

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM
BIOTECNOLOGIA

WEISON LIMA DA SILVA

PROSPECÇÃO DE ALCALOIDES E ISOLAMENTO DA PERILENO
QUINONA: 4,9-DIHIIDROXI-1,2,11,12-TETRAHIDROPERILENO-
3,10-QUINONA DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFITICOS DE
Duroia macrophylla

Manaus

2015

WEISON LIMA DA SILVA

PROSPECÇÃO DE ALCALOIDES E ISOLAMENTO DA PERILENO
QUINONA: 4, 9 DIHIDROXI-1, 2, 11, 12-TETRAHIDROPERILENO-
3, 10 – QUINONA DE EXTRATOS DE FUNGOS ENDOFITICOS DE
Duroia macrophylla

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
Multi-institucional em
Biotecnologia da
Universidade Federal do
Amazonas, como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Mestre em
Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cecilia Veronica Nunez

Manaus
2015

Ficha Catalográfica

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

S586p Silva , Weison Lima da
Prospecção de alcaloides e isolamento da perileno quinona:
4,9-dihidroxi-1,2,11,12- tetrahidroperileno-3,10-quinona de
extratos de fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* / Weison
Lima da Silva . 2015
70 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Fungos endofíticos. 2. *Duroia macrophylla*. 3. perileno quinona.
4. alcaloides. I. Nunez, Cecilia Veronica. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

Dedico este trabalho a meu pai Eudes Cunha da Silva (*In memoriam*) e minha avó Maria Ramos da Silva (*In memoriam*). À minha família, em especial minha mãe Maria Francisca Sergio Lima.

Agradecimentos

A Deus, fonte de amor e sabedoria.

A fundação de Amparo à Pesquisa do Estado Amazonas (FAPEAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa e financiamento do projeto.

A Dra. Cecilia Veronica Nunez pela orientação e repasse de conhecimento.

A todos os colegas (Cristine, Júlio Cezar, Maria Carolina, Maria Tereza, Manoel, Vanessa, David, Paula, Luana, Alan) de laboratório pela amizade, convivência e aprendizagem.

A minha família (Maria Francisca, Abedelak, Keiwia, Kevin Willen, Aquiles, tios, tias e avós) pelo apoio e confiança.

A tia Francinete e Antonio Feitosa (*in memoriam*).

A todos docentes que me ajudaram na caminhada para chegar até aqui.

” Somos quem podemos ser, sonhos que podemos ter”

Humberto Gessinger

“Você descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto”.

William Shakespeare

RESUMO

Os fungos endofíticos são recursos úteis para prospecção de biomoléculas ativas. Nesta pesquisa foram estudados 4 fungos (BDL-DM5-G13; BDL-DM2-G15; SBL-DM1-G12; BDL-DM8-G2) isolados de folhas de *Duroia macrophylla*, espécie vegetal com acentuado potencial biotecnológico. Assim, os fungos foram cultivados em batata dextrose caldo com 0,2% de extrato de levadura. Os extratos e fases AcOEt dos micélios foram analisados por cromatografia em camada delgada comparativa e ressonância magnética nuclear de hidrogênio, constatou-se a presença de metabólitos secundários de interesse, foi realizado então o fracionamento dos extratos por cromatografia em coluna aberta. Também foi realizada a avaliação da atividade antioxidante, bem como ensaios quanto a toxicidade frente à *Artemia salina*, atividade antibacteriana e antifúngica. Do fracionamento do extrato do fungo (BDL DM5 G13) identificado como *Graphium jumulu* foi isolada a substância 4,9-dihidroxi-1,2,11,12-tetrahydroperileno-3,10-quinona, a qual foi identificada através da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, e de espectrometria de massas. Para outros extratos fracionados, não foi possível realizar a elucidação e/ou identificação estrutural das substâncias limitadas pela massa e degradação de algumas amostras. Quanto às atividades biológicas, somente o extrato (BDL DM2 G15) foi tóxico para *Artemia salina*. Para o ensaio antibacteriano por difusão todos os extratos apresentaram média atividade contra sete bactérias testadas. Nos ensaios de atividade antifúngica e de antioxidante, nenhum dos extratos mostraram-se ativos. Com a condição de cultivo utilizada, foi possível verificar que houve produção de alcaloides, terpenos e quinonas, sendo a espécie *G. jumulu* promissora para prospecção química utilizando outras condições de cultivo *in vitro*, visando o aumento da produção da 4,9-dihidroxi-1,2,11,12-tetrahydroperileno-3,10-quinona, ou de outras substâncias de interesse.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, *Duroia macrophylla*, perileno quinona, alcaloides.

