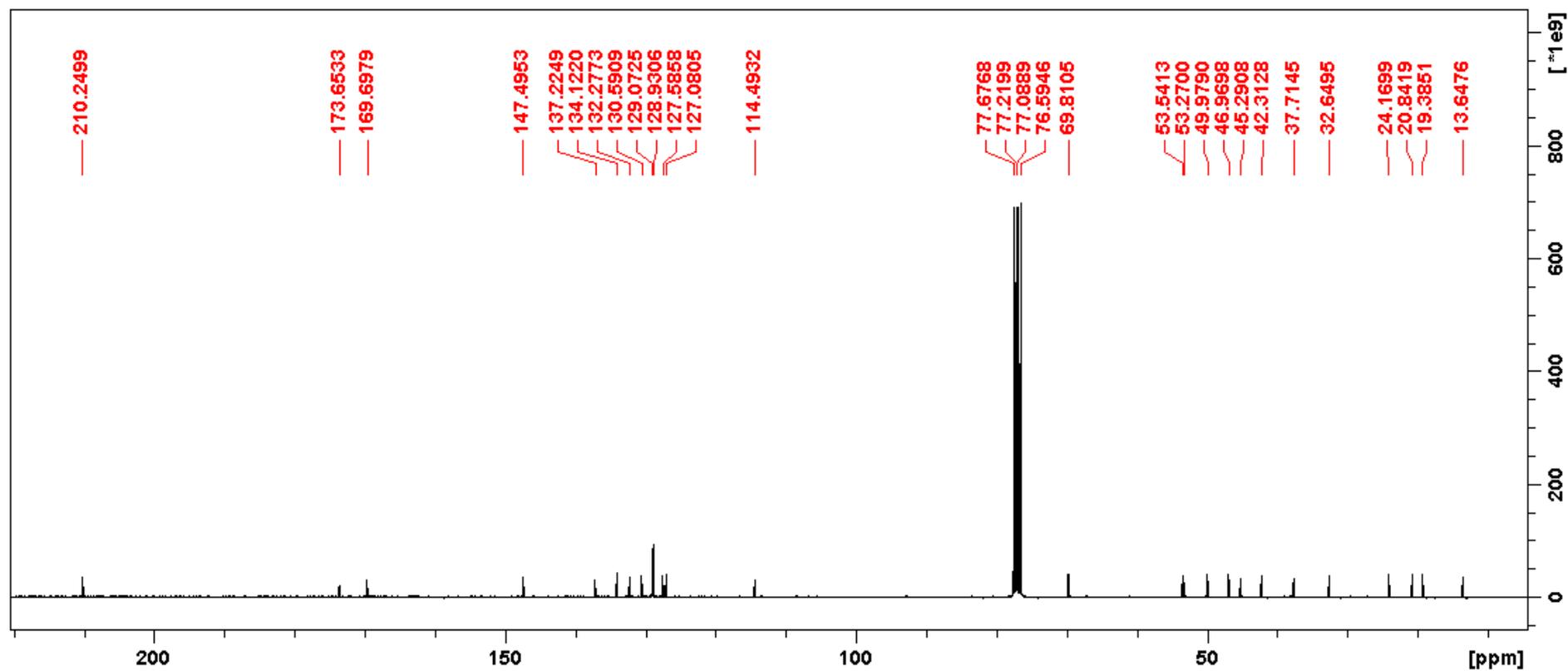


No espectro de ^{13}C foram observados no total trinta átomos de carbono (Figura 48). Os sinais de δ_{C} 137,23 (C-1'), 129,07 (C-2' e C-6'), 127,09 (C-4') e 128,93 (C-3' e C-5') são característicos de carbonos de anel aromático. As duplas ligações foram identificadas nos carbonos de deslocamento químico δ_{C} 147,50 (C-6), 114,49 (C-12), 130,59 (C-13), 134,13 (C-14), 127,59 (C-19), 132,28 (C-20).

Os sinais de deslocamento químico 169,70 (C-24), 173,66 (C-1) e 210,26 (C-17) correspondem às carbonilas do acetato, da amida da lactama de cinco membros e do anel macrocíclico, respectivamente. Os carbonos de deslocamento químico 69,81 (C-7) e 77,05 (C-18) estão ligados a hidroxilas e o carbono 21 (δ_{C} 77,68) encontra-se ligado ao oxigênio.

Os carbonos das metilas são: C-11 (δ_{C} 13,65), C-22 (δ_{C} 19,40), C-23 (δ_{C} 24,17) e C-25 (δ_{C} 20,85). Os carbonos secundários possuem os seguintes deslocamentos químicos: 45,29 (C-10) e 37,72 (C-15). Os carbonos terciários são: C-3 (δ_{C} 53,35), C-4 (δ_{C} 49,58), C-5 (32,65), C-8 (δ_{C} 46,97) e C-16 (42,31), e o sinal com deslocamento químico 53,28 é do carbono quaternário C-9.

Figura 48 - Espectro de RMN de ^{13}C da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).



O grau de deficiência de hidrogênio é igual a treze, o que é coerente com os dados de RMN que indicam presença de um anel aromático, três ligações duplas, três carbonilas e mais três estruturas cíclicas.

A posição dos átomos na molécula foi definida a partir dos dados acima e da observação dos mapas de correlações COSY e HMBC (Figuras 49 e 51) e de suas ampliações (Figuras 50 e 52).

Figura 49 - Mapa de correlação COSY da Substância 1 em CDCl_3 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz).

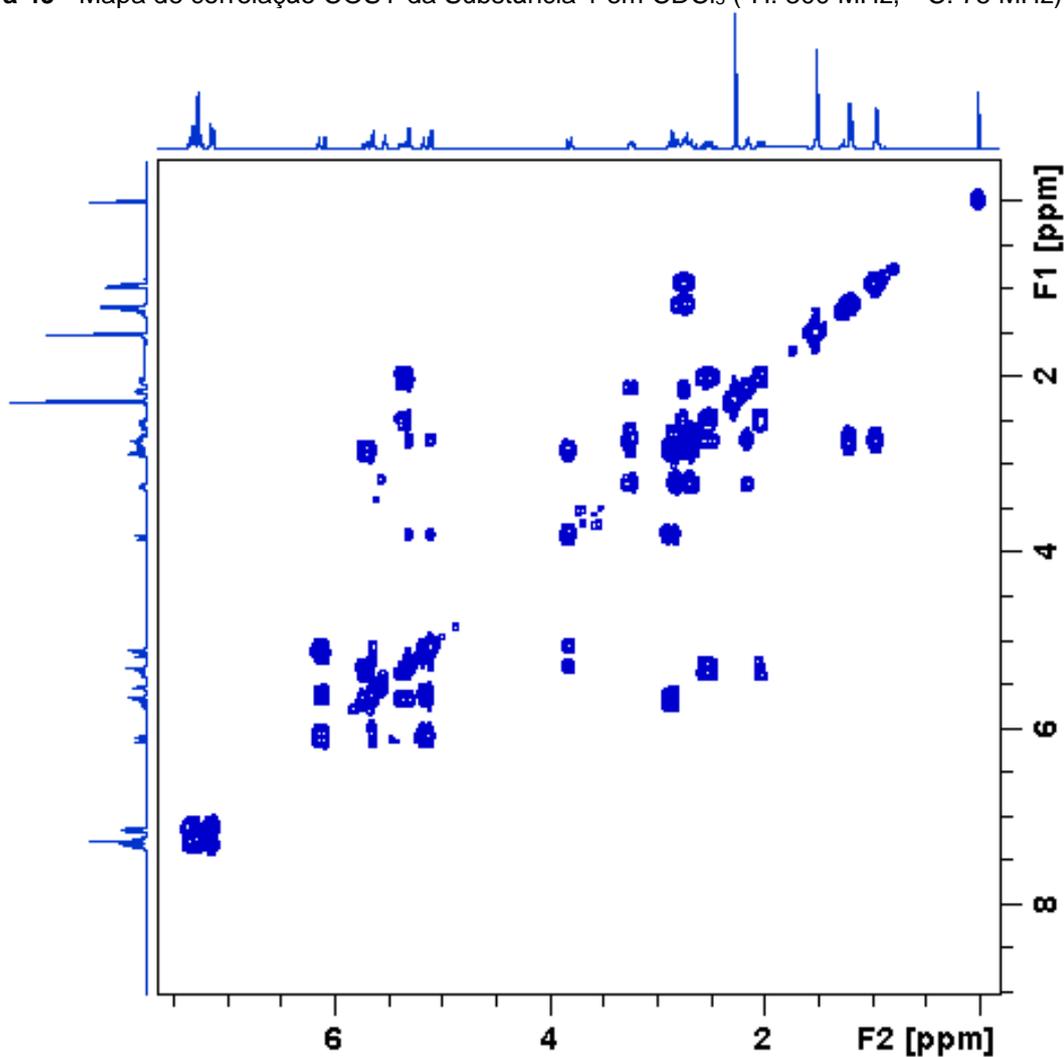
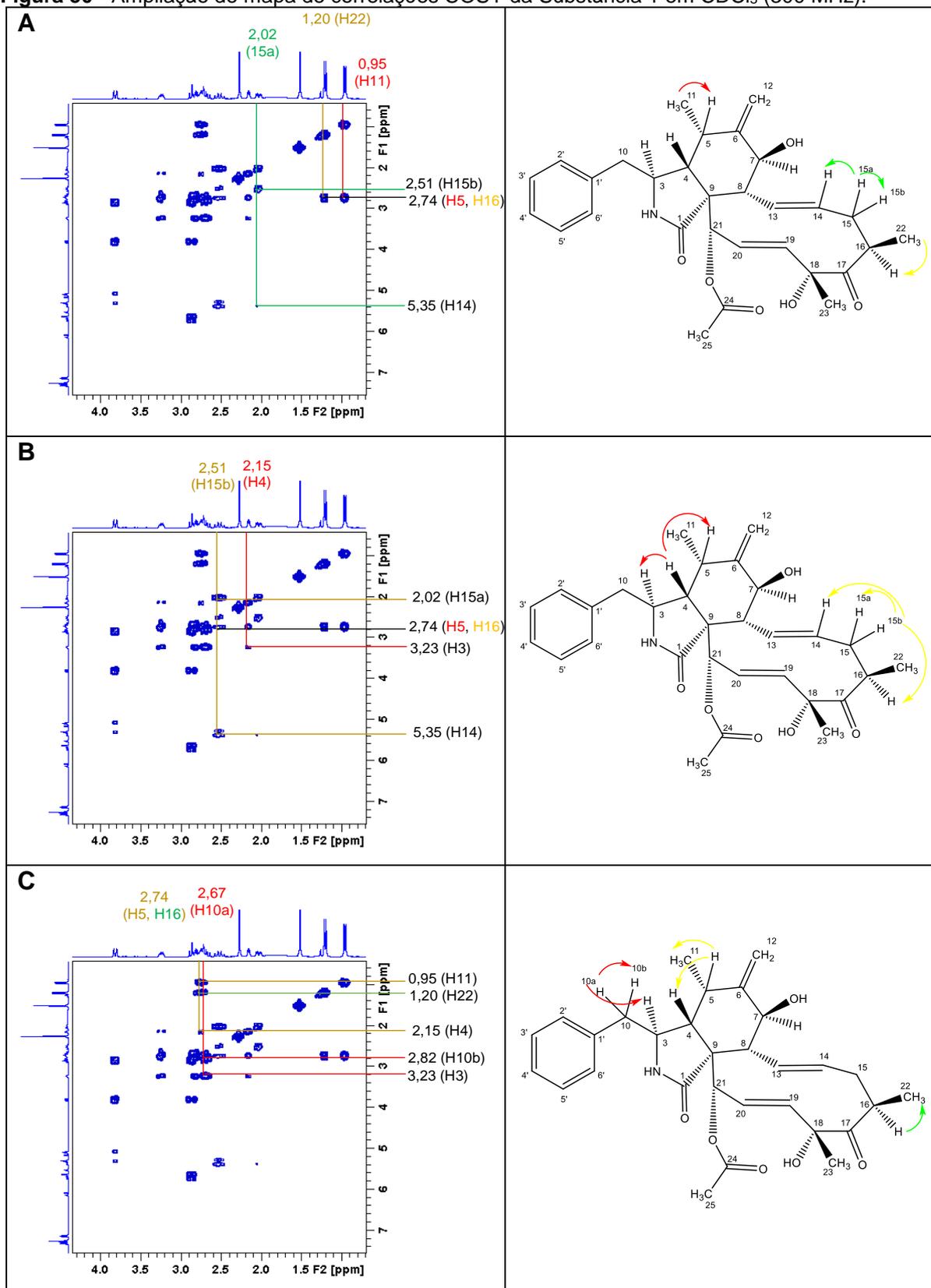
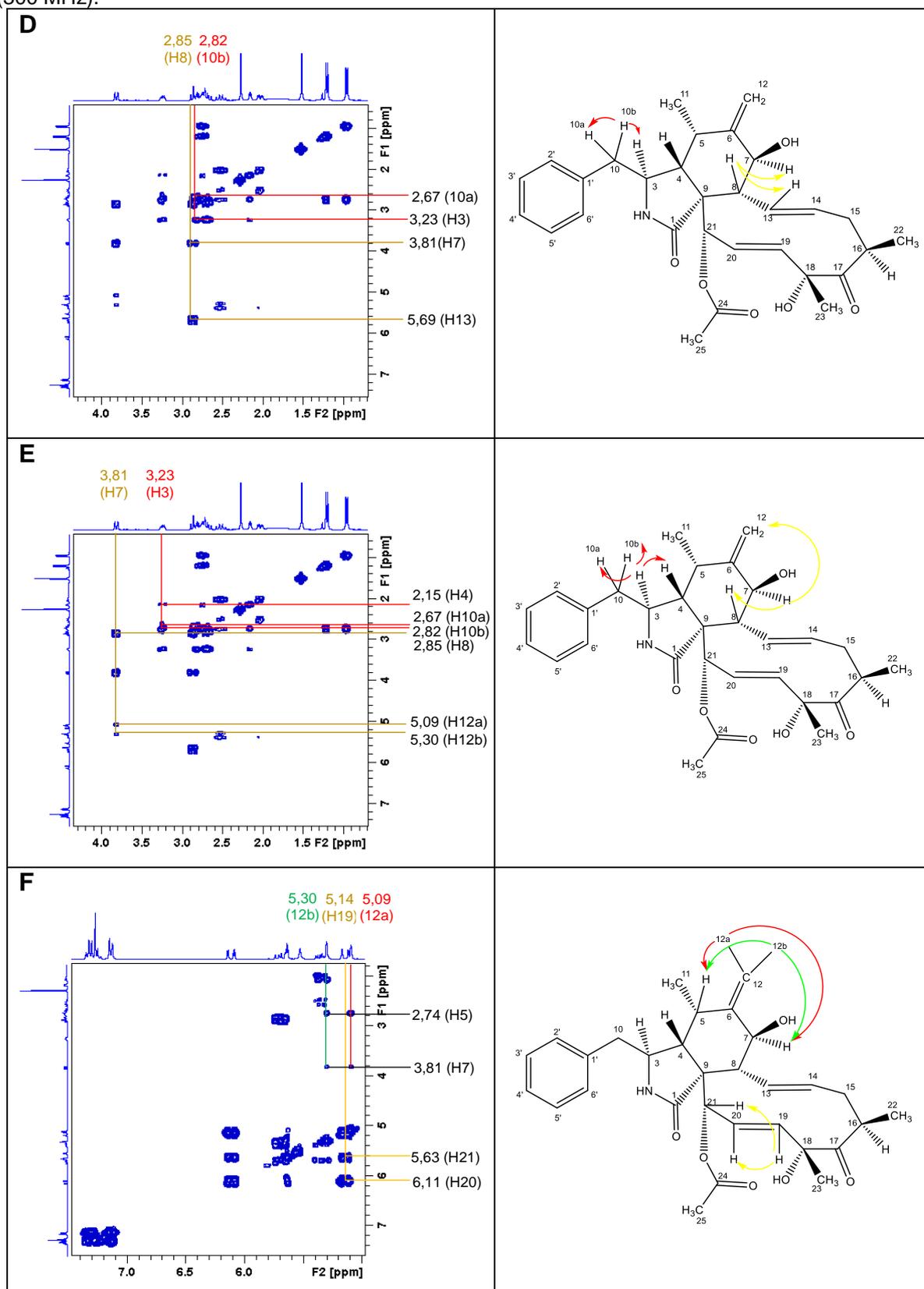


Figura 50 - Ampliação do mapa de correlações COSY da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).



Continuação da Figura 50 - Ampliação do mapa de correlações COSY da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).



Continuação da Figura 50 - Ampliação do mapa de correlações COSY da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).

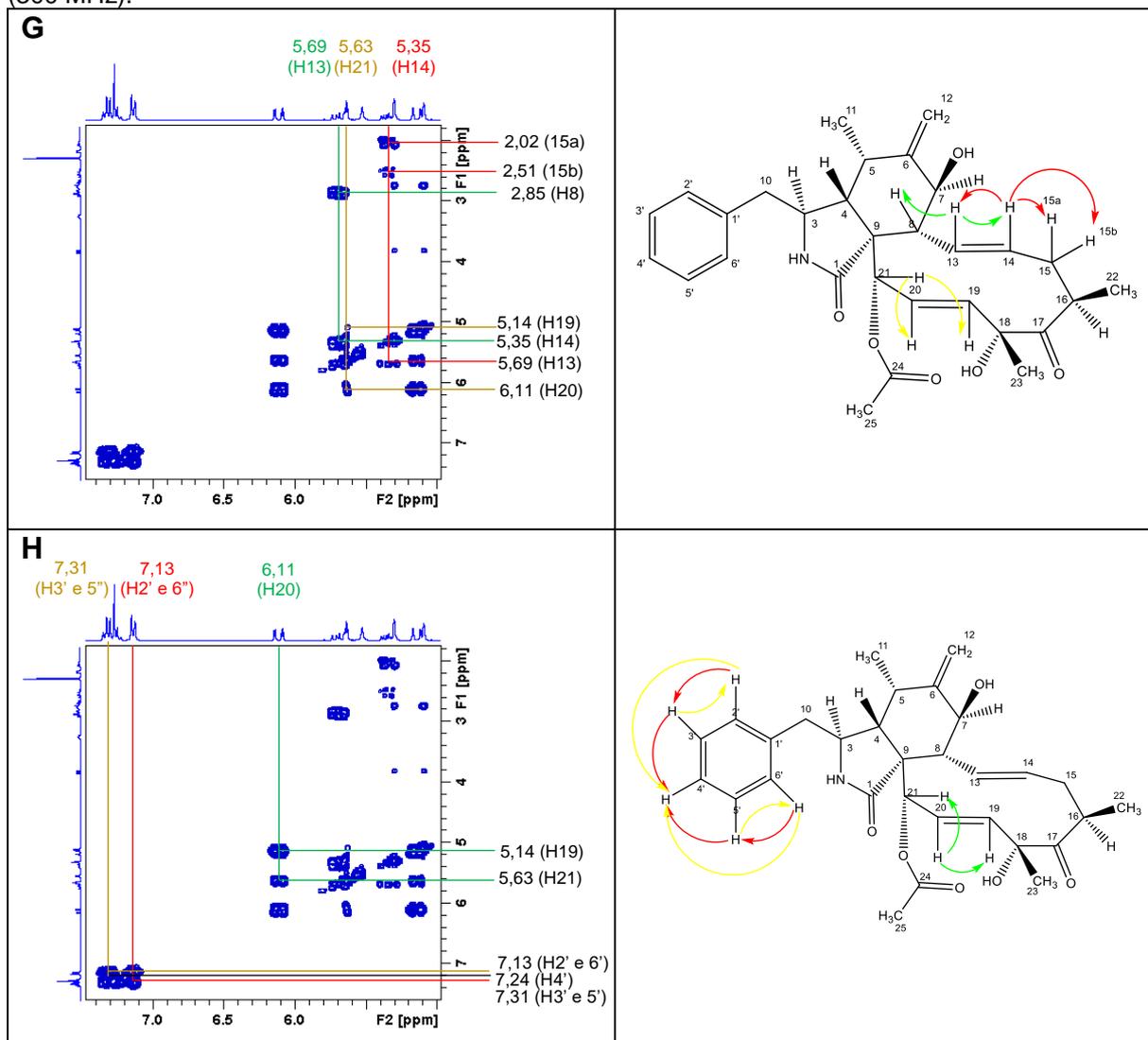


Figura 51 - Mapa de correlação HMBC da Substância 1 em CDCl_3 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz).

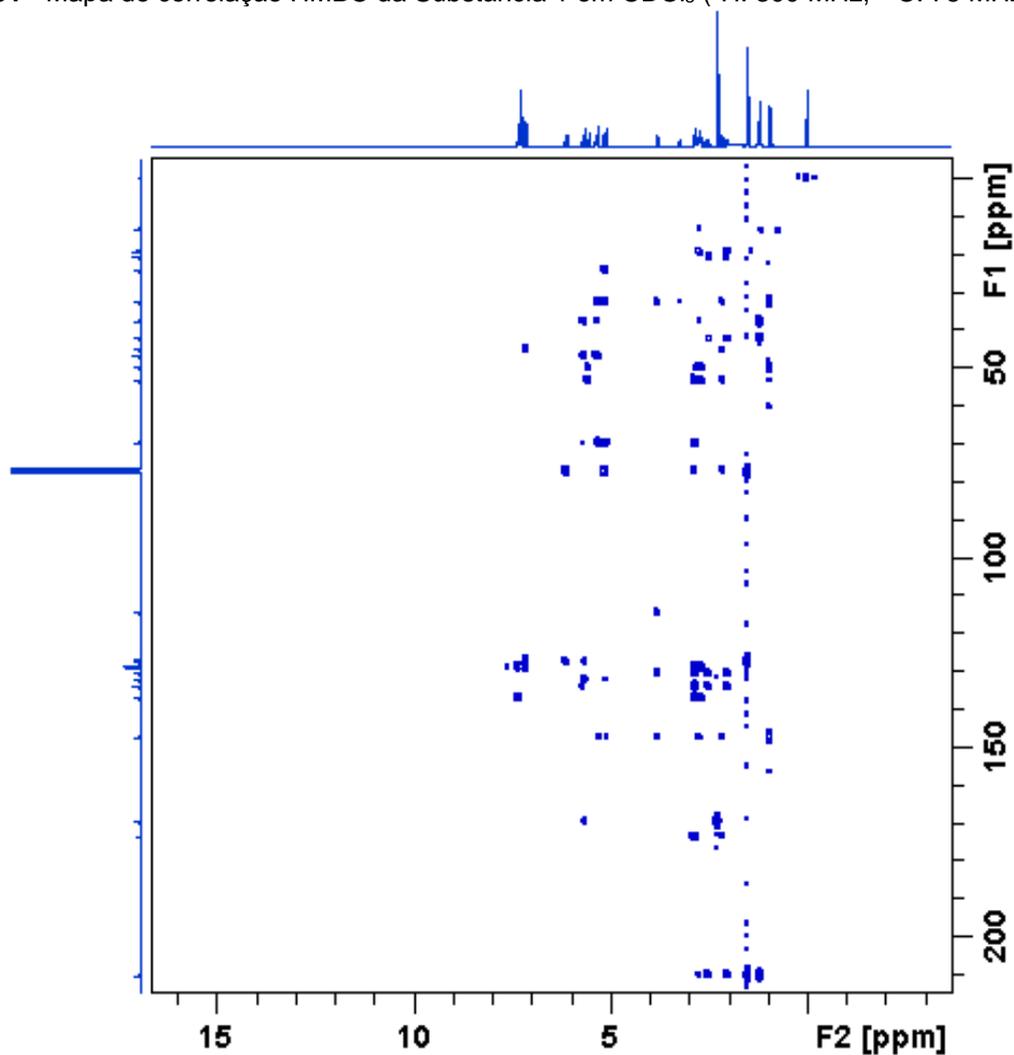
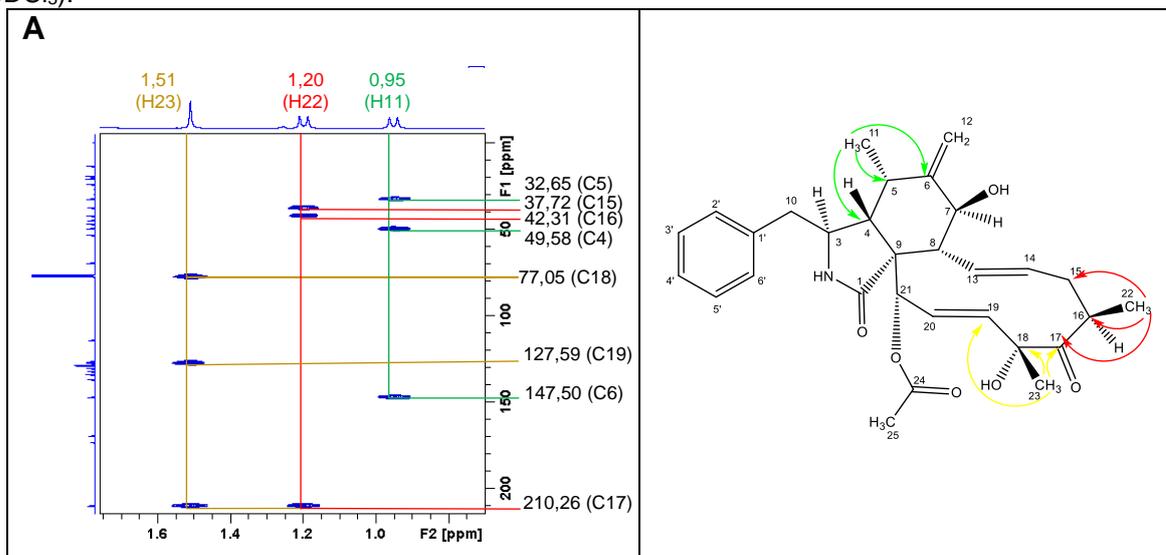
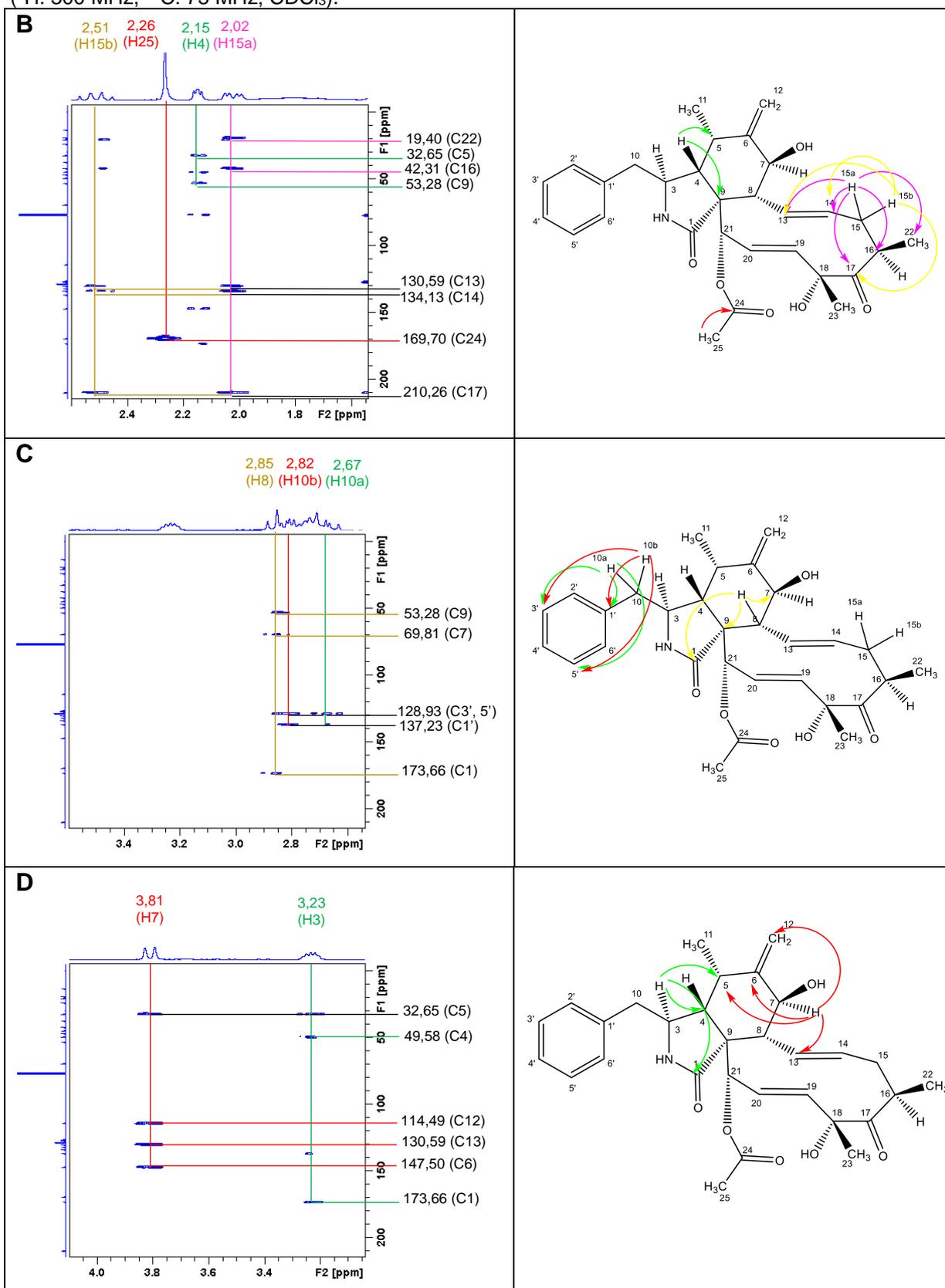


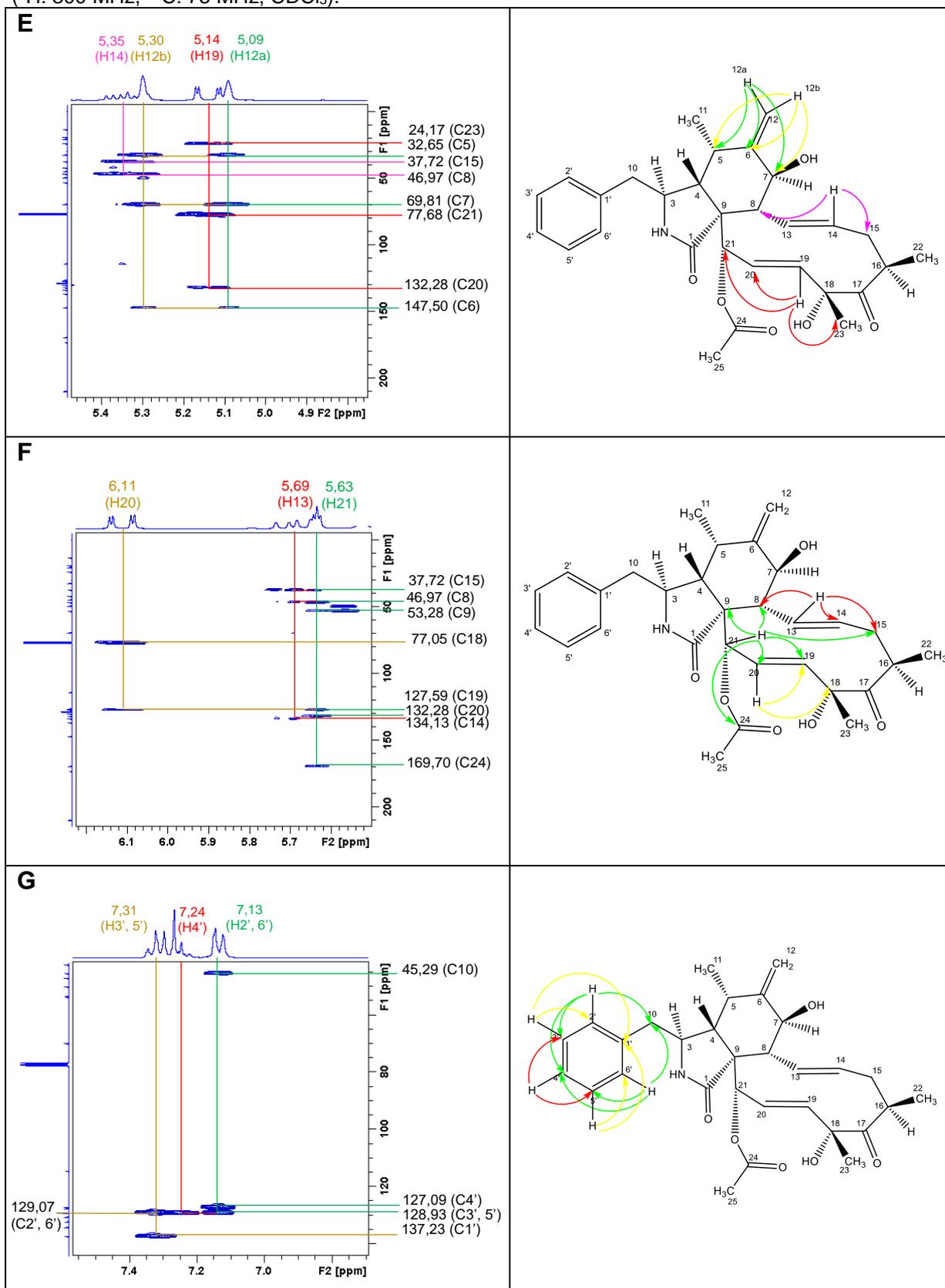
Figura 52 - Ampliação do mapa de correlações HMBC da Substância 1 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz; CDCl_3).



Continuação da Figura 52 - Ampliação do mapa de correlações HMBC da Substância 1 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz; CDCl_3).



Continuação da Figura 52 - Ampliação do mapa de correlações HMBC da Substância 1 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz; CDCl_3).



Para uma melhor compreensão da estrutura da molécula, as principais correlações de HMBC e COSY, estão descritas abaixo em quatro partes: anel aromático, lactama de cinco membros, ciclohexano e anel macrocíclico.

- **Identificação da parte contendo o Anel Aromático**

A posição do C-1' foi confirmada pela correlação com os hidrogênios benzílicos 10a e 10b. A posição do C-4' foi comprovada pela correlação H-4'→C-3' e C-5' (Figura 53). As posições dos H-2' e H-6' foram confirmadas pela correlação com o C-10 (Figura 53).

A posição dos hidrogênios benzílicos H-10a e H-10b foi confirmada pela correlação com o H-3 do anel lactâmico (Figura 54).

Figura 53 - Região dos hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HMBC da Substância 1 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz; CDCl_3).

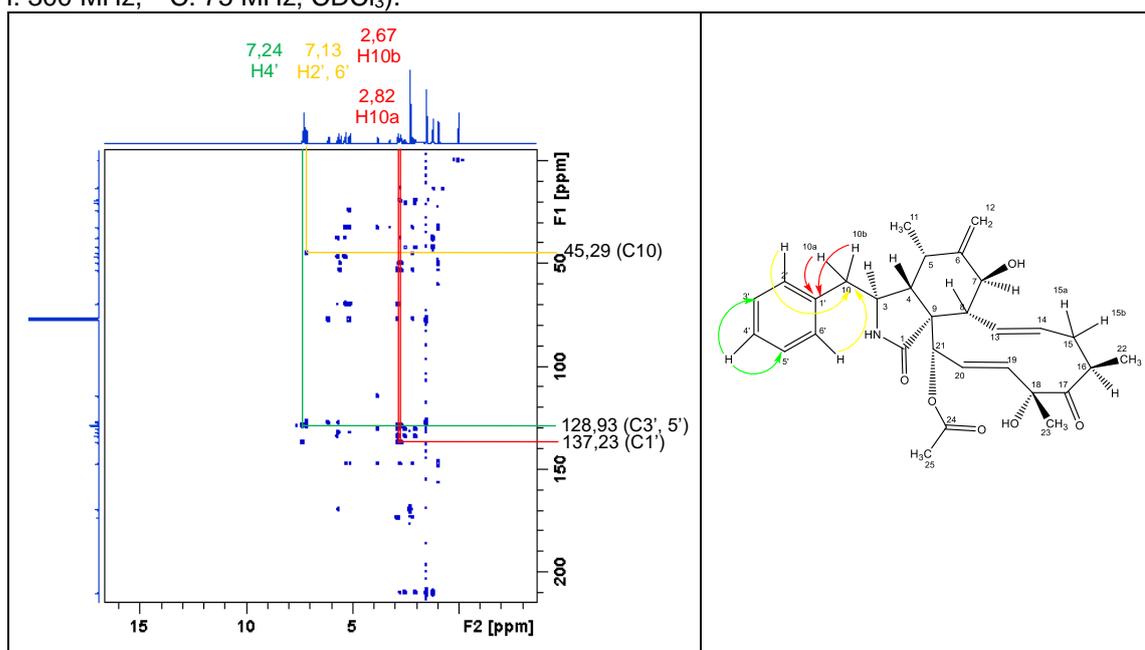
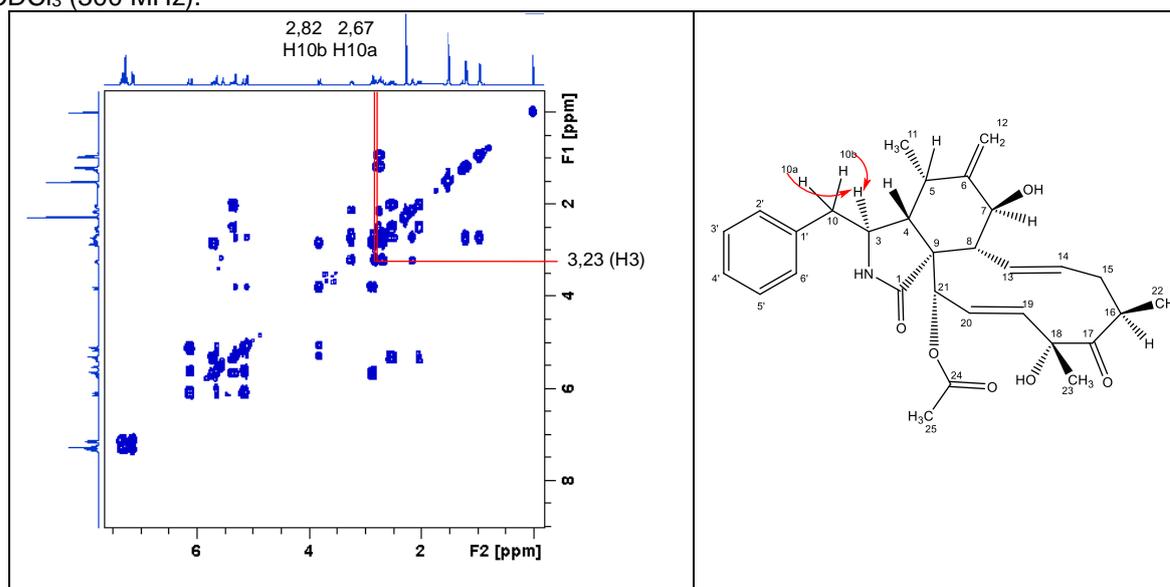


Figura 54 - Região dos hidrogênios benzílicos do mapa de correlações COSY da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).