ABSTRACT

Endophytic fungi are useful resources for prospecting for active biomolecules. In this research, 4 fungi (BDL-DM5-G13; BDL-DM2-G15; SBL-DM1-G12; BDL-DM8-G2) isolated from leaves of *Duroia macrophylla*, a plant species with marked biotechnological potential, were studied. Thus, the fungi were grown in potato dextrose broth with 0.2% yeast extract. The extracts and AcOEt phases of the mycelia were analyzed by comparative thin layer chromatography and hydrogen nuclear magnetic resonance, the presence of secondary metabolites of interest was verified, then the extraction fractionation was performed by open column chromatography. An evaluation of antioxidant activity was also carried out, as well as tests for toxicity against *Artemia salina*, antibacterial and antifungal activity. From the fractionation of the fungus extract (BDL-DM5-G13) identified as *Graphium jumulu*, the substance 4,9-dihydroxy 1,2,11,12-tetrahydroperylene-3,10-quinone was isolated, which was identified through the analysis of the spectra uni and bidimensional ^1H and ^{13}C NMR, and mass spectrometry. For other fractionated extracts, it was not possible to perform the elucidation and/or structural identification of the substances limited by the mass and degradation of some samples. As for biological activities, only the extract (BDL-DM2-G15) was toxic to *Artemia salina*. For the diffusion antibacterial assay, all extracts showed average activity against seven tested bacteria. In the antifungal and antioxidant activity tests, none of the extracts were active. With the cultivation condition used, it was possible to verify that there was production of alkaloids, terpenes and quinones, being the species *G. jumulu* promising for chemical prospecting using other in vitro cultivation conditions, aiming at increasing the production of 4,9 dihydroxy-1,2,11,12-tetrahydroperylene-3,10-quinone, or other substances of interest.

Key words: Endophytic fungi, *Duroia macrophylla*, perylene quinones, alkaloids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: hipocrelina A e cercosporina	20
Figura 2: Área de coleta	29
Figura 3: Procedimento de desinfestação, isolamento e purificação os fungos endofíticos	30
Figura 4: Fluxograma para obtenção dos extratos de micélios	32
Figura 5: Fluxograma para obtenção dos extratos dos caldos fermentados	33
Figura 6: Fluxograma de fracionamento do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13	34
Figura 7: Fluxograma de fracionamento do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM2-G15	35
Figura 8: Fluxograma de fracionamento do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM8-G2	35
Figura 9: número de fungos isolados de acordo com os meios de cultura utilizados e as coletas feitas	40
Figura 10: Aspectos morfológicos dos fungos: A) BDL-DM5-G13, B) BDL-DM2-G15, C) SBL-DM1-G12, D) BDL-DM8-G2	42
Figura 11: CCDC revelada com reagente de Dragendorff, evidenciando a presença de alcaloide. Sistema de eluição utilizado AcOEt/Acetona 7:3	43
Figura 12: Espectro de RMN de ^1H da fase AcOEt do caldo bruto do fungo SBL-DM1-G12 (300 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$)	43
Figura 13: Ampliação da região entre 6,5 e 11,5 ppm, do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$)	44
Figura 14: CCDC revelada com reagente de Dragendorff evidenciando a ausência de alcaloides	44
Figura 15: CCDC do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13, revelada com (A) reagente de Dragendorff, (B) sulfato cérico, (C) luz UV 254 nm e (D) luz UV 365 nm. Sistema de eluição DCM/AcOEt 9:1	46
Figura 16: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13	47

Figura 17: Cromatofolhas CCDC das frações 27 a 33 Reveladas; A) sulfato cérico, B) U.V 365 nm, C) U.V 254 nm. Sistema de eluição utilizado DCM 100%	48
Figura 18: Espectro de RMN de ^1H da fração 27-33 do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13 (300 MHz, em CDCl_3)	48
Figura 19: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da fração 27-33 do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13 (300 MHz, em CDCl_3)	49
Figura 20: Mapa de contorno de HSQC da fração 27-33 do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13 (300 MHz, em CDCl_3)	49
Figura 21: Mapa de contorno de HMBC da fração 27-33 do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13 (300 MHz, em CDCl_3)	49
Figura 22: Estrutura química da 4,9-dihidroxi-1,2,11,12-tetrahydroperileno-3,10-quinona	50
Figura 23: CCDC das frações 35 a 49 Reveladas: A) sulfato cérico, B) UV 365 nm C) UV 254 nm. Sistema de eluição utilizado DCM 100%	51
Figura 24: CCDC do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM8-G2, revelada com (A) reagente de Dragendorff, (B) sulfato cérico, (C) luz UV 254 nm e (D) luz UV 365 nm. Sistema de eluição DCM/AcOEt 9:1	52
Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$) do extrato AcOEt de micélio do fungo BDL-DM8-G2	52
Figura 26: CCDC das reuniões das frações 11 a 23, Reveladas: A) UV 254 nm, B) UV 365 nm C) sulfato cérico. Sistema de eluição utilizado DCM 100%	53
Figura 27: CCDC do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM2-G15 revelada com (A) reagente de Dragendorff, (B) sulfato cérico, (C) luz UV 254 nm e (D) luz UV 365 nm. Sistema de eluição DCM/AcOEt 9:1	54
Figura 28: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$) do extrato AcOEt de micélio	54
Figura 29: CCDC das frações 13 a 21 Reveladas; A) sulfato cérico. B) U.V 365 nm C) U.V 254 nm. Sistema de eluição utilizado DCM/AcOEt 9:1	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Substâncias que ocorrem em plantas hospedeiras sintetizadas também por fungos endofíticos	26
Tabela 2: Sistemas de eluição e frações obtidas da coluna cromatográfica do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13	34
Tabela 3: Sistemas de eluição e frações obtidas da coluna cromatográfica do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM2-G15	35
Tabela 4: Sistemas de eluição e frações obtidas da coluna cromatográfica do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM8-G2	36
Tabela 5: fungos selecionados para a triagem e as quantidades das massas obtidas dos extratos	41
Tabela 6: Dados de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 300 MHz) da fração 27-33 (4,9-dihidroxi-1,2,11,12-tetrahidroperileno-3,10-quinona)	50
Tabela 7: Resultados do ensaio de toxicidade para <i>Artemia salina</i> frente às concentrações dos extratos utilizados	55
Tabela 8: Resultados dos halos de inibição em milímetros (mm) para os extratos testados no ensaio antibacteriano	56
Tabela 9: Atividade antioxidante dos extratos AcOEt de micélio mediante aos métodos DPPH e Fe ³⁺ /fenantrolina	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Bactérias testes utilizadas para avaliar a atividade dos extratos	37
Quadro 2: Classificação da atividade de extratos considerando halos de inibição	56

LISTA DE SIGLAS

AcOEt – Acetato de etila

BDA – Batata dextrose ágar

BDL – Batata dextrose caldo e extato de levedura.