- **Identificação da parte contendo a Lactama de cinco membros**

As posições dos átomos na lactama de cinco membros foram confirmadas pelas correlações: H-3 \rightarrow H-4, H10a, H10b, C-1, C-4; H-4 \rightarrow H-3, C9 (Figuras 55 e 56).

O deslocamento químico do C-3 ($\delta_c 53,35$) é característico de carbono ligado a nitrogênio e o C-1 apresenta deslocamento característico de um carbono de amida ($\delta_c 173,66$). Como descrito anteriormente, o hidrogênio ligado ao nitrogênio da amida ($\delta_H 5,52$) está integrando para um (1), portanto o nitrogênio da amida está ligado ao C-1 e ao C-3.

Figura 55 - Região dos hidrogênios da lactama de cinco membros do mapa de correlações COSY da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).

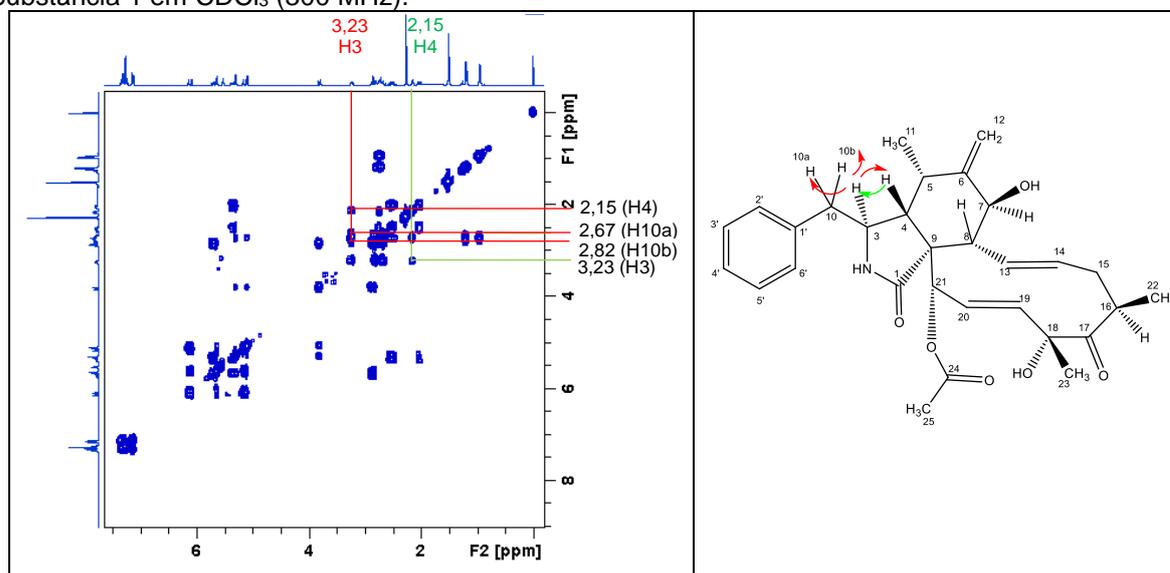
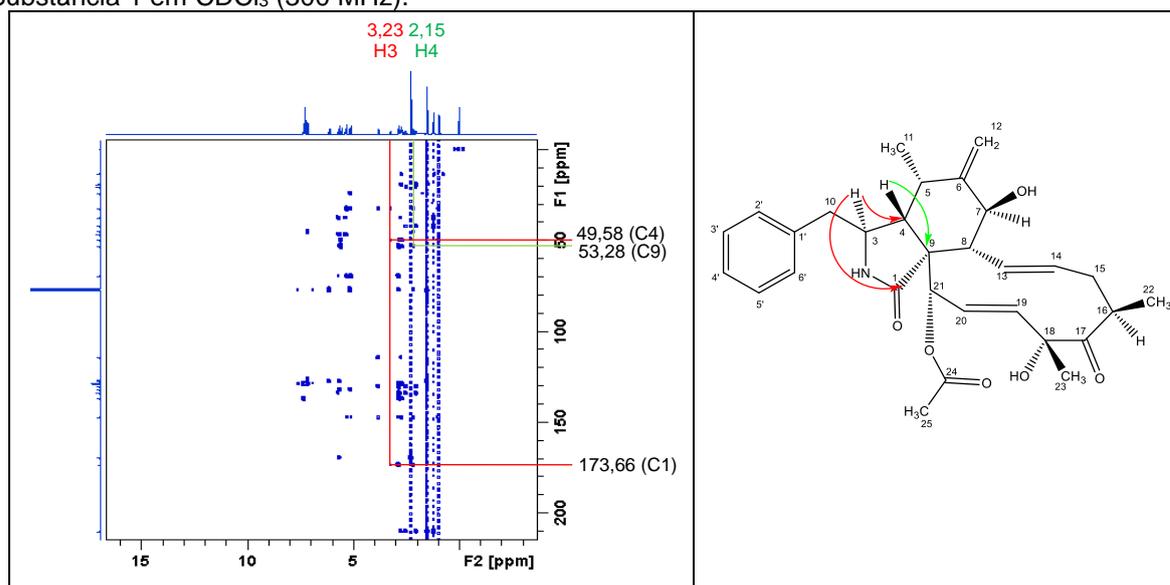


Figura 56 - Região dos hidrogênios da lactama de cinco membros do mapa de correlações HMBC da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).



- **Identificação da parte contendo o anel Ciclohexano:**

As principais correlações do ciclohexano estão representadas nas Figuras 57 e 58 e serão apontadas a seguir:

O hidrogênio H-4 está correlacionado com H-5 e com os carbonos C-5 e C-9. O H-5 apresenta correlação apenas com o H-4, porém o hidrogênio H-7 está correlacionado com o H-8 e com o carbono C-6. O hidrogênio H-8 além da correlação com o H-7, está correlacionado aos carbonos C-7 e C-9.

A posição do C-12 ligado por uma dupla ligação ao C-6, descrito anteriormente, foi confirmada pelas correlações de H12a/b com H-5, H-7 e C-6.

A posição da metila (C-11, H-11) no ciclohexano foi confirmada por sua correlação com H-5 e C-5.

As posições de C-5 e C-6 foram confirmadas por suas correlações com os hidrogênios H-12a e H-12b, que também estão correlacionados com o hidrogênio H-5. A posição do carbono C-5 ainda pode ser confirmada por sua correlação com os hidrogênios metílicos H-11.

A ligação do ciclohexano ao anel macrocíclico é observada nas correlações H-8→H13 e H13→C-8.

Figura 57 - Região dos hidrogênios do ciclohexano do mapa de correlações COSY da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).

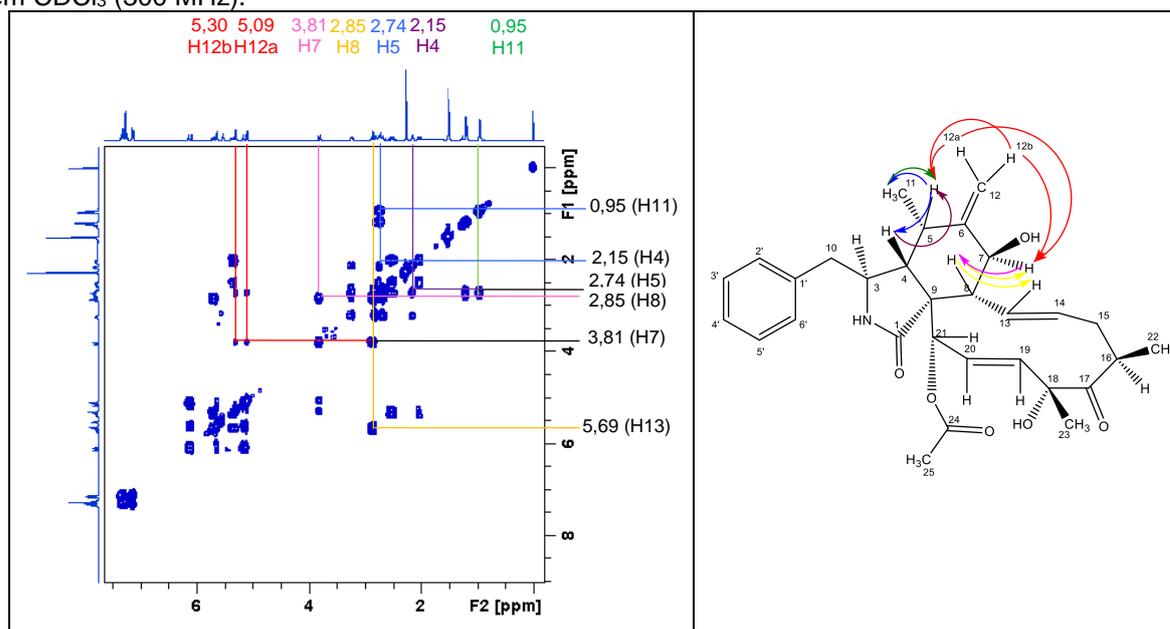
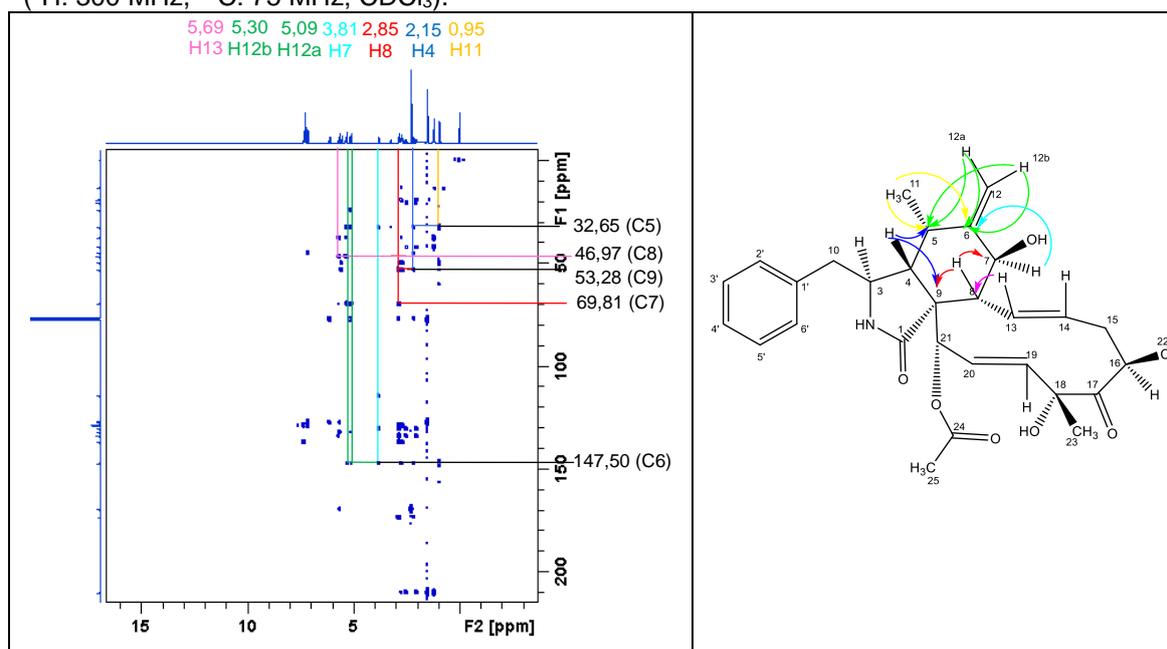


Figura 58 - Região dos hidrogênios do ciclohexano do mapa de correlação HMBC da Substância 1 (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz; CDCl_3).



- **Identificação da parte contendo o Anel Macrocíclico**

As principais correlações do anel macrocíclico estão representadas nas Figuras 59 e 60 e serão descritas a seguir:

O hidrogênio H-13 apresenta correlação com o H-8, H-14 e o carbono C-14. O hidrogênio H-14 correlaciona com o H-13, H-15a/b e o carbono C-15. Os hidrogênios

H-15a/b estão correlacionados com o H-14 e os carbonos C-14 e C-16. O Hidrogênio H-19 apresenta correlação com o H-20, H-21 e com o carbono C-20. O hidrogênio H-20 correlaciona com H-19, H-21 e com o carbono C-19. O hidrogênio H-21 correlaciona com o H-20 e os carbonos C-9 e C-20.

A posição da metila (C-22, H-22) no anel macrocíclico foi confirmada pela correlação com o H-16 e C-16.

A posição da metila do carbono C-23 foi confirmada pelas correlações H-23→C-17, C-18 e C-19.

A posição do carbono de carbonila C-17 (δ_c 210,26) foi confirmada por sua correlação com os hidrogênios metílicos H-23 e H-22. A posição do carbono ligado a hidroxila C-18 (δ_c 77,05) foi confirmada pela correlação apresentado com os hidrogênios metílicos H-23.

A posição do acetato é confirmada pela correlação H-21→C-24 e a metila do acetato foi confirmada pela correlação H-25→C-24.

Figura 59 - Região dos hidrogênios do anel macrocíclico do mapa de correlações COSY da Substância em CDCl_3 (300 MHz).

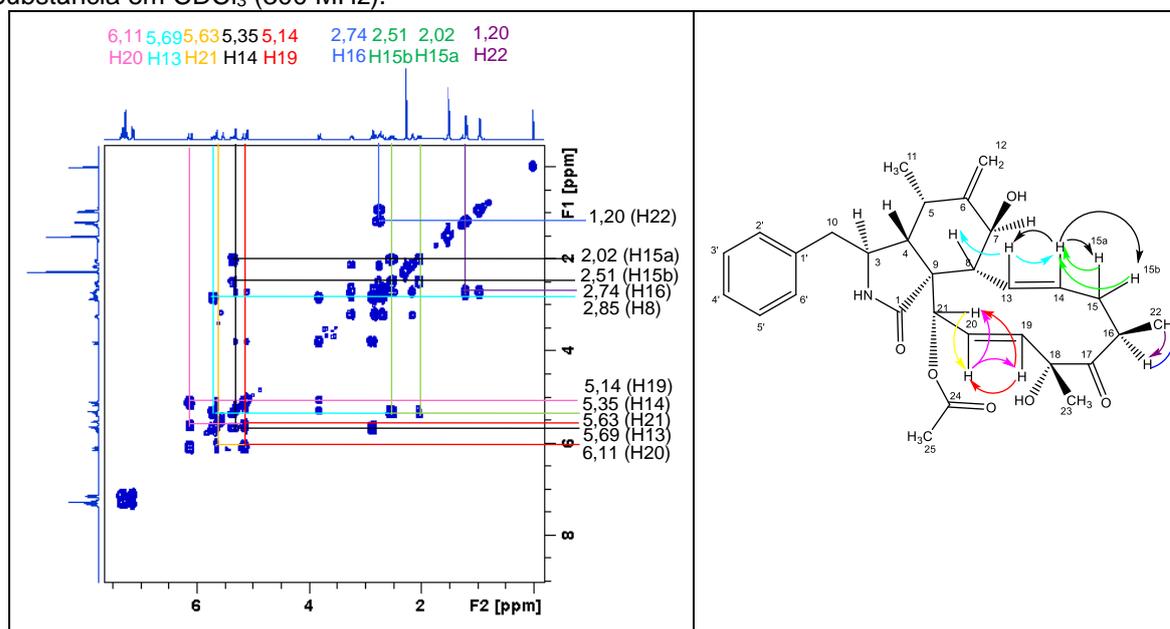
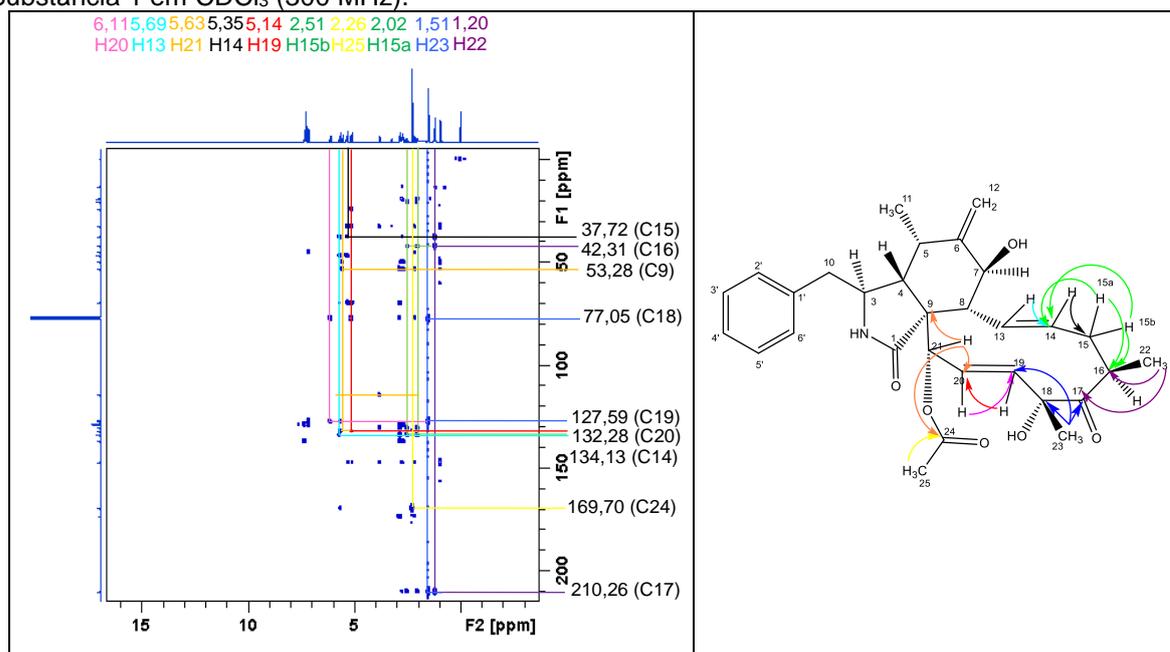


Figura 60 - Região dos hidrogênios do mapa de correlações HMBC da Substância 1 em CDCl_3 (300 MHz).



As demais correlações encontradas nos espectros de COSY e HMBC da substância 1 estão demonstradas na Tabela 23.

Tabela 23 - Dados de RMN 1D e 2D da Citocalasina D em CDCl₃ (300 MHz).

Posição	Substância 1: Citocalasina D				Literatura: Citocalasina D ¹	
	¹ H ^{*,**}	HSQC*	COSY	HMBC	¹ H ^{*,**}	HSQC*
1	-	173,66	-	-	-	174
2	5,52 (s, 1H)	-	NH	-	5,46 (s, 1H)	-
3	3,23 (m, 1H)	53,35	H-4, H-10a/b	C-1, C-4, C-5	3,23 (m, 1H)	53
4	2,15 (dd, 4,9; 3,5; 1H)	49,58	H-3, H-5	C-5, C-9	2,15 (dd, 4,8; 2,8; 1H)	50
5	2,74 (m, 1H)	32,65	H-4, H-11	-	2,75 (m, 1H)	32,9
6	-	147,50	-	-	-	147,4
7	3,81 (d, 10,7; 1H)	69,81	H-8, H-12a/b	C-5, C-6, C-12, C-13	3,81 (d, 10,4; 1H)	70
8	2,85 (m, 1H)	46,97	H-7, H-13	C-1, C-7, C-9	2,86 (m, 1H)	46
9	-	53,28	-	-	-	53,1
10a	2,67 (m, 1H)	45,29	H-3, H-10b	C-1', C-3' e C-5'	2,69 (m, 1H)	45,8
10b	2,82 (m, 1H)		H-3, H-10a		2,80 (m, 1H)	
11	0,95 (d, 6,71; 3H)	13,65	H-5	C-4, C-5, C-6	0,96 (d, 6,8; 3H)	13,9
12a	5,09 (s, 1H)	114,49	H-5, H-7	C-5, C-6, C-7	5,09 (s, 1H)	114,5
12b	5,30 (s, 1H)				5,30 (s, 1H)	
13	5,69 (dd, 16,0; 10,0; 1H)	130,59	H-8, H-14	C-8, C-14	5,70 (dd, 16; 10; 1H)	130,9
14	5,35 (ddd, 16,0; 10,0; 5,2; 1H)	134,13	H-13, H-15a/b	C-8, C-15	5,34 (ddd, 16; 10,4; 5,6; 1H)	134,2
15a	2,02 (dd, 12,8; 5,2; 1H)	37,72	H-14, H-15b	C-14, C-15b, C-16	2,02 (m, 1H)	37,8
15b	2,51 (m, 1H)		H-14, H-15a, H-16	C-14, C-15a, C-16	2,51 (m, 1H)	
16	2,74 (m, 1H)	42,31	H-22	-	2,75 (m, 1H)	42,3
17	-	210,26	-	-	-	210,2
18	-	77,05	-	-	-	78

¹Dados extraídos de (AMARAL, 2009). *deslocamento químico em ppm, constantes de acoplamento em Hz. s (singlete), d (dubleto), dd (duplo dubleto), m (multiplete).

Continuação da Tabela 23 - Dados de RMN 1D e 2D da Substância 1 e da Citocalasina D em CDCl₃ (300 MHz).

Posição	Substância 1: Citocalasina D				Literatura: Citocalasina D ¹	
	¹ H*	HSQC*	COSY	HMBC	¹ H*	HSQC*
19	5,14 (<i>dd</i> , 15,8; 2,4; 1H)	127,59	H-20, H-21	C-20, C-21, C-23	5,14 (<i>dd</i> , 15,6; 2,4; 1H)	127,6
20	6,11 (<i>dd</i> , 15,8; 2,4; 1H)	132,28	H-19, H-21	C-18, C-19	6,11 (<i>dd</i> , 15,6; 2,8; 1H)	132,5
21	5,63 (<i>t</i> , 2,4; 1H)	77,68	H-19, H-20		5,64 (<i>dd</i> , 2,8; 2,4; 1H)	77
22	1,20 (<i>d</i> , 6,8; 3H)	19,40	H-16	C-15, C-16, C-17	1,20 (<i>d</i> , 6,8; 3H)	19,5
23	1,51 (<i>s</i> , 3H)	24,17	-	C-17, C-18, C-19	1,51 (<i>s</i> , 3H)	24,5
24	-	169,70	-	-	-	170
25	2,26 (<i>s</i> , 3H)	20,85	-	C-24	2,27 (<i>s</i> , 3H)	21,8
1'	-	137,23	-	-	-	140
2' e 6'	7,31 (<i>m</i> , 2H)	128,93	H-3', H-4', H-5'	C-10, C-4', C-3' e C-5'	7,31 (<i>m</i> , 2H)	128,5
3' e 5'	7,13 (<i>m</i> , 2H)	129,07	H-2', H-4', H-6'	C-1, C-2 e C-6'	7,13 (<i>dd</i> , 6,8; 1,6; 2H)	128,8
4'	7,24 (<i>m</i> , 1H)	127,09	-	C-3' e C-5'	7,24 (<i>m</i> , 1H)	126

¹Dados extraídos de (AMARAL, 2009). *deslocamento químico em ppm, constantes de acoplamento em Hz. *s* (singleto), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *m* (multiplete).

A estrutura identificada corrobora com os dados existentes na literatura sobre citocalasinas. A substância isolada do endófito *Xylaria* sp. possui a mesma estrutura das citocalasinas da família Xylariaceae. Essa classe de substâncias possui no esqueleto um anel macrocíclico, em sua maioria, com 11 membros, com poucas exceções, com 12, 13 ou 14 membros. Na posição 10 apresenta um grupo fenila, uma ligação dupla nas posições C13-C14, além de grupos metílicos nas posições 5, 6, 16 e/ou 18 (DOMBROWSKI et al., 1992)

As citocalasinas são metabólitos fúngicos com atividades biológicas relevantes como: inibição da citocinese sem interferir na divisão nuclear, dando origem às células multinucleadas, inibição do movimento celular e extrusão nuclear. (COLE; COX, 1981).

A citocalasina D foi isolada primeiramente a partir de *Metarhizium anisopliae* (ALDRIDGE et al., 1967). Entretanto, a sua produção não é limitada apenas a esse fungo e outras espécies também são produtoras dessa substância: *Hypoxylon terricola*, *Engleromyces goetzii*, *X. mellisii*, *Xylaria* sp., *X. cubensis* e *X. arbuscula* (AMARAL et al., 2014; CHEN et al., 2011; EDWARDS; MAITLAND; WHALLEY, 1989; KLAIKLAY et al., 2012; PITTAYAKHAJONWUT et al., 2005; PONGCHAROEN et al., 2007).

A citocalasina D é um metabólito fúngico que age na célula inibindo a polimerização dos filamentos de actina ao ligar-se à extremidade (+) da actina F, impedindo a adição de novas unidades. Esse mecanismo resulta em alterações no citoesqueleto, na motilidade celular, na citocinese, na aderência, na secreção e no fluxo de substâncias, onde a participação dos microfilamentos de actina é fundamental (AMARAL et al., 2017; CASELLA; FLANAGAN; LIN, 1981; HUANG et al., 2012).

Essa substância também é conhecida como zygospirina A e possui atividades biológicas semelhantes à citocalasina B, entretanto dez vezes mais potente nas células de mamíferos, e em doses altas pode levar à extrusão celular.

A sua atuação na estrutura celular faz com que a citocalasina D seja amplamente utilizada nos estudos que precisam desvendar os mecanismos de interação entre as células envolvidas. Nas infecções onde a invasão celular é mediada pelos microfilamentos de actina, observa-se que na presença da

citocalasina D há uma redução da internalização. Essa substância pode influenciar na motilidade do parasita, no citoesqueleto da célula hospedeira e na interação de receptores de ambos, interferindo na internalização ou no egresso do micro-organismo. Por esses motivos a citocalasina D é tão empregada nos estudos com diferentes tipos celulares e pode contribuir para a descoberta de novos alvos para os medicamentos (CAI et al., 2015; ELLIOTT; WINN, 1986; HANNA, 2001; ROBERTS; MANICASSAMY; LAMB, 2015; SCHENKMAN; ROBBINS; NUSSENZWEIG, 1991; SOUZA; MARTINS-DUARTE; LEMGRUBER, 2010).

Outra aplicabilidade da citocalasina D é observada na criopreservação de embriões bovinos, suínos e ovinos, pois essa substância pode ser uma alternativa para prevenir a ruptura celular, durante e após o processo de criopreservação dos embriões. A centrifugação na presença de citocalasina D torna a membrana celular e o citoesqueleto mais elásticos, resultando em células mais resistentes à micromanipulação e ao estresse osmótico que ocorre no processo de congelamento e aquecimento dos embriões (ROMÃO, 2014).

Neste trabalho foram isolados 48 mg de citocalasina D, e com as frações ainda estocadas poderemos chegar até 196 mg de substância isolada, um rendimento de 65 mg/L. Esse valor ainda pode aumentar se otimizarmos a produção alterando as condições do cultivo, como meio de cultura, temperatura ótima, pH e tempo de crescimento. Por isso, o fungo isolado ainda pode ser empregado em estudos futuros para a obtenção desta substância que já possui um valor agregado no mercado mundial.

5.10.2. Substância 2

A substância 2 isolada (1,7 mg), apresentou-se como sólido amorfo e quando analisada por CCDC, ficou alaranjada com o revelador Dragendorff. Na espectrometria de massas de alta resolução (ESI+) (Figura 61) observa-se o pico de m/z 677,3781 u resultando na massa molecular de 676,3781 u. Essa substância ainda está em fase de elucidação, mas a seguir encontram-se o espectro de RMN de ^1H (Figura 62) e os dados de RMN 1D (Tabela 24).

Figura 61 - Espectro de massas de alta resolução da substância 2.

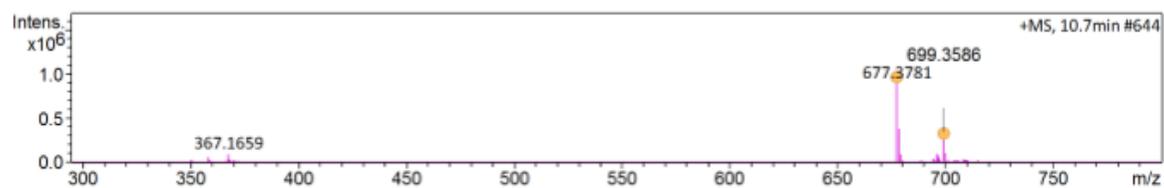
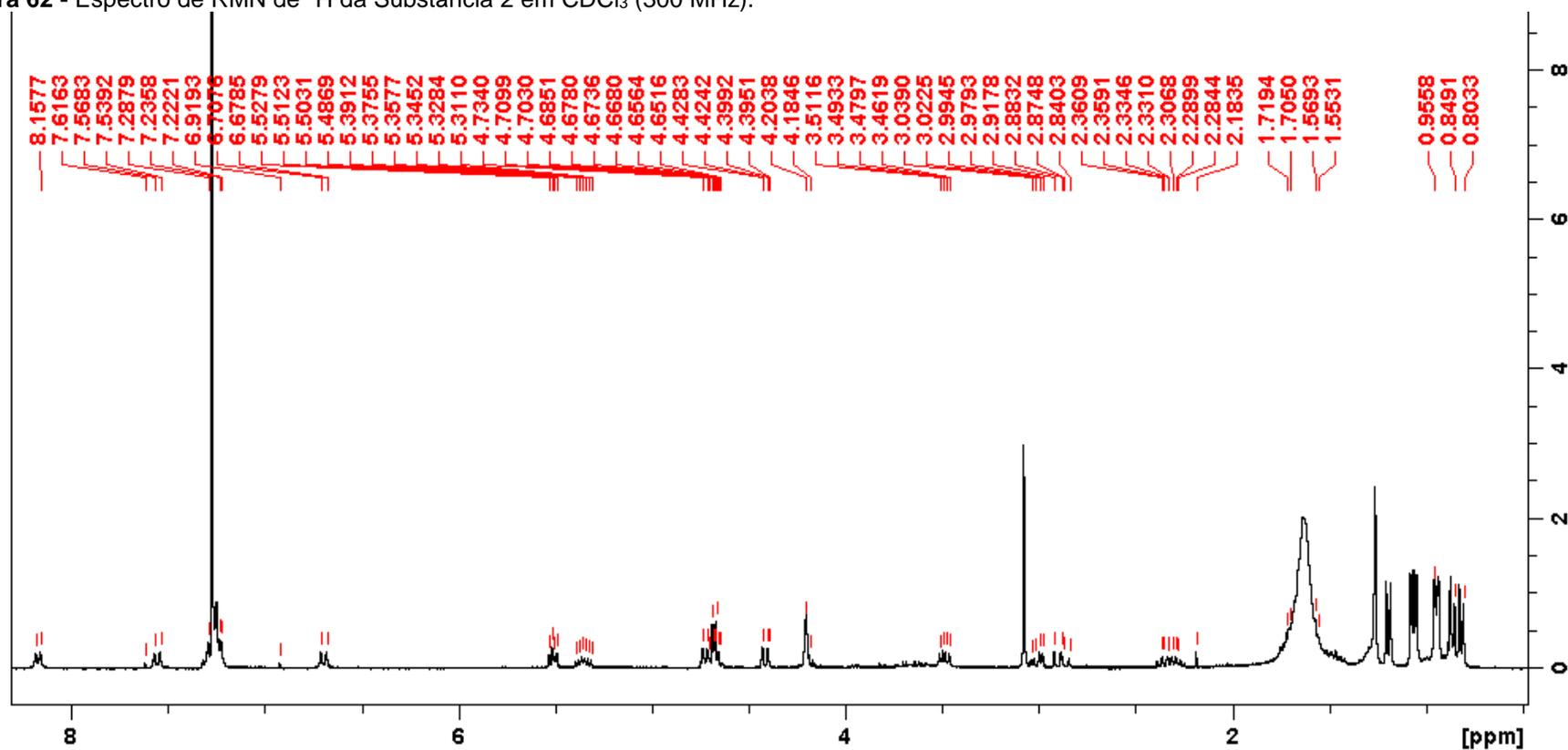
Figura 62 - Espectro de RMN de ¹H da Substância 2 em CDCl₃ (300 MHz).

Tabela 24 - Dados de RMN 1D da Substância 2 em CDCl₃ (300 MHz).

Substância 2
¹H*
0,81 (<i>d</i> , 6,33; 3H)
0,86 (<i>d</i> , 6,24; 3H)
0,93 (<i>dd</i> , 13,66; 6,14; 6H)
1,06 (<i>dd</i> , 6,81; 3,03; 6H)
1,18 (<i>d</i> , 6,61; 3H)
1,29 (<i>m</i> , 1H)
1,46-1,74 (<i>m</i> , 5H)
2,32 (<i>m</i> , 1H)
2,88 (<i>dd</i> , 13,02; 10,41; 1H)
3,01 (<i>dd</i> , 12,93; 4,87; 1H)
3,07 (<i>s</i> , 3H)
3,48 (<i>dd</i> , 9,47; 5,37; 1H)
4,20 (<i>m</i> , 2H)
4,41 (<i>dd</i> , 8,81; 1,30; 1H)
4,66 (<i>m</i> , 1H)
4,67 (<i>d</i> , 5,12; 1H)
4,72 (<i>d</i> , 7,26; 1H)
5,35 (<i>m</i> , 1H)
5,51 (<i>dd</i> , 7,33; 4,7; 1H)
7,24 (<i>m</i> , 3H)
7,28-7,31 (<i>m</i> , 2H)
6,69 (<i>d</i> , 8,7; 1H)
7,55 (<i>d</i> , 8,7; 1H)
8,16 (<i>d</i> , 7,15; 1H)

*deslocamento químico em ppm, constantes de acoplamento em Hz. *s* (singleto), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *m* (multiplete).

5.10.3. Mistura de alcaloides

A mistura de alcaloides (3,6 mg), apresentou-se como sólido amorfo e quando analisada por CCDC, apresentou uma mancha alaranjada com o revelador Dragendorff. No cromatograma obtido através de LC-MS observam-se os picos de *m/z* 542,2744 e 524,2653 u, este último, em maior abundância na mistura (Figura 63). Mesmo em mistura ainda prosseguimos com a tentativa de elucidação da substância e através dos dados da literatura (ESPADA et al., 1997; MARCON, 2013). Abaixo encontram-se os espectros de massas de alta resolução e o espectro de RMN de ¹H (Figuras 64 e 65).

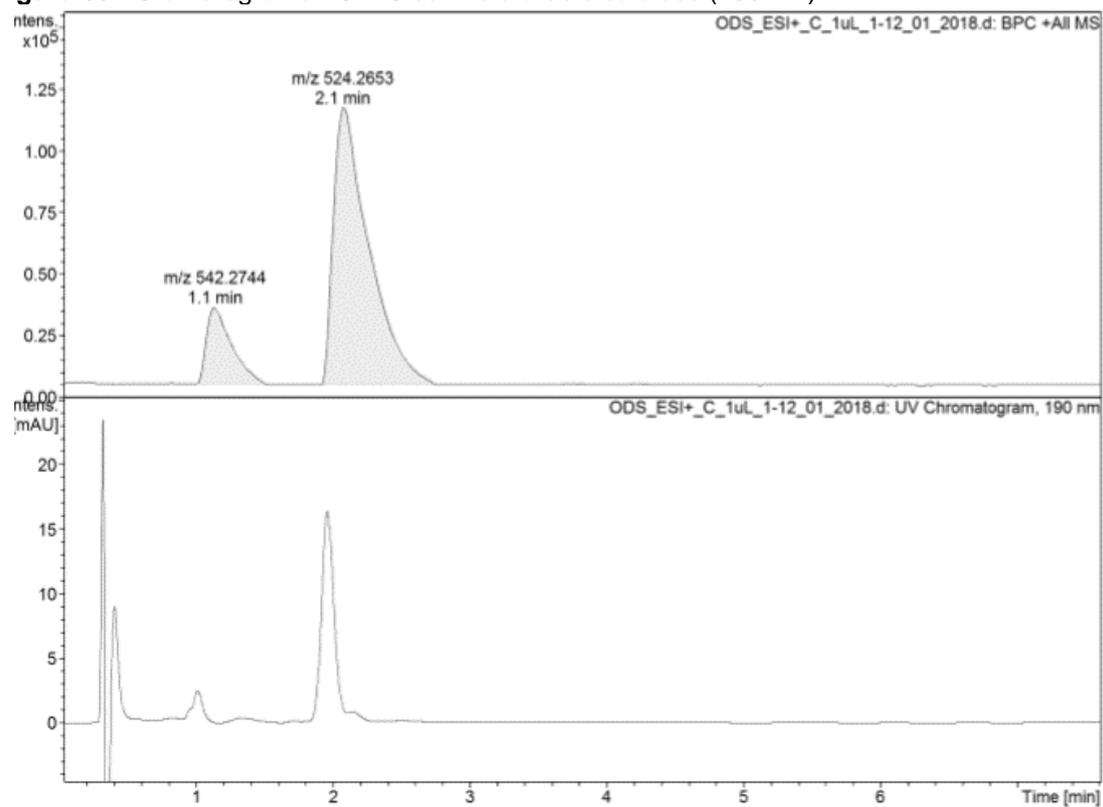
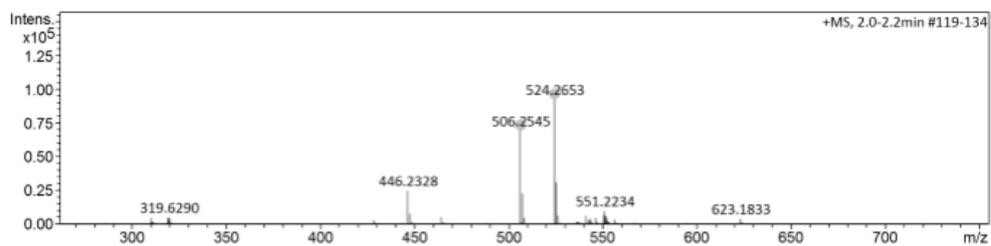
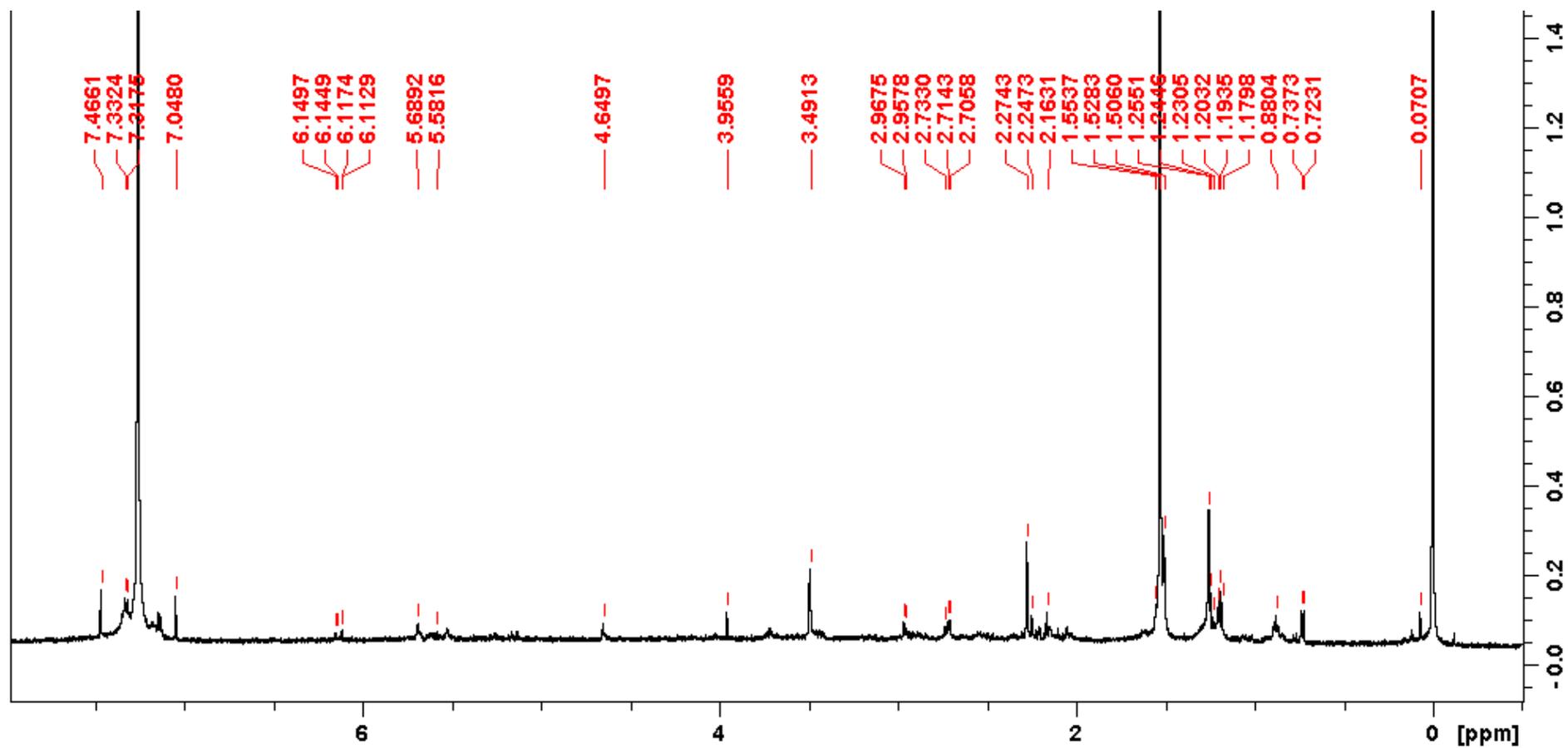
Figura 63 - Cromatograma LC-MS da mistura de alcaloides (190 nm).**Figura 64** - Espectro de massas de alta resolução do íon mais abundante da mistura de alcaloides.