CC – Cromatografia em coluna

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CDCl_3 – Clorofórmio deuterado

CL_{50} – Concentração Letal de 50% dos indivíduos

\emptyset – Diâmetro

d – Dupleto

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

$\text{DMSO-}d_6$ – Dimetilsulfóxido deuterado

DPPH – 1,1-difenil-2-picril-hidrazila

h – Altura

Hex – Hexano

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

HTS – *High Throughput Screening*

Hz – Hertz

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

J – Constante de acoplamento

nm – nanômetro

pH – Potencial hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

SB – Ágar Sabouraud

SBL – Sabouraud Dextrose Caldo e extrato de levedura

s – Singleto

t – Tripleto

TMS – Tetrametilsilano

UV – Ultravioleta

Sumário

Resumo	vi
Lista de Figuras	viii
Lista de tabelas	x
Lista de Quadros	xi
Lista de Siglas	xii
INTRODUÇÃO	15
1. REVISAO BIBLIOGRAFICA.....	17
1.1 PRODUTOS NATURAIS.....	17
1.2 PERILENOQUINONAS.....	19
1.3 ALCALOIDES.....	21
1.4 PROBLEMAS PARA A OBTENÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS A PARTIR DE PLANTAS.....	22
1.5 FUNGOS ENDOFÍTICOS	23
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	29
3.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	29
3.3 SELEÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE.....	31
3.3.1 Avaliação prévia para a produção de metabólitos	31
3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS	31
3.4.1 Extração dos micélios.....	31
3.4.2 Extração dos caldos.....	32
3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	33
3.5.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)	33
3.5.2 Fracionamento dos extratos em coluna cromatográfica.	33
3.6 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS e espectrométricas	36
3.6.1 Ressonância Magnética Nuclear	36
3.6.2 Espectrometria de Massas	36
3.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	36
3.7.1 Ensaio de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	36

3.7.2 Ensaio da Atividade antibacteriana.....	37
3.7.3 Avaliação da Atividade Antioxidante	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	40
4.2 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS	42
4.2.1 Fungo SBL-DM1-G12	42
4.2.2 Fungo BDL-DM5-G13.....	46
4.2.3 Fungo BDL BDL-DM8-G2	51
4.2.4 Fungo BDL-DM2-G15.....	53
4.3 ENSAIO DE TOXICIDADE	55
4.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	56
4.5 ENSAIO ANTIFÚNGICO	57
4.6 ENSAIO ANTIOXIDANTE	57
5. CONCLUSÃO	59
6. PERSPECTIVAS.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

INTRODUÇÃO

A natureza tem sido fonte de medicamentos por milênios, os produtos naturais derivados da mesma são resultado das interações dos organismos e o meio ambiente (MISHRA & TIWARI, 2011; CRAGG & NEWMAN, 2012), logo a diversidade química e a bioatividade seletiva das moléculas naturais às tornam valiosas, como importantes recursos terapêuticos para a cura e tratamento de diversas doenças (HARVEY, 2008; KRAUSE & TOBIN, 2013).

Os produtos naturais são conhecidos como metabólitos secundários derivados de plantas e micro-organismos (BAKER et al., 2007). Substâncias do metabolismo secundário não estão envolvidas diretamente no atendimento de necessidades fisiológicas básicas de sobrevivência, em curto prazo, do organismo produtor. Assim as moléculas originadas desse metabolismo são estruturalmente complexas, com baixo peso molecular, pouco abundantes e a ocorrência é restrita a espécies particulares (AGOSTINI-COSTA et al., 2012).

Com relação à prospecção de produtos naturais, o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura (VIEGAS Jr et al., 2006), entretanto há algumas para a obtenção de determinada substância a partir de fontes vegetais, tais como: baixo rendimento, aspectos fisiológicos da planta para a produção da droga, tempo de crescimento vegetal, vulnerabilidade de espécies vegetais, exploração extrativista, entre outros (BRANDÃO, 2010; CHANDRA, 2012; MCCHESENEY et al., 2007).