Figura 65 - Espectro de RMN de ^1H da mistura de alcaloides em CDCl_3 (300 MHz).

5.11. Parte 3: Atividade Biológica

5.11.1. Ensaio Antibacteriano – Citocalasina D

A citocalasina D não apresentou atividade antibacteriana contra as bactérias sensíveis aos extratos brutos de *Xylaria* sp. (*S. aureus*, *E. cloacae*, *C. freundii* e *S. epidermidis*).

Apesar de não terem sido observadas atividades antibacterianas contra os micro-organismos testados neste estudo, a citocalasina D apresenta outras atividades biológicas como descrito por Zanardi (2010) que observou forte atividade anticolinesterásica da citocalasina D isolada do fungo *Acremonium* sp., endófito de *Senna spectabilis*.

O potencial antifúngico da substância já foi relatado contra os fitopatógenos: *Cladosporium cladosporioides*, *C. spahaerospermum* (10 e 25 µg/mL, respectivamente) (CAFÊU et al., 2005), *Botrytis cinerea* (25 µg/disco) (BETINA; MICEKOVA; NEMEC, 1972) e *Colletotrichum gloeosporioides* (CMI 2,46 µM/mL) (ELIAS et al., 2018). A substância também apresenta baixa atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*, com concentração inibitória mínima de 900,7 µM (PONGCHAROEN et al., 2007).

5.11.2. Ensaio de Citotoxicidade contra *A. salina* – citocalasina D

A CL₅₀ da citocalasina D contra *A. salina* foi 31,4 µg/mL, os demais valores deste ensaio estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25 - Resultados do ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* da citocalasina D.

Substância µg/mL	%	CL ₅₀	Intervalo de Confiança 95%
100	93		
50	80		
25	27	31,4 µg/mL	40, 2 – 22,5 µg/mL
12,5	33		
6,25	23		
3,12	17		
1,56	13		

% - Média do Percentual de Mortos.

CL₅₀ – concentração letal para matar 50% das larvas de *Artemia salina*

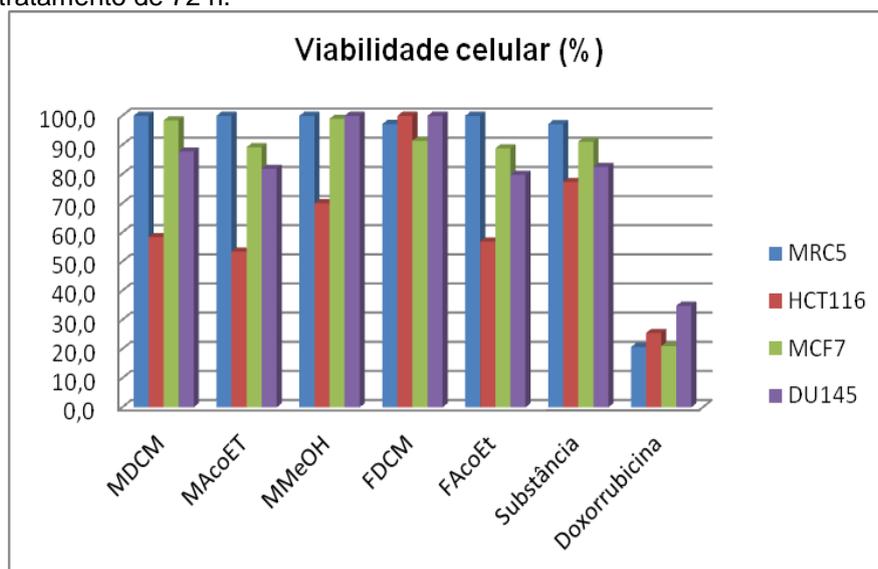
A atividade tóxica da citocalasina D corrobora com dados da literatura sobre diversas citocalasinas como por exemplo, a citocalasina E que apresentou toxicidade para as artemias com CL_{50} de 2,79 μ M (ZHANG et al., 2014). A substância 10-fenil-[11]-citocalasina e três derivados (provenientes do endófito *Microporellus subsessillis*, Polyporaceae) apresentaram toxicidade de 72, 78, 64 e 63% na concentração de 10 ppm (KURNIA; AKIYAMA; HAYASHI, 2007).

As citocalasinas B e H provenientes de *Aspergillus* sp. (endófito de *Bauhinia guianensis*, Fabaceae) e um derivado da citocalasina B (7,20-diacetil-citocalasina B) foram altamente tóxicas, com CL_{50} de 24,9, 69,1 e 22,8 μ g/mL, respectivamente (FEITOSA et al., 2016). Bottalsco e colaboradores (1990) avaliaram a toxicidade de sete citocalasinas: A, B, C, D, E, H e J. Eles observaram uma maior toxicidade na citocalasina E, que mesmo na concentração de 0,2 μ g/mL matou 35 % das larvas. Na concentração de 2 μ g/mL a citocalasina A matou 86% e as citocalasinas C, D, E, H e J mataram 100% dos microcrustáceos. A citocalasina B foi ativa apenas na concentração de 20 μ g/mL levando à morte apenas 27% das artemias.

5.11.3. Ensaio Antitumoral

Os resultados obtidos no ensaio antitumoral realizados com os extratos do segundo cultivo submerso do fungo SB43 (*Xylaria* sp.) e com a substância 1 (citocalasina D) isolada estão demonstrados na Figura 66.

Figura 66 - Efeito citotóxico das amostras em diferentes linhagens celulares utilizando no tempo de tratamento de 72 h.



MRC5: fibroblato humano, HCT116: carcinoma coloretal, MCF7: adenocarcinoma de mama, DU145: carcinoma de próstata. Controle positivo: Doxorrubicina 10 μ M. MDCM – extrato micélio-diclorometano, MAcoEt – extrato micélio-acetato de etila, MMeOH– extrato micélio-metanol, FDCM – fase-diclorometano, FAcoEt – fase-acetato de etila.

As maiores atividades citotóxicas podem ser observadas frente à linhagem celular HCT 116 (carcinoma de coloretal). Dentre elas, a menor taxa de viabilidade celular foi do extrato $_{M}AcOEt$ (53,5%), seguido de $_{F}AcOEt$ (56,9%) e $_{M}DCM$ (58,4%). Apesar dos extratos terem apresentado moderada e alta toxicidade no teste de *Artemia salina* (item 5.8.1), a atividade antitumoral não foi tão forte nas linhagens testadas. Isso pode ter ocorrido pois a correlação do teste de toxicidade com o microcrustáceo e células tumorais nem sempre é observada nos estudos, além disso, existe uma variedade de linhagens de células tumorais que podem ser utilizadas e outros resultados podem ser obtidos (HARADA, 2009; OLIVEIRA, 2013).

Os resultados observados nas linhagens MCF7 e DU145 apresentam uma ausência ou baixa citotoxicidade das amostras. Observa-se que nas duas linhagens os menores valores de viabilidade celular foram do extrato $_{F}AcOEt$ (88,82 e 79,78%). Os valores observados em MC7 são diferentes dos relatados por Rosa e colaboradores (2010), que isolou um fungo com similaridade ao nosso. Eles demonstraram que o fungo UFMG CB_899 teve atividade de 66% contra a linhagem MCF-7. Isto pode ter sido ocasionado pelas diferenças nas

condições de cultivo, o que acarretaria na diversificação e quantidade de metabólitos produzidos, e pela diferente metodologia de extração.

Na literatura encontram-se outros trabalhos que apresentam espécies do gênero *Xylaria* sp. com atividade citotóxica para células de linhagens tumorais. *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae), também conhecida como noni, é popularmente utilizada para o tratamento de feridas, hipertensão, diabetes, artrites e câncer. Ao investigar uma possível associação da atividade anticâncer com a presença e o metabolismo dos endófitos, Wu e colaboradores (2015) isolaram das folhas desta planta três fungos endofíticos com atividade contra linhagens tumorais (LU-1, câncer de pulmão; MCF-7, câncer de mama e PC-3, câncer de próstata). Os fungos foram identificados como: *Stemphylium solani* (IC₅₀: 4, 2 e 5 µg/mL), *Leptosphaerulina australis* (IC₅₀: 4, 0,6 e 0,4 µg/mL) e *Xylaria* sp. (IC₅₀ 5, 10 e 10 µg/mL).

Duas novas substâncias isoladas a partir do cultivo do fungo endofítico *Xylaria* sp. apresentam atividade citotóxica contra células Vero (rim de macaco *Cercopithecus aethiops*) com IC₅₀ de 1,35 e > 184 µM, além de atividade antimalárica contra o *Plasmodium falciparum* com IC₅₀ de 1,84 e 6,68 µM (TANSUWAN et al., 2007). Quatro citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp. endofítico de *Piper aduncum* foram fortemente ativas contra células HeLa – tumor de cérvix humano (IC₅₀ 1,0; 2,0; 1,0 e 3,0 µMol/L) e apresentaram baixa citotoxicidade contra as células sadias CHO (ovário de hamster chinês), demonstrando uma importante seletividade para as células tumorais (SILVA et al., 2010).

Neste ensaio a citocalasina D apresentou maior citotoxicidade frente a HCT116 (77,28%), entretanto essa taxa foi menor que a observada na maioria dos extratos, exceto em FDCM (100%). Os resultados da substância com relação às linhagens MCF7 e DU145 foram de 91,2 e 82,4%, respectivamente.

A ação da citocalasina D na célula motiva estudos que façam uma abordagem do potencial da substância para o tratamento do câncer tanto individualmente quanto como agente potencializador das drogas utilizadas. Como exemplo, observa-se a atuação da substância na inibição da proliferação da linhagem celular do carcinoma colorretal (CT26), na indução da apoptose celular e supressão da angiogênese tumoral. Além dos testes *in vitro*,

resultados satisfatórios foram alcançados nos ensaios *in vivo* onde a substância diminuiu o tamanho do tumor nos camundongos tratados com a dose 50 mg/Kg. Entretanto, apesar de se tratar de uma substância promissora para o tratamento de tumores é imprescindível atrelar à essas pesquisas estudos que verifiquem os efeitos colaterais nas células sadias (HUANG et al., 2012).

O resultado apresentado nesta pesquisa vem somar com as informações sobre a citotoxicidade da citocalasina D. Cabe ressaltar a ausência de citotoxicidade na linhagem MRC-5 (não tumoral), resultado que pode ser útil em relação à segurança das amostras (até a concentração testada nesse ensaio) em possíveis correlações com outras atividades biológicas.

Outro estudo com uma aplicação satisfatória da citocalasina D foi realizado a partir de extratos de *Xylaria* sp., isolada do sedimento marinho do sul da China. Observou-se atividade contra *Artemia salina* (73,3% na concentração de 100 µg/mL) e contra as linhagens celulares MCF-7 (câncer de mama), SF-268 (glioblastoma) e NCI-H460 (câncer de pulmão) (74; 61,9 e 70%, respectivamente, na concentração de 100 µg/mL). Esses resultados impulsionaram o fracionamento do extrato que resultou no isolamento de seis citocalasinas, duas delas inéditas e uma identificada como citocalasina D. Essa substância apresentou no teste de citotoxicidade IC₅₀ de 18,6; 51,4 e 14,4 µM contra as células MCF-7, SF-268e NCI-H460, respectivamente (CHEN et al., 2011). Atividade citotóxica também foi observada contra a linhagem celular KB (carcinoma epidermoide de nasofaringe humana) com IC₅₀ de 3,99 µg/mL (KLAIKLAY et al., 2012).

6. CONCLUSÃO

A partir desta pesquisa pode-se concluir que:

A planta *Duroia macrophylla* possui um alto índice de colonização fúngica (94%).

Os ensaios biológicos dos extratos dos endófitos revelaram que 18 dos 21 fungos isolados apresentaram atividade antibacteriana contra pelo menos uma bactéria testada, exceto contra *E. coli*. De acordo com o teste de citotoxicidade à *Artemia salina* observou-se que dois fungos endofíticos apresentaram atividade moderada (CL_{50} 109,46 e 605,52 $\mu\text{g/mL}$).

Os fungos estudados apresentaram uma diversidade metabólica composta por substâncias fenólicas, alcaloides, terpenos e açúcares. Quatro fungos apresentaram indícios de produção de alcaloides, dentre esses o endófito *Xylaria* sp., que foi primeira vez relatado em *D. macrophylla*.

Dentre os extratos do segundo cultivo de *Xylaria* sp. observou-se atividades antibacterianas contra *E. cloacae*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. freundii*. Os extratos também foram classificados como muito ativos ou moderadamente ativos contra *A. salina* (CL_{50} <50, 203,85 e 426,59 $\mu\text{g/mL}$).

O estudo químico dos extratos de *Xylaria* sp. resultou no isolamento de da citocalasina D e de outras duas substâncias que estão em fase de elucidação estrutural. Além disso, o fungo demonstrou-se um grande produtor de citocalasina D.

A citocalasina D apresentou-se fortemente citotóxica contra *A. salina* (31,4 $\mu\text{g/mL}$) e não demonstrou atividades antibacteriana e antioxidante.

Os extratos de *Xylaria* sp. e a citocalasina D apresentaram atividade antitumoral apenas contra a linhagem celular de carcinoma coloretal HCT 116 (53,5, 56,9, 58,4 e 77,28% de viabilidade celular). A ausência de citotoxicidade contra as células sadias (MRC-5) é importante informação para a uma possível aplicação da atividade biológica desse fungo.

Portanto, a presente pesquisa demonstrou a diversidade química e o potencial de atividades biológicas dos fungos endofíticos de *D. macrophylla* e de acordo com os resultados apresentados, eles podem ser uma fonte de substâncias de interesse biotecnológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, n. 2, p. 211–224, 1994.
- ALDRIDGE, D. C.; ARMSTRONG, J. J.; SPEAKE, R. N.; TURNER, W. B. The cytochalasins, a new class of biologically active mould metabolites. **Chemical Communications (London)**, n. 1, 1967.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224–1229, 2008.
- AMARAL, L. S.; RODRIGUES-FILHO, E.; SANTO, C. A.; ABREU, L. M.; PFENNING, L. H. An HPLC evaluation of cytochalasin D biosynthesis by *Xylaria arbuscula* cultivated in different media. **Natural Product Communications**, v. 9, n. 9, p. 1279–1282, 2014.
- AMARAL, L. S. **Análise de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos associados à *Cupressus lusitanica***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, 2009.
- AMARAL, L. S.; FILL, T. P.; SANTOS, L. F. A.; RODRIGUES-FILHO, E. Biosynthesis and mass spectral fragmentation pathways of ¹³C and ¹⁵N labeled cytochalasin D produced by *Xylaria arbuscula*. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 4, p. 239–247, 2017.
- AMBROSE, C.; CHRISTAPHER, V.; SUBHASH, B. J. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. **Pharmacogn Review**, v. 7, n. 13, p. 11–16, 2013.
- ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; McLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 3, p. 107–111, 1991.
- ANDRIOLI, W. J.; SILVA, T. M.; SILVA, V. B.; DAMÁSIO, A. R. L.; MALLER, A.; CONTI, R.; JORGE, J. A.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, C. H. T. P.; PUPO, M. T.; POLIZELI, M. L. T. M.; BASTOS, JAIRO K. The fungal metabolite eugenitin as additive for *Aspergillus niveus* glucoamylase activation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 74, n. 3–4, p. 156–161, 2012.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA [ANVISA]. **Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM: Resistência Microbiana em IPCSL relacionada a CVC**, Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- AQUINO, R.; TOMMASI, N.; TAPIA, M.; LAURO, M. R.; RASTRELLI, L. New 3-

methoxyflavones, an iridoid lactone, and a flavonol from *Duroia hirsuta*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 8, p. 560–562, 1999.

ARAUJO, A. R.; HABECK, T. R.; GUBIANI, J. R.; SILVA, D. S.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S. Phenolics compounds produced by *Camarops* sp. an endophytic fungus from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). **Planta Médica**, v. 79, n. 13, p. 1182, 2013.

ARO, A. O.; DZOYEM, J. P.; HLOKWE, T. M.; MADOROBA, E.; ELOFF, J. N.; MCGAW, L. J. Some South African Rubiaceae Tree Leaf Extracts Have Antimycobacterial Activity Against Pathogenic and Non-pathogenic *Mycobacterium* Species. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 7, p. 1004–1010, 2015.

AZEVEDO, J. L. Microrganismos Endofíticos. In: AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. p. 117–137.

AZEVEDO, J. L.; JR. MACCHERONI, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 40–65, 2000.

BARNES, C. J.; MALDONADO, C.; FROSLEV, T. G.; ANTONELLI, A.; RONSTED, N. Unexpectedly high beta-diversity of root-associated fungal communities in the Bolivian Andes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–13, 2016.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BATISTA, J. C.; SANTIN, S. M. O.; SCHUQUEL, I. T. A.; ARRUDA, L. L. M.; BERSANI-AMADO, C. A.; OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; SILVA, C. C. Constituintes químicos e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória das raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 4, p. 638–642, 2014.

BETINA, V.; MICEKOVA, D.; NEMEC, P. Antimicrobial properties of cytochalasins and their alteration of fungal morphology. **Microbiology**, v. 71, n. 2, p. 343–349, 1972.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123–130, 1999.

BONNIER, F.; KEATING, M. E.; WRÓBEL, T. P.; MAJZNER, K.; BARANSKA, M.; GARCIA-MUNOZ; BLANCO, A.; BYRNE, H. J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 1, p. 124–131, 2015.

BOTTALSCO, A.; CAPASSO, R.; EVIDENTE, A.; RANDAZZO, G.; VURRO, M. Cytochalasins: Structure-activity relationships. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 93–96, 1990.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRANDÃO, H. N. DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

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**, v. 28, n. 6, p. 991–995, 2005.