Considerando as limitações que os vegetais apresentam como fonte de moléculas bioativas, a exploração de micro-organismos para este propósito se torna vantajoso, pois são fontes renováveis e inesgotáveis. Os micro-organismos podem ser cultivados em larga escala, de maneira controlada, não gerando prejuízo aos ecossistemas minimizando, dessa forma, o perigo de extinção de algumas espécies vegetais (ARAÚJO., et al 2002; TAKAHASHI & LUCAS, 2008; TEIXEIRA et al., 2011). Nesse contexto, iniciativas voltadas à exploração de fungos endofíticos para a produção de moléculas farmacoterapêuticas, é uma alternativa possível e viável, pois em uma situação evolutiva os fungos endofíticos adquiriram a habilidade de produzir substâncias iguais ou similares às de seus hospedeiros (STROBEL & DAISY, 2003; ZHANG et al., 2006).

A espécie vegetal escolhida para este estudo foi *Duroia macrophylla*, pertence à família Rubiaceae. Estudos fitoquímicos prévios realizados com essa espécie constataram uma diversidade de metabólitos secundários, envolvendo triterpenos e alcaloides indólicos, com atividade sobre tuberculose, apresentando um dos alcaloides indólicos estrutura molecular inédita e elevada atividade contra diversas células tumorais. Assim, esta pesquisa visou o estudo químico e biológico dos fungos endofíticos isolados de *D. macrophylla*, objetivando verificar se esses endofitos produziram os alcaloides de interesse, a fim de obtê-los em maior quantidade e assim poder avançar nos estudos da fase pré-clínica.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PRODUTOS NATURAIS

Os organismos vivos podem ser considerados laboratórios biossintéticos, em relação à síntese de moléculas que podem exercer efeitos terapêuticos (ROBBERS et al., 1997). As moléculas naturais possuem estereoquímica complexa e grupos funcionais que interagem com alta especificidade em alvos biológicos (MOLLINARI, 2009). Características que as tornam valiosas para a indústria farmacêutica, cosmética, agroquímica (CLARDY & WALSH., 2004; KAZHIR et al., 2013).

Durante algum tempo o interesse em buscar variedades químicas na natureza foi diminuído, e a inovação por moléculas passou a ser atendida por técnicas de química combinatória e os ensaios em larga escala (*High Throughput Screening* - HTS) (BAKER et al., 2007). Entretanto, segundo relata Viegas Jr e colaboradores (2006), a geração de diversidade molecular por essas metodologias sintéticas não obteve sucesso como fonte primária, quando comparada a diversidade bioativa e molecular das substâncias de ocorrência natural (ORTHOLAND & GANESAN., 2004; VIEGAS Jr et al., 2006).

Diversos estudos apontam que a atividade de substâncias de origem natural se dá pelo fato das mesmas serem sintetizadas por organismos vivos, sendo assim, espera-se que tenham maior possibilidade de apresentar atividade biológica, justificada pela efetiva interação com receptores de drogas (HENKEL et al., 1999; FEHER & SCHMIDT, 2003; HARVEY, 2007). Com isso, o sucesso na retomada para prospecção de produtos naturais foi facilitado principalmente pelo avanço de técnicas na área química, tais como; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Espectrometria de Massas (EM), e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), as mesmas facilitaram a identificação e isolamento de novas moléculas biologicamente ativas (BOLZANI et al., 2012).

As moléculas naturais apresentam um perfil favorável em termos de absorção, metabolismo e baixa toxicidade para a utilização em humanos (DU & TANG, 2014). Além disso, as estruturas dos produtos naturais são úteis também para a possível síntese de análogos sintéticos, que podem ter as suas propriedades melhoradas, ou então, podem atuar como ferramentas para o estudo de manipulação e função de proteínas, ou ainda sondas, para investigar sistemas biológicos como parte da genômica química e pesquisas relacionadas,

(GANESAN, 2004; HARVEY, 2007; SUNAZUKA et al., 2008; RIZZO & WALDMANN, 2014).