CAÌ, Y.; POSTNIKOVA, E. N.; BERNBAUM, J. G.; YÚ, S.; MAZUR, S.; DEIULIIS, N. M.; RADOSHITZKY, S. R.; LACKEMEYER, M. G.; MCCLUSKEY, A.; ROBINSON, P. J. HAUCKE, V.; WAHL-JENSEN, V.; BAILEY, A. L.; LAUCK, M.; FRIEDRICH, T. C.; O'CONNOR, D. H.; GOLDBERG, T. L.; JAHRLING, P. B.; KUHN, J. H. Simian hemorrhagic fever virus cell entry is dependent on CD163 and uses a clathrin-mediated endocytosis-like pathway. **Journal of Virology**, v. 89, n. 1, p. 844–856, 2015.

CALVO, A. M.; WILSON, R. A.; BOK, J. W.; KELLER, N. P. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 447–459, 2002.

CAMPOS, F. F.; JUNIOR SALES, P. A.; ROMANHA, A. J.; ARAÚJO, M. S. S.; SIQUEIRA, E. P.; RESENDE, J. M.; ALVES, T. M. A.; MARTINS-FILHO, O. A.; SANTOS, V. L.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L.; COTA, B. B. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 1–10, 2015.

CAMPOS, M. T. V.; BRITO, J. M. Rubiaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. DA S. et al. (Eds.). **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 1999. p. 625–626.

CANLI, K.; AKATA, I.; ALTUNER, E. M. In vitro antimicrobial activity screening of *Xylaria hypoxylon*. **African Journal of Traditional Complementary And Alternative Medicines**, v. 13, n. 4, p. 42–46, 2016.

CAO, S.; CRYAN, L.; HABESHIAN, K. A.; MURILLO, C.; TAMAYO-CASTILLO, G.; ROGERS, M. S.; CLARDY, J. Phenolic compounds as antiangiogenic CMG2 inhibitors from Costa Rican endophytic fungi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 18, p. 5885–5888, 2012.

CARBONEZI, C. A.; HAMERSKI, L.; JR FLAUSINO, O. A.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Determinação por RMN das configurações relativas e conformações de alcalóides oxindólicos isolados de *Uncaria guianensis*. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 878–881, 2004.

CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2–9, 1988.

CASELLA, J. F.; FLANAGAN, M. D.; LIN, S. Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. **Nature**, v. 293, n. 5830, p. 302–305, 1981.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Endophytic Fungi: An Unexplored and Sustainable Source of New and Bioactive Natural Products. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 421–437, 2013.

CHEN, Z.; HUANG, H.; CHEN, Y.; WANG, Z.; MA, J.; WANG, B.; ZHANG, W.; ZHANG, C.; JU, J. New cytochalasins from the marine-derived fungus *Xylaria* sp. SCSIO 156. **Helvetica Chimica Acta**, v. 94, n. 9, p. 1671–1676, 2011.

CHOMCHEON, P. CHOMCHEON, P.; WIYAKRUTTA, S.; AREE, T.; SRIUBOLMAS, N.; NGAMROJANAVANICH, N.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Curvularides A-E: Antifungal hybrid peptide-polyketides from the endophytic fungus *Curvularia geniculata*. **Chemistry - A European Journal**, v. 16, n. 36, p. 11178–11185, 2010.

CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 3, p. 113–118, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE [CLSI]. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests - approved standard - M44-A**, v. 24, n. 15, 2004.

COLE, R. J.; COX, R. H. The Cytochalasins. In: COLE, R. J.; COX, R. H. (Eds.). **Handbook of Toxic Fungal Metabolites**. Academic Press, 1981. p. 264–343.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. 7a. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. LOU; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 183–205, 2001.

CRAGG, G. M.; KATZ, F.; NEWMAN, D. J. The impact of the United Nations Convention on Biological Diversity on natural products research. **Natural Products Reports**, v. 29, p. 1407–1423, 2012.

CUMMINGS, N. J. CUMMINGS, N. J.; AMBROSE, A.; BRAITHWAITE, M.; BISSETT, J.; ROSLAN, H. A.; ABDULLAH, J.; STEWART, A.; AGBAYANI, F. V.; STEYAERT, J.; HILL, R. A. Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian Borneo. **Mycological Progress**, v. 15, n. 5, 2016.

DAVID, J. P.; SILVA, E. S.; MOURA, D. L.; GUEDES, M. L. S.; ASSUNÇÃO, R. J.; DAVID, J. M. Lignan e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730–733, 2001.

DE BARY, A. **Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten**. Oxford, 1886, 522 p.

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: An overview about the current status and future challenges. **Rodriguesia**, v. 63, n. 1, p. 101–128, 2012.

DEMAIN, A. L. Induction of microbial secondary metabolism. **International Microbiology**, v. 1, p. 259–264, 1998.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2a. ed. London: West Sussex John Wiley & Sons, 2002. v. 5.

DHANKHAR, S.; DHANKHAR, S.; YADAV, J. P. Investigations towards new antidiabetic drugs from fungal endophytes associated with *Salvadora oleoides* Decne. **Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 4, p. 624–632, 2013.

DOMBROWSKI, A. W.; BILLS, G. F.; SABNIS, G.; KROUPAL, L. R.; MEYER, R.; ONDEYKA, J. G.; GIACOBBER, R. A.; MONAGHAN, R. L.; LINGHAM, R. B. L-696,474, A novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease I. The producing organism and its fermentation. **The Journal of Antibiotics**, v. 45, n. 5, p. 671–678, 1992.

DONG, L. H.; FAN, S-W.; LING, Q-Z.; HUANG, B-B.; WEI, Z-J. Identification of huperzine A-producing endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 1011–1017, 2014.

DUARTE, A. F. S.; HIROTA, B. C. K.; OLIVEIRA, V. B.; CAMPOS, R.; MURAKAMI, M. D.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Scthdl. (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 4, p. 607–614, 2014.

DUMITRASCU, M. *Artemia salina*. **Balneo Research Journal**, v. 2, n. 4, p. 119–122, 2011.

EDWARDS, R. L.; MAITLAND, D. J.; WHALLEY, A. J. S. Metabolites of the higher

fungi. Part 24. Cytochalasin N, O, P, Q, and R. New cytochalasins from the fungus *Hypoxylon terricola* Mill. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 57–65, 1989.

ELIAS, L. M.; FORTKAMP, D.; SARTORI, S. B.; FERREIRA, M. C.; GOMES, L. H.; AZEVEDO, J. L.; MONTOYA, Q. V.; RODRIGUES, A.; FERREIRA, A. G.; LIRA, S. P. The potential of compounds isolated from *Xylaria* spp. as antifungal agents against anthracnose. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 4–11, 2018.

ELLIOTT, J. A.; WINN, W. C. Treatment of alveolar macrophages with cytochalasin D inhibits uptake and subsequent growth of *Legionella pneumophila*. **Infection and Immunity**, v. 51, n. 1, p. 31–36, 1986.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria a sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Médica**, v. 64, p. 711–713, 1998.

ESCOBAR, L. M.; ALFONSO, P. A. R.; ARISTIZÁBAL, F. A. G. Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 11, n. 2, p. 49–56, 2009.

ESPADA, A.; Rivera-Sagredo, A.; De la Fuente, J. M.; Hueso-Rodriguez, J. A.; Elson, S. W. New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*. **Tetrahedron**, v. 53, n. 18, p. 6485–6492, 1997.

FABRI, R. L.; COIMBRA, E. S.; ALMEIDA, A. C.; SIQUEIRA, E. P.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; SCIO, E. Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potent source of bioactive compounds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 4, p. 1073–1080, 2012.

FEITOSA, A. O.; RAMOS, G. C.; BITENCOURT, H. R.; SIQUEIRA, J. E. S.; MARINHO, P. S. B.; BARISON, A.; OCAMPOS, F. M. M. Lethality of cytochalasin B and other compounds isolated from fungus *Aspergillus* sp. (Trichocomaceae) endophyte of *Bauhinia guianensis* (Fabaceae). **Revista Argentina de Microbiología**, v. 48, n. 3, p. 259–263, 2016.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; ERVIK, M.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. **Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

FERNANDES, M. D. R. V.; SILVA, T. A. C.; PFENNING, L. H.; COSTA-NETO, C. M.; HEINRICH, T. A.; ALENCAR, S. M.; LIMA, M. A.; IKEGAKI, M. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 677–685, 2009.

FILHO, C. R. M. DA S.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; SILVA, T. G.; SILVA, T. M. S.; RIBEIRO, A. P. L. Avaliação da bioatividade dos extratos de cúrcuma (*Curcuma longa* L., Zingiberaceae) em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 919–923, 2009.

FLIEGER, M.; WURST, M.; SHELBY, M. Ergot Alkaloids - Sources, Structures and Analytical Methods. **Folia Microbiologica**, v. 42, n. 1, p. 3–30, 1997.

FONSECA, C. N.; LISBOA, P. L.; URBINATI, C. V. A xiloteca (coleção Walter A. Egler) do Museu Paraense Emílio Goeldi. **Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 1, n. 1, p. 65–140, 2005.

FORCINA, G. C.; CASTRO, A.; BOKESCH, H. R.; SPAKOWICZ, D. J.; LEGASPI, M.

E.; KUCERA, K.; VILLOTA, S.; NARVÁEZ-TRUJILLO, A.; McMAHON, J. B.; GUSTAFSON, K. R.; STROBEL, S. Stelliosphaerols A and B, sesquiterpene-polyol conjugates from an ecuadorian fungal endophyte. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 12, p. 3005–3010, 2015.

FREDERICKSON, M. E.; GREENE, M. J.; GORDON, D. M. Ecology: “Devil’s gardens” bedevilled by ants. **Nature**, v. 437, n. 7058, p. 495–496, 2005.

GANLEY, R. J.; BRUNSFELD, S. J.; NEWCOMBE, G. A community of unknown, endophytic fungi in western white pine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 27, p. 10107–10112, 2004.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RHUSAM, M.; BRIDSON, D. M.; DAVIS, A. P. **World checklist & bibliography of Rubiaceae**. Disponível em: <<http://www.kew.org/wcsp/rubiaceae/>>. Acesso em: 8 jul. 2016.

GUBIANI, J. **Prospecção química e biológica do fungo endofítico *Camarops* sp. isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, 2011.

GUERRE, P. Ergot alkaloids produced by endophytic fungi of the genus *Epichloë*. **Toxins**, v. 7, n. 3, p. 773–790, 2015.

GUNASEKARAN, S.; SATHIAVELU, M.; ARUNACHALAM, S. In vitro antioxidant and antibacterial activity of endophytic fungi isolated from *Mussaenda luteola*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 8, p. 234–238, 2017.

HANNA, S. A. **Interação com constituintes da matriz extracelular e o envolvimento do citoesqueleto na adesão e invasão de *Paracoccidioides brasiliensis* às células epiteliais**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 209p., 2001.

HARADA, T. N. **Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 92p. 2009.

HARWIG, J.; SCOTT, P. M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 1011–6, 1971.

HU, X.; LI, W.; YUAN, M.; LI, C.; LIU, S.; JIANG, C.; WU, Y.; CAI, K.; LIU, Y. Homoharringtonine production by endophytic fungus isolated from *Cephalotaxus hainanensis* Li. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 1–9, 2016.

HUANG, F. Y. LI, Y. N.; MEI, W. L.; DAI, H. F.; ZHOU, P.; TAN, G. H. Cytochalasin D, a tropical fungal metabolite, inhibits CT26 tumor growth and angiogenesis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 3, p. 169–174, 2012.

HUANG, J. X.; ZHANG, J.; ZHANG, X-R.; ZHANG, K.; ZHANG, X.; HE, X-R. *Mucor fragilis* as a novel source of the key pharmaceutical agents podophyllotoxin and kaempferol. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 10, p. 1237–1243, 2014.

HUNG, M. TSAI, C. C.; HSU, T. H.; LIANG, Z. C.; LIN, F. Y.; CHANG, S. L.; HO, W. J.; HSIEH, C. W. Biological activities of the polysaccharides produced from different sources of *Xylaria nigripes* (Ascomycetes), a chinese medicinal fungus. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 17, n. 2, p. 141–150, 2015.

HUSSAIN, H. et al. Microsphaerol and Seimatorone : Two New Compounds Isolated from the Endophytic Fungi, *Microsphaeropsis* sp. and *Seimatosporium* sp. **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, p. 289–294, 2015.

ILYAS, M.; MUHAMMAD; KANTI, A.; JAMAL, Y.; HERTINA; AGUSTA, A. Biodiversity of endophytic fungi associated with *Uncaria gambier* Roxb. (Rubiaceae) from west sumatra. **Biodiversitas**, v. 10, n. 1, p. 23–28, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR [INCA]. **Estimativa 2016 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 126 p. 2015.

JIAO, R. H.; XU, S.; LIU, J. Y.; GE, H. M.; DING, H.; XU, C.; ZHU, H. L.; TAN, R. X. Chaetominine, a cytotoxic alkaloid produced by endophytic *Chaetomium* sp. IFB-E015. **Organic Letters**, v. 8, n. 25, p. 5709–5712, 2006.

KAISER, S.; CARVALHO, A. R.; PITTOL, V.; DIETRICH, F.; MANICA, F.; MACHADO, M. M.; OLIVEIRA, F. F. S.; BATTASTINI, A. M. O.; ORTEGA, G. G. Genotoxicity and cytotoxicity of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* (cat's claw): Chemotype relevance. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 189, p. 90–98, 2016.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937–947, 2005.

KHAN, A. R.; ULLAH, I.; WAQAS, M.; SHAHZAD, HOUNG, S-J.; PARK, G-S.; JUNG, B K.; LEE, I-J.; SHIN, J-H. Plant growth-promoting potential of endophytic fungi isolated from *Solanum nigrum* leaves. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1461–1466, 2015.

KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; THOMPSON, K. D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v. 67, n. 2, p. 107–119, 2005.

KLAIKLAY, S.; RUKACHAISIRIKUL, V.; SUKPODMA, Y.; PHONGPAICHIT, S.; BUATONG, J.; BUSSABAN, B. Metabolites from the mangrove-derived fungus *Xylaria cubensis* PSU-MA34. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 7, p. 1127–1131, 2012.

KUMAR, A.; PATIL, D.; RAJAMOHANAN, P. R.; AHAMAD, A. Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–11, 2013.

KURNIA, D.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. 10-Phenyl-[11]-cytochalasans from Indonesian mushroom *Microporellus subsessilis*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 697–702, 2007.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792–798, 27 jul. 2012.

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Rethinking production of Taxol® (paclitaxel) using endophyte biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 304–311, jun. 2014.

LEYTE-LUGO, M.; FIGUEROA, M.; GONZÁLEZ, M. C.; GLENN, A. E.; GONZÁLEZ-ANDRADE, M.; MATA, R. Metabolites from the endophytic fungus *Sporormiella minimoides* isolated from *Hintonia latiflora*. **Phytochemistry**, v. 96, p. 273–278, 2013.

LI, Y.-L.; XIN, X-M.; CHANG, Z-Y.; SHI, R-J.; MIAO, Z-M.; DING, J.; HAO, G-P. The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* Bge.f. alba are a potential source of natural antioxidants. **Botanical Studies**, v. 56, n. 1, p. 5, 1 abr. 2015.

LIU, D.; LI, X-M.; LI, C-S.; WANG, B-G. Sesterterpenes and 2H -Pyran-2-ones (=α-Pyrones) from the mangrove-derived endophytic fungus *Fusarium proliferatum* MA-84. **Helvetica Chimica Acta**, v. 96, p. 437–444, 2013.

- LIU, X. DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; YAN, G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 548–554, 2007.
- LOPEZ, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2–3, p. 189–196, 2001.
- MACIA-VICENTE, J. G. JANSSON, H-B.; MENDGEN, K.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. tritici. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 600–609, 2008.
- MADY, M. S.; MOHYELDIN, M. M.; EBRAHIM, H. Y.; ELSAYED, H. E.; HOUSSEN, W. E.; HAGGAG, E. G.; SOLIMAN, R. F.; EL SAYED, K. A. The indole alkaloid meleagrins, from the olive tree endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, as a novel lead for the control of c-Met-dependent breast cancer proliferation, migration and invasion. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 113–122, 2016.
- MAEHARA, S.; SIMANJUNTAK, P.; OHASHI, K.; SHIBUYA, H. Composition of endophytic fungi living in *Cinchona ledgeriana* (Rubiaceae). **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 2, p. 227–230, 2010.
- MALIK, V. S. Microbial secondary metabolism. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 68–72, 1980.
- MARCON, E. L. **Fungos endofíticos de *Piper peltatum* e *Peperomia pellucida*: caracterização, metabólitos secundários e atividades biológicas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas, 117p. 2013.
- MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, 2017.
- MARTINS, D.; CARRION, L. L.; RAMOS, D. F.; SALOMÉ, K. S.; SILVA, P. E. A.; BARISON, A.; NUNEZ, C. V. Triterpenes and the antimycobacterial activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–7, 2013.
- MARTINS, D. **Estudo químico de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas, 231 p. 2014.
- MARTINS, D.; FACHIN-ESPINAR, M. T.; OLIVEIRA, T. A.; LIMA, K. C. S.; CAVALCANTI, R. M.; TELES, B. R.; NUNEZ, C. V. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 6, p. 158–171, 2014.
- MARTINS, D.; NUNEZ, C. V. Secondary metabolites from Rubiaceae species. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13422–13495, 2015.
- MEI, W-L.; ZHENG, B.; ZHAO, Y-X; ZHONG, H-M.; CHEN, X-L. W.; ZENG, Y-B.; DONG, W-H.; HUANG, J-L.; PROKSCH, P.; DAI, H. F. Meroterpenes from endophytic fungus A1 of mangrove plant *Scyphiphora hydrophyllacea*. **Marine Drugs**, v. 10, n. 9, p. 1993–2001, 2012.
- MESQUITA, D. W. O.; MESQUITA, A. S. S.; CURSINO, L. M. C.; SOUZA, E. S.; OLIVEIRA, A. C.; PINHEIRO, C. C. S.; NOVAES, J. A. P.; OLIVEIRA, J. A. A.; NUNEZ, C. N. Atividades biológicas de espécies amazônicas de Rubiaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 604–613, 2015.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31–34, 1982.

MEYER, J. M.; REZENDE, F. M.; SOARES, S. A.; TOMBA, A. C. B. Metabolismo Secundário. In: **Botânica no Inverno 2013**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2013, 202 p.

MOHANA KUMARA, P.; ZUEHLKE, S.; PRITI, V.; RAMESHA, B. T.; SHWETA, S.; RAVIKANTH, G.; VASUDEVA, R.; SANTHOSHKUMAR, T. R.; SPITELLER, M.; SHAANKER, R. U. *Fusarium proliferatum*, an endophytic fungus from *Dysoxylum binectariferum* Hook.f, produces rohitukine, a chromane alkaloid possessing anti-cancer activity. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 101, n. 2, p. 323–329, 2012.

MOURA, R. M. Relembrando Anton de Bary e sua obra fitopatológica. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 337–343, 2002.

NETO, P. A. D. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62–77, 2002.

NETO, P. A. D. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62–77, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.

NIÑO, J.; NARVÁEZ, D. M.; MOSQUERA, O. M.; CORREA, Y. M. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from Colombian biodiversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 566–570, 2006.

NUNEZ, C. V.; MARTINS, D.; RAMOS, D. F.; SILVA, P. E. A. **Uso de composto, método ex-vivo, processo e extrato purificado**. Patente: Privilégio de Inovação. Brasil. Número do registro: BR1020140308636, data de depósito: 09/12/2014. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2014.