As substâncias naturais têm desempenhado um papel importante em todo o mundo no tratamento e prevenção de doenças humanas, sendo capazes de tratar 87% das enfermidades, estas são categorizadas como antibacterianas, anticoagulantes, antiparasitárias, imunossupressoras e anticancerígenas (NEWMAN et al., 2003; CHIN et al., 2006). Segundo Chin e colaboradores (2006) o valor dos produtos naturais pode ser avaliado utilizando três critérios: (1) a taxa de introdução de novas moléculas químicas de ampla diversidade estrutural, (2) o número de doenças tratadas ou prevenidas por estas substâncias e (3) a sua frequência de utilização no tratamento de doença.

Por exemplo, Newman e Cragg (2012) analisaram os agentes terapêuticos aprovados em todo o mundo no período de 1981 a 2010, os resultados indicaram que houve um número significativo de drogas aprovadas como antitumorais, antibacterianas e antifúngicas. Na área de anticancerígenos ao longo do período de 1940 a 2010, 74,8% derivaram de substâncias sintéticas, e 48,6%, correspondem a substâncias derivadas de produtos naturais (NEWMAN & CRAGG., 2012).

Comumente, os produtos naturais são identificados como sinônimos de metabólitos secundários (DIAS et al., 2012). As substâncias químicas que são formadas, degradadas ou transformadas recebem o nome de metabólitos, estes podem ser divididos em dois grupos denominados de metabólitos primários e secundários. O primeiro refere-se aqueles componentes químicos necessários ao atendimento de necessidades básicas e essenciais a sobrevivência da célula. Em contrapartida os metabólitos secundários são substâncias que não estão relacionados de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor, mas conferem vantagens, para sobrevivência e para a perpetuação da espécie no ecossistema (DEWICK, 2002).

Geralmente os metabólitos secundários são pouco abundantes, cuja a produção pode ocorrer em momentos restritos do ciclo de vida de determinadas espécies, essas substâncias apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, atividade biológica (POSER & MENTZ, 2004; KELLER et al., 2005; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Uma simples classificação de metabólitos secundários inclui grupos principais: terpenos (como os voláteis de plantas, glicosídeos cardíacos, carotenóides e esteróis), compostos fenólicos (como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas, estilbenos, flavonóides, taninos e lignina) e substâncias contendo nitrogênio (alcaloides) (AGOSTINI-COSTA et al., 2012; TAIZ & ZEIGER, 2009). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e ácido mevalônico. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (DEWICK, 2002).

A maioria dos metabólitos secundários são sintetizados por meio de três vias biossintéticas principais: (1) via do chiquimato, com produção de substâncias fenólicas, principalmente derivados de C_6C_3 e também os aminoácidos aromáticos, que por sua vez são convertidos em diversas substâncias (MUSTAFA & VERPOORTE, 2007); (2) via do acetato, que gera policetídeos, ácidos graxos, poliacetilenos, entre outros e (3) via do acetato-mevalonato, levando a uma vasta gama de terpenoides (EISENREICH et al., 2004).

1.2 PERILENOQUINONAS

As perilenoquinonas compreendem uma família de produtos naturais caracterizados por um núcleo pentacíclico oxidado (MULROONEY et al., 2012), A maioria das perilenoquinonas fúngicas bem caracterizadas partilham um núcleo comum 4,9-dihidroxi-3,10-perilenoquinona e diferem na composição da suas cadeias laterais (DAUB et al., 2005), e são divididas em três classes a) Compostos C_{20} sem substituintes de carbono, b) perileno quinonas que contém substituintes de carbono, e c) eritroafins. As perileno quinonas são toxinas fúngicas cuja produção é mais frequente em fungos Ascomycota. Muitos dos produtores de perileno quinonas são identificados como agentes patogênicos de plantas (DAUB & CHUNG, 2009). Nas plantas estas substâncias são agentes oxidantes, conhecidas também como fotossensibilizadores.

Das toxinas com esqueleto de perileno quinonas, as mais estudadas são a hipocrelina e cercosporina (Figura 1), tendo importância farmacêutica e agrícola (DAUB & CHUNG, 2007).

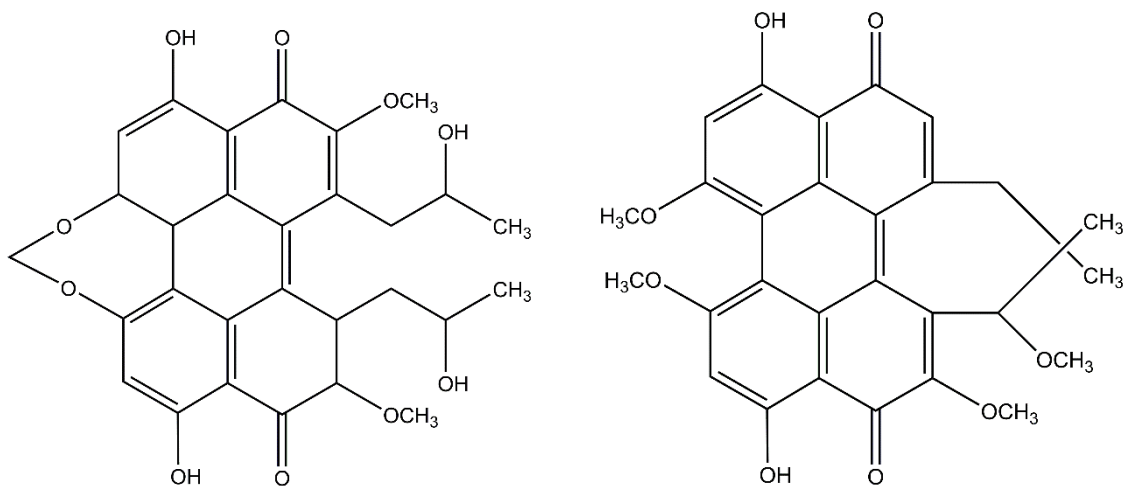


Figura 1: hipocrelina A e cercosporina

Quando reduzidas por ação da luz, as perileno quinonas podem reagir com macromoléculas celulares, tais como lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos, causando danos oxidativos. Podem reagir também com o oxigênio, conduzindo à produção de formas reduzidas e radicais livres de oxigênio incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio ou radical hidroxila (GIROTTI, 1990). Quanto à localização celular das perileno quinonas por ser solúvel em lipídios são localizadas em vários compartimentos celulares, incluindo membranas celulares e nos lisossomos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, porém são excluídos do núcleo (DIWU, 1995; MILLER et al., 1995; DAUB & CHUNG, 2009).

As ações citotóxicas atribuídas às perileno quinonas as tornam moléculas promissoras para o setor farmacêutico, dentre as atividades apresentadas por elas e descritas na literatura estão: antiviral, antimicrobiana e imonomoduladoras (HUDSON et al., 1997; PARK et al., 2011; YAGAN et al., 2015). Diversos estudos evidenciam seu uso com notada atividade contra vários tipos de células tumorais tais como adenocarcinoma de mama e carcinoma de células escamosas (BLANK et al., 2004).

Outra característica conferida às perileno quinonas é que as mesmas apresentam especificidade para uma ligação seletiva no domínio regulador C1 da proteína quinase C (PKC). As várias isoformas da proteína quinase C participam da fosforilação de serina e treonina em proteínas que estão envolvidas na formação e progressão de tumores (MULROONEY et al., 2012).

Dentre outras substâncias que tem o uso como antitumoral estão os alcaloides.

1.3 ALCALOIDES

Entre as substâncias químicas, os alcaloides são representantes de sucesso dentre os produtos naturais, são também um importante grupo diversamente distribuído, químico, biológico e comercialmente significativo. Representam 20% dos metabólitos secundários conhecidos, possuindo 21.000 estruturas identificadas, constituindo-se o maior