NUNEZ, C. V.; ROUMY, V.; MESQUITA, D. W. O.; MESQUITA, A. S. S.; SAHPAZ, S.; BAILLEUL, F.; HENNEBELLE, T. Indole alkaloids from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Planta Médica**, v. 78, n. 11, p. 1209–1209, 2012.

NUNEZ, C.V.; SANTOS, P. A.; ROUMY, V.; HENNEBELLE, T.; SAHPAZ, S.; MESQUITA, A. S. S.; BAILLEUL, F. Raunitidine isolated from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Planta Médica**, v. 75, n. 09, p. 1037–1037, 2009.

NUNEZ, C. V.; VASCONCELLOS, M. C. **Composição farmacêutica antitumoral compreendendo alcaloide, processo para sua obtenção, e seu uso**. Patente: Privilégio de Inovação. Brasil. Número do registro: PI10201203380, data de depósito: 28/12/2012. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2012.

OHARA, M. T. **Aplicação do cloreto de trifeniltetrazólio no teste de limite microbiano em medicamentos e cosméticos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 220 p. 1992.

OKANE, I.; SRIKITIKULCHAI, P.; TABUCHI, Y.; SIVICHAI, S.; NAKAGIRI, A. Recognition and characterization of four Thai xylariaceous fungi inhabiting various tropical foliages as endophytes by DNA sequences and host plant preference. **Mycoscience**, v. 53, n. 2, p. 122–132, 2012.

OLIVEIRA, M. L.; BACCARO F. B; BRAGA-NETO, R.; MAGNUSSON, W. E. **Reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade**. Manaus: Áttema Design Editorial. 170 p. 2008.

OLIVEIRA, C. M.; SILVA, G. H.; REGASINI, L. O.; ZANARDI, L. M.; EVANGELISTA, A.

H.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Bioactive metabolites produced by *Penicillium* sp . 1 and sp . 2 , two endophytes associated with *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). **Zeitschrift fur Naturforschung C**, v. 64, n. 11-22, p. 824–830, 2009.

OLIVEIRA, C. M.; REGASINI, L. O.; SILVA, G. H.; PFENNING, L. H.; YOUNG, M. C. M.; BERLINK, R. G. S.; BOLSANI, V. S.; ARAUJO, A. R. Dihydroisocoumarins produced by *Xylaria* sp. and *Penicillium* sp., endophytic fungi associated with *Piper aduncum* and *Alibertia macrophylla*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 93–96, 2011.

OLIVEIRA, J. G. S. **Estudo da biodiversidade de fungos endofíticos, potencial citotóxico e antimicrobiano de *Duguetia flagellaris* Huber**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Amazonas, 84 p. 2013.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE; AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos**. Brasília. 58 p. 2006.

ORACHAIPUNLAP, K. SUWANNASAI, N.; WHALLEY, A. J. S.; PHOSRI, C. **Biological activities of endophytic *Xylaria* sp . isolated from tropical forest in Chaiyapoom Province, Thailand**. v. 3, p. 200–208, 2016.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: Challenges to public health in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 6, p. 995–1001, 2014.

PAGE, J. E.; MADRIÑÁN, S.; TOWERS, G. H. N. Identification of a plant growth inhibiting iridoid lactone from *Duroia hirsuta*, the allelopathic tree of the “Devil’s Garden”. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 50, n. 9, p. 840–842, 1994.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395–400, 2001.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag New York Inc. p. 179–197. 1991.

PITTAYAKHAJONWUT, P. SUVANNAKAD, R.; THIENHIRUN, S.; PRABPAI, S.; KONGSAEREE, P.; TANTICHAROEN, M. An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). **Tetrahedron Letters**, v. 46, n. 8, p. 1341–1344, 2005.

POMPILHO, W. M.; MARCONDES, H. C.; OLIVEIRA, T. T. Bioatividade de três espécies vegetais nativas da Floresta Atlântica brasileira frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 473–480, 2014.

PONGCHAROEN, W. RUKACHAISIRIKUL, V.; ISAKA, M.; SRIKLUNG, K. Cytotoxic metabolites from the wood-decayed fungus *Xylaria* sp. BCC 9653. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 11, p. 1647–1648, 2007.

PU, X. QU, X.; CHEN, F.; BAO, J.; ZHANG, G.; LUO, Y. Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: Isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 21, p. 9365–9375, 2013.

QUIGNARD, E. L. J.; POHLIT, A. M.; NUNOMURA, S. M.; PINTO, A. C. S.; SANTOS, E. V. M.; MORAIS, S. K. R.; ALECRIM, A. M.; PEDROSO, A. C. S.; CYRINO, B. R. B.;

MELO, C. S.; OLIVEIRA, L. C. P.; DON, L. C.; SILVA, L. F. R.; QUEIROZ, M. M. A.; HENRIQUE, M. C.; SANTOS, M.; PINTO, P. S.; SILVA, S. G. Screening of plants found in Amazonas State for lethality towards brine shrimp. **Acta Amazônica**, v. 33, n. 1, p. 93–104, 2003.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.

RATNAWEERA, P. B.; WILLIAMS, D. E.; SILVA, E. D.; RAVI, L. C.; DALISAY, D. S.; ANDERSEN, R. J.; DALISAY, D. S.; ANDERSEN, R. J. Helvolic acid, an antibacterial nortriterpenoid from a fungal endophyte, *Xylaria* sp. of orchid *Anoectochilus setaceus* endemic to Sri Lanka. **Mycology**, v. 5, n. 1, p. 23–28, 2014.

REFLORA. **Rubiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB38761>>. Acesso em: 7 jul. 2016.

REIS, L. P.; RUSCHEL, A. R.; COELHO, A. A.; LUZ, A. S.; MARTINS-DA-SILVA, R. C. V. Avaliação do potencial madeireiro na Floresta Nacional do Tapajós após 28 anos da exploração florestal. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 30, n. 64, p. 265–281, 2010.

RESQUE, O. R. **Vocabulário De Frutas Comestíveis Na Amazônia.** Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2007.

RIVERA-CHÁVEZ, J.; GONZÁLEZ-ANDRADE, M.; CARMEN GONZÁLEZ, M.; GLENN, A. E.; MATA, R. Thielavins A, J and K: A-Glucosidase inhibitors from MEXU 27095, an endophytic fungus from *Hintonia latiflora*. **Phytochemistry**, v. 94, p. 198–205, 2013.

ROBERTS, K. L.; MANICASSAMY, B.; LAMB, R. A. Influenza A Virus Uses Intercellular Connections To Spread to Neighboring Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 3, p. 1537–1549, 2015.

RODRIGUES, K.; RAMOS, D. F.; CARRION, L. L.; CURSONO, L. M. C.; JEFREYS, M. F.; PEDROZA, L. S.; OSÓRIO, M. I. C.; OLIVEIRA, J. L.; ANDRADE, J. I. A.; FERNANDES, C. C.; NUNEZ, C. V.; SILVA, P. E. A. Antifungal activity of Brazilian Amazon plantas extracts against some species of *Candida* spp. **International Journal of Phytopharmacology**, v. 5, n. 6, p. 445–453, 2014.

ROMÃO, R. J. DA C. T. P. **Cryopreservation of sheep embryos produced in vitro: the effect of protocols of lipid reduction.** Tese de Doutorado. Universidade de Évora, 2014.

ROSA, L. H. GONÇALVES, V. N.; CALIGIORNE, R. B.; ALVES, T. M. A.; RABELLO, A.SALES, P. A.; ROMANHA, A. J.; SOBRAL, M. E. G.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** (2010), v. 41, p. 420–430, 2010.

RUSSELL, J. R.; HUANG, J.; ANAND, P.; KUCERA, K.; SANDOVAL, A. G.; DANTZLER, K. W.; HICKMAN, D.; JEE, J.; KIMOVEC, F. M.; KOPPSTEIN, D.; MARKS, D. H.; MITTERMILLER, P. A.; NÚÑEZ, S. J.; SANTIAGO, M.; TOWNES, M. A.; VISHNEVETSKY, M.; WILLIAMS, N. E.; VARGAS, M. P. N.; BOULANGER, L.-A.; BASCOM-SLACK, C.; STROBEL, S. A. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6076–6084, 2011.

SÁ, P. G. S.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; FILHO, J. A. F.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.)

Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 561–566, 2012.

SAHU, N. P.; MAHATO, S. B. Determination of emetine and cephaline in Ipecac roots by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 238, n. 2, p. 525–529, 1982.

SANTOS, G. J. L.; PINHEIRO, D. C. S. N. Aspectos da terapia etnofarmacológica associados à atividade antitumoral. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 3, p. 494–509, 2016.

SANTOS, T. T. DOS; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 2, p. 199–212, 2011.

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 2, p. 645–654, 1991.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661–686, 2005.

SCOTT, P. M. Analysis of ergot alkaloids - A review. **Mycotoxin Research**, v. 23, n. 3, p. 113–121, 2007.

SEANG, W.; PUNYANITYA, S.; PITCHUANCHOM, S.; UDOMPUTTIMEKAKUL, P.; NUTASAEN, N.; BANJERDPONGCHAI, R.; WUDTIWAI, B.; POMPIMOM, W. Cytotoxic aporphine alkaloids from leaves and twigs of *Pseuduvaria trimera* (Craib). **Molecules**, v. 19, p. 8762–8772, 2014.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA [SIBBR]. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <<http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=biodiversidade>>. Acesso em: 8 jul. 2016.

SILVA, G. H.; OLIVEIRA, C. M.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R.; PFENNING, L. H.; YOUNG, M. C. M.; COSTA-NETO, C. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N. Citocalasinas produzidas por *Xylaria* sp., um fungo endofítico de *Piper aduncum* (Piperaceae). **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2038–2041, 2010.

SILVA NETO, S. J.; PEIXOTO, A. L. Rubiaceae do Parque Nacional de Itatiaia, Rio de Janeiro, Brasil. **Boletim do Parque Nacional do Itatiaia**, v. 14, p. 1–169, 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação de compostos orgânicos**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

SONG, F.; WU, S. H.; ZHAI, Y. Z.; XUAN, Q. C.; WANG, T. Secondary metabolites from the genus *Xylaria* and their bioactivities. **Chemistry and Biodiversity**, v. 11, n. 5, p. 673–694, 2014.

SORGELOOS, P.; WILEN, C. R.-V. DER; PERSOONE, G. The use of *Artemia nauplii* for toxicity testes - A critical analysis. **Ecotoxicology and Environmental**, v. 2, p. 249–255, 1978.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M. L.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185–195, 2004.

SOUZA, A. Q. L. **Potencial genético e químico dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 128 p. 2006.

SOUZA, W. DE; MARTINS-DUARTE, É. S.; LEMGRUBER, L. Organização estrutural

do taquizoito de *Toxoplasma gondii* Structural organization of the tachyzoite of *Toxoplasma gondii*. **Scientia**, v. 20, p. 131–143, 2010.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, p. 214–216, 1993.

STROBEL, G. A.; FORD, E.; LI, J-Y.; SEARS, J.; SIDHU, R. S.; HESS, W. M. *Seimatoantlerium tepuiense* gen. nov., a unique epiphytic fungus producing taxol from the Venezuelan Guyana. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 426–33, 1999.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535–544, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006b.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 448–459, 2001.

TANSUWAN, S.; PORNPAKAKUL, S.; ROENGSUMRAN, S.; PETSOM, A.; MUANGSIN, N.; SIHANONTA, P.; CHAICHIT, N. Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria* sp. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 10, p. 1620–1623, 2007.

TARPLEY, W. A. Studies on the use of the brine shrimp *Artemia salina* (Leach) as a test organism for bioassay. **Journal of Economic Entomology**, v. 51, n. 6, p. 780–783, 1958.

TAYLOR, M. C.; CAMPOS, MA. T. V. A.; ZAPPI, D. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Zappi Rodriguésia**, v. 58, n. 3, p. 549–616, 2007.

THE PLANT LIST. **Rubiaceae**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Rubiaceae/>>. Acesso em: 8 jul. 2016a.

THE PLANT LIST. **Duroia**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Rubiaceae/Duroia/>>. Acesso em: 8 jul. 2016b.

TROPICOS.ORG. **Rubiaceae Juss.** Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/42000315>>. Acesso em: 8 jul. 2016.

VASCONCELOS, T. B.; CARDOSO, A. R. N. R.; JOSINO, J. B.; MACENA, R. H. M.; BASTOS, V. P. D. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213–219, 2014.

VÁSQUEZ, L. M. G.; ARISTIZABAL, L. S. R. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) evaluation of antioxidant activity of *Palicourea guianensis* (Rubiaceae) extracts. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 47, n. 4, p. 483–491, 2013.

VEGA, F. E. SIMPKINS, A.; AIME, M. C.; POSADA, F.; PETERSON, S. W.; REHNER, S. A.; INFANTE, F.; CASTILLO, A.; ARNOLD, A. E. Fungal endophyte diversity in coffee plants from Colombia, Hawaii, Mexico and Puerto Rico. **Fungal Ecology**, v. 3, n. 3, p. 122–138, 2010.

VIEIRA, D. P. DE S.; SILVA, F. G.; SILVA, W. M. T.; CAVALCANTI, P. A.; LIMA, D. Primeiro registro de fungos endofíticos em folhas de *Ixora coccinea* L. em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 1, p. 1–4, 2012.

WAGENAAR, M. M.; CORWIN, J.; STROBEL, G.; CLARDY, J. Three new cytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochlaidiella*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 12, p. 1692–1695, 2000.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas**. 2a. ed. Alemanha: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J. J., WHITE, T. . (Ed.). **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. Nova York: Academic Press, Inc, 1990. p. 315–322.

WU, Y. GIRMAY, S.; SILVA, V. M.; PERRY, B.; HU, X.; TAN, G. T. The role of endophytic fungi in the anticancer activity of *Morinda citrifolia* Linn. (Noni). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

YANG, S.; XIAO, J.; LAATSCH, H.; HOLSTEIN, J. J.; DITTRICH, B.; ZHANG, Q.; GAO, J-M. Fusarimine , a novel polyketide isoquinoline alkaloid , from the endophytic fungus *Fusarium* sp. LN12 , isolated from *Melia azedarach*. **Tetrahedron Letters**, v. 53, n. 47, p. 6372–6375, 2012.

ZANARDI, L. M. **Estudo Químico e Biológico de Fungos Endofíticos Associados a *Senna spectabilis***. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, 2010.

ZANARDI, L. M.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; TREVISAN, H. C.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; YOUNG, M. C. M. Sesquiterpenos produzidos pelo fungo endofítico *Phomopsis cassiae* com atividade antifúngica e inibidora de acetilcolinesterase. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2233–2236, 2012.

ZANCA, S. S. **Análise fitoquímica sazonal e cultura de tecidos in vitro de *Duroia macrophylla* Huber**. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 116 p. 2015.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 753–771, 2006.

ZHANG, Q.; XIAO, J.; SUN, Q. Q.; QIN, J. C.; PESCIPELLI, G.; GAO, J. M. Characterization of cytochalasins from the endophytic *Xylaria* sp. and their biological functions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 10962–10969, 2014.

ZHAO, J.; ZHOU, L.; WANG, J.; SHAN, T.; ZHONG, L.; LIU, X.; GAO, X. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 567–576, 2010.

ZHENG, B.; ZHENG, B.; ZHAO, Y-X.; ZHONG, H-M.; CHEN, X-L. W.; ZENG, Y-B.; DONG, W-H.; HUANG, J-L.; PROKSCH, P.; DAI, H-F. Two new meroterpenes from endophytic fungus A1 of *Scyphiphora hydrophyllacea*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, n. 8, p. 776–779, 2012.

ZHOU, Z-F.; KURTÁN, T.; YANG, X-H.; MÁNDI, A.; GENG, M-Y.; YE, B-P.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; GUO, Y-W. Penibruguieramine A, a novel pyrrolizidine alkaloid from the endophytic fungus *Penicillium* sp. GD6 associated with chinese mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. **Organic Letters**, v. 16, n. 5, p. 9–12, 2014.

8. ANEXOS

Figura 67 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) dos extratos diclorometânicos dos micélios dos fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* (CDCl_3 : Dm SB 41a, Dm SB43; DMSO: Dm BDA 41b).

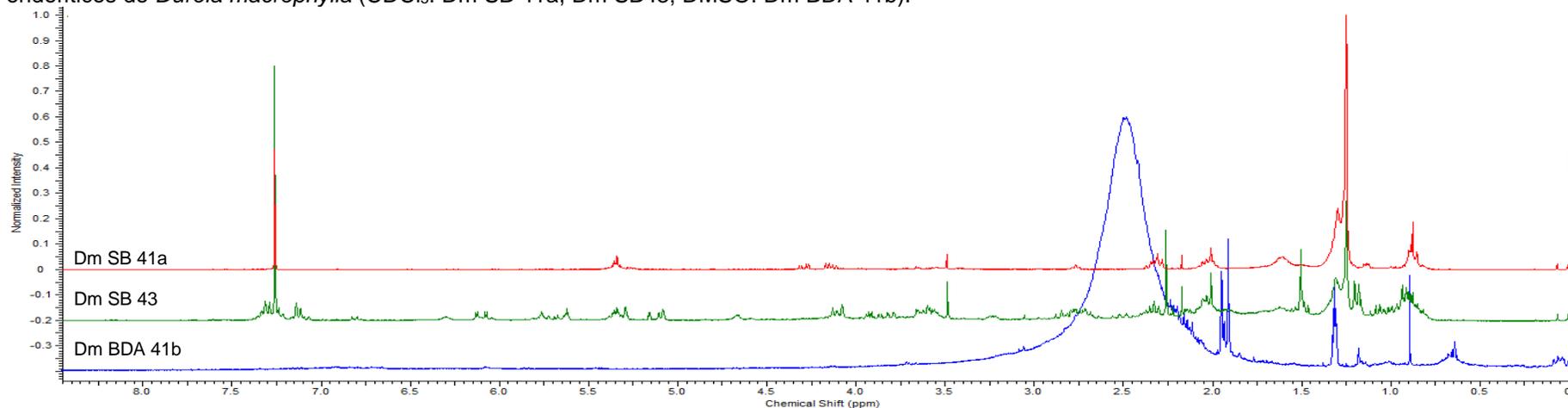


Figura 68 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) do extrato de acetato de etila do micélio do fungo Dm SB 41b e do extrato diclorometânico do micélio do fungo Dm BDA 21, ambos endofíticos de *Duroia macrophylla* (CDCl_3).

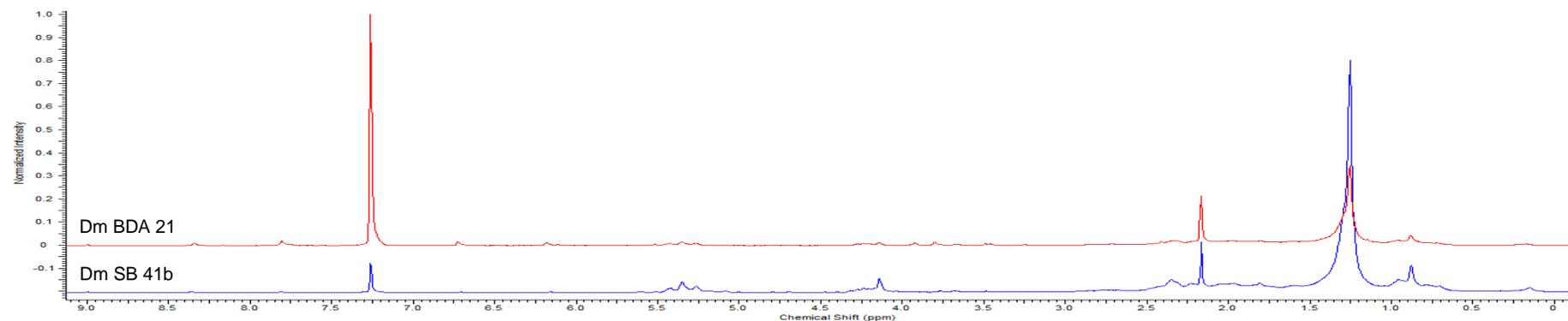


Figura 69 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* (DMSO).

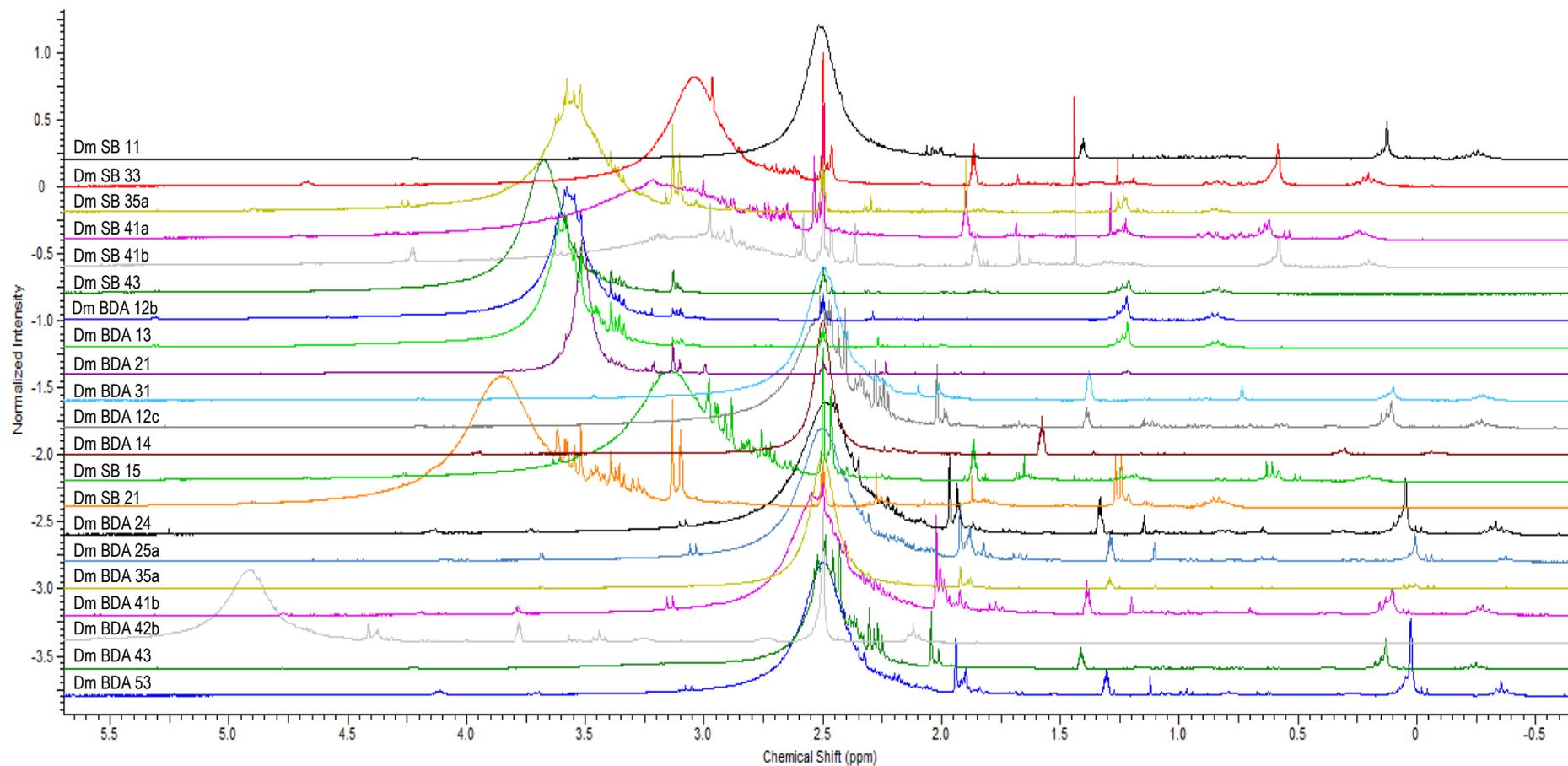
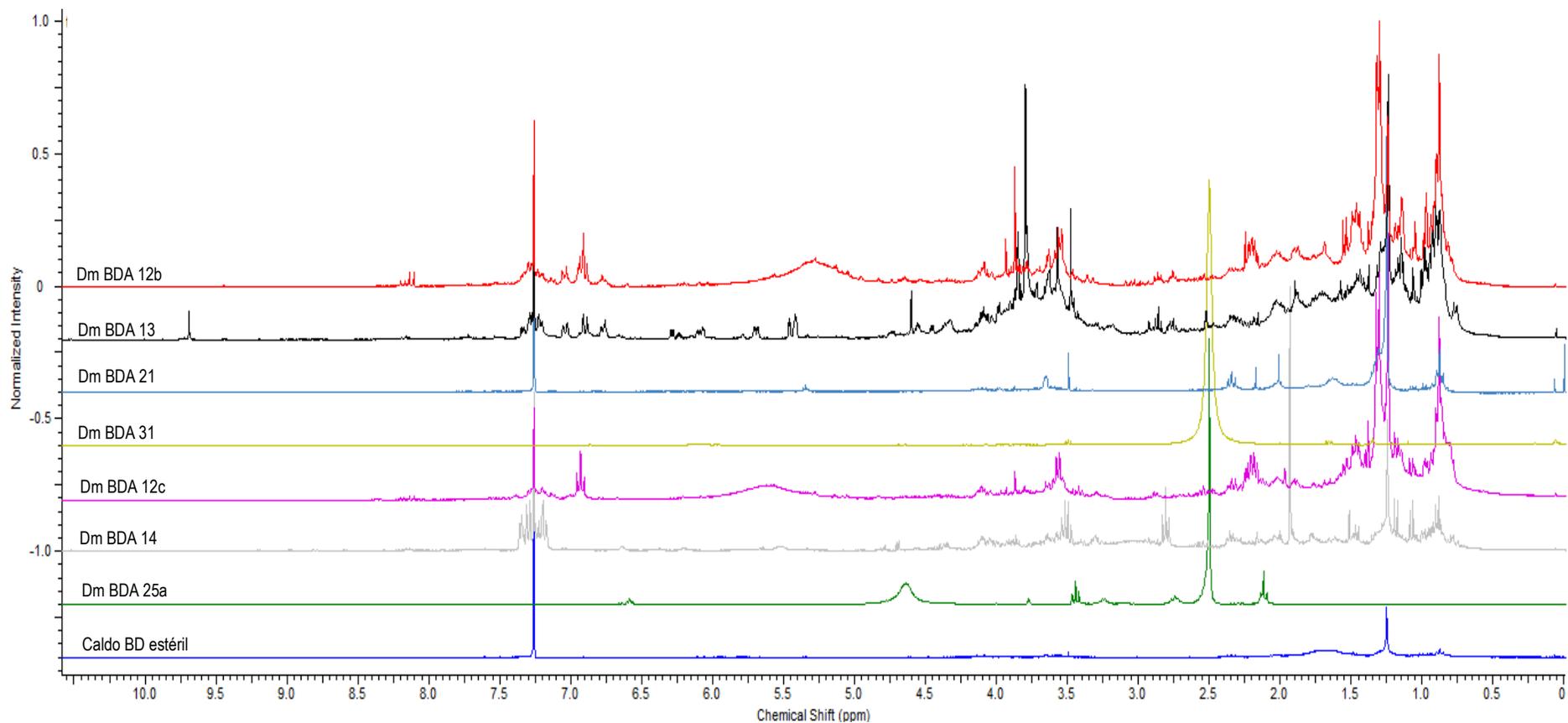
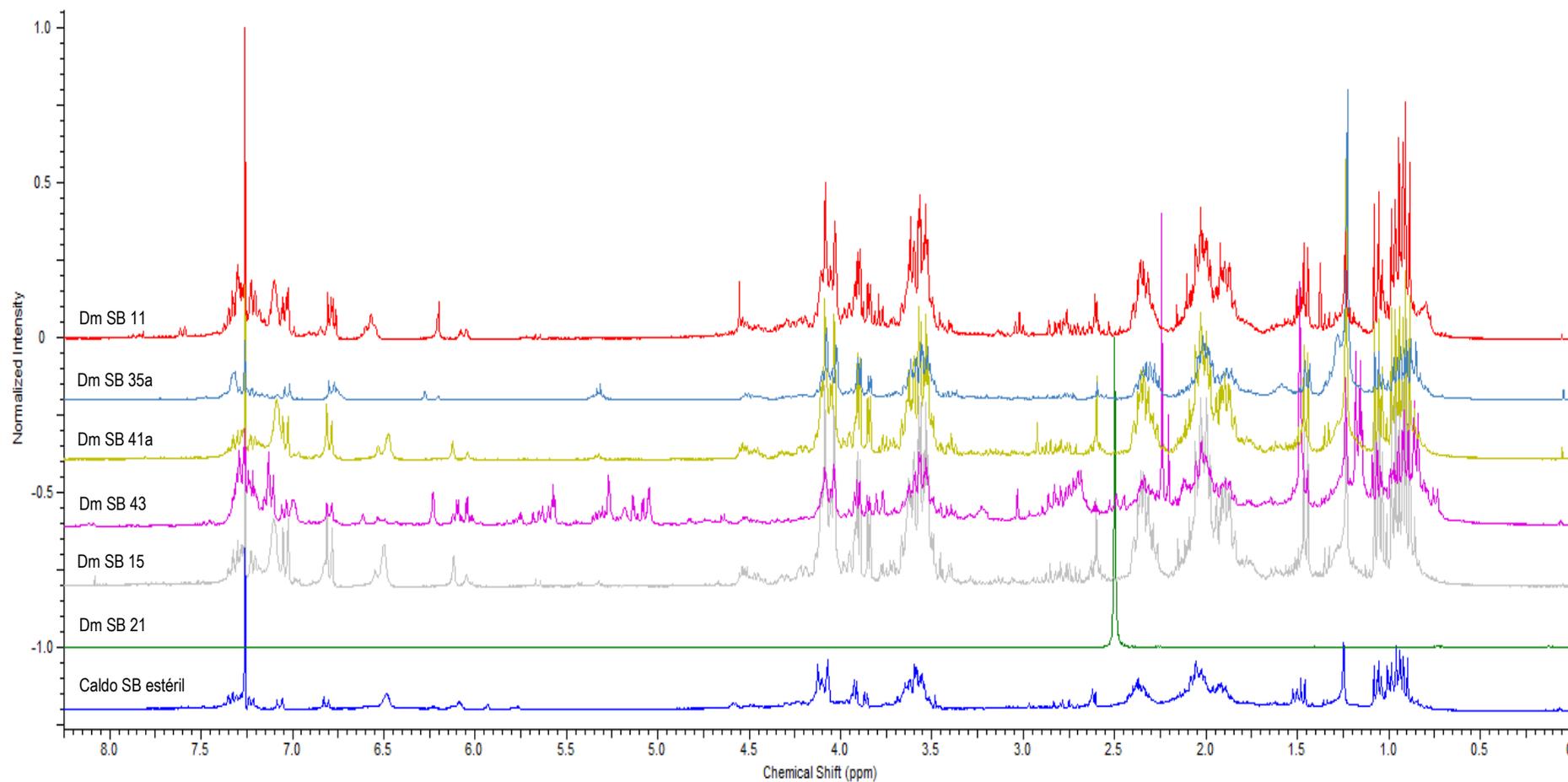


Figura 70 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) das fases diclorometânicas dos líquidos metabólicos dos fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* (CDCl_3 , exceto Dm BDA 31 e Dm BDA 25a: DMSO).



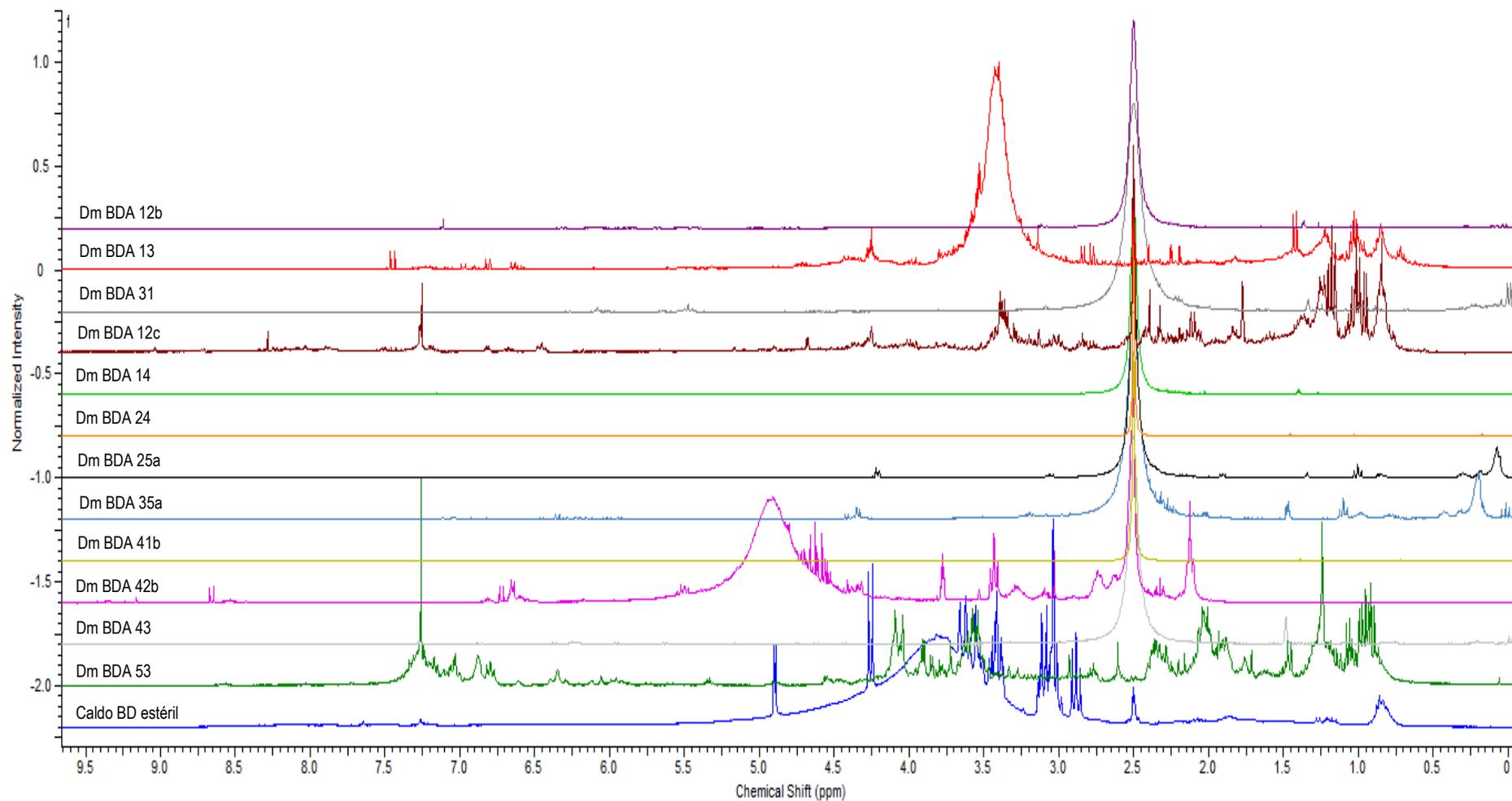
Meio de cultivo – Caldo Batata Dextrose (BD).

Figura 71 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) das fases diclorometânicas dos líquidos metabólicos dos fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* (CDCl_3 , exceto Dm SB 21: DMSO).



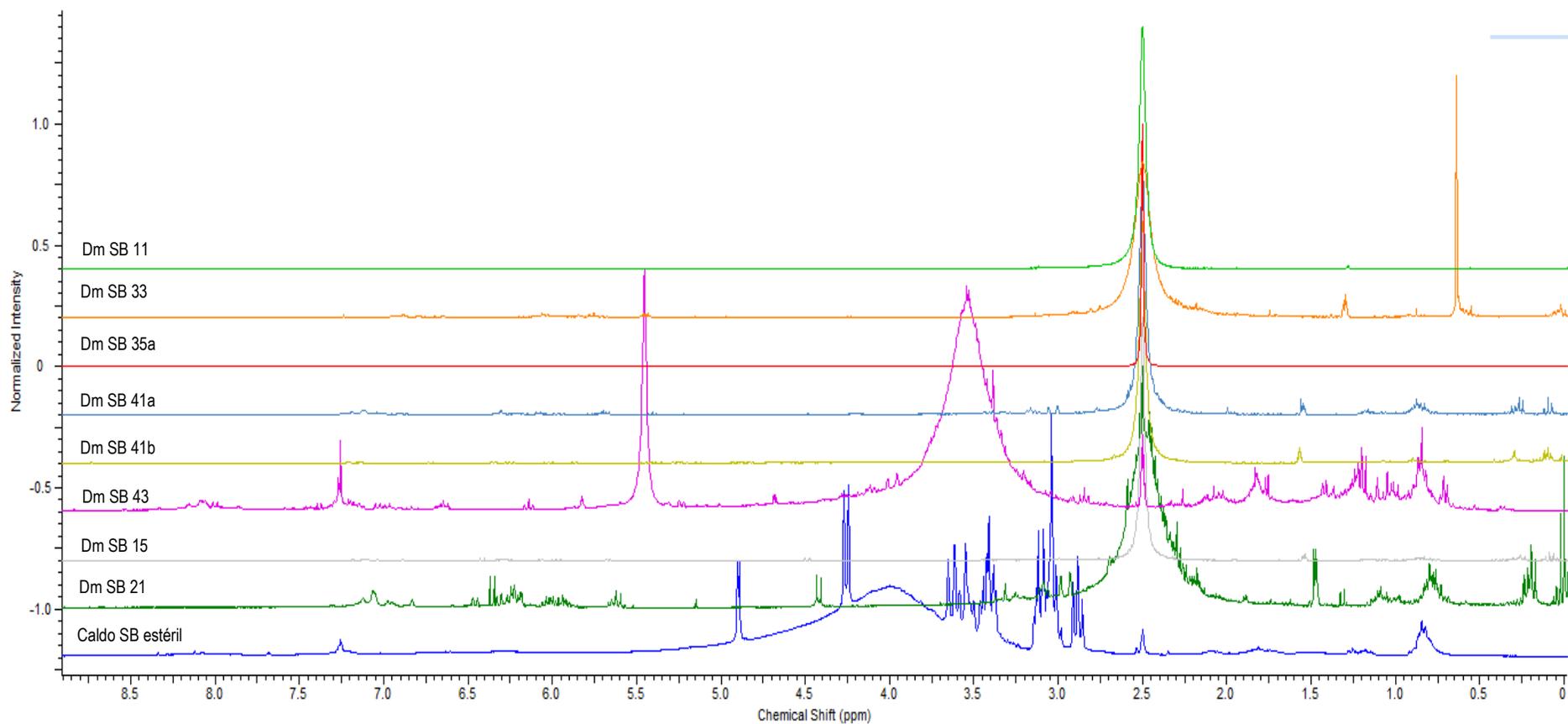
Meio de Cultivo – Caldo Sabouraud (SB).

Figura 72 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) das fases de acetato de etila dos líquidos metabólicos dos fungos endófitos de *Duroia macrophylla* (DMSO, exceto Dm BDA 53: CDCl_3).



Meio de Cultivo – Caldo Batata Dextrose (BD).

Figura 73 - Comparação de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (300 MHz) das fases de acetato de etila dos líquidos metabólicos dos fungos endófitos de *Duroia macrophylla* (DMSO).



Meio de Cultivo – Caldo Sabouraud (SB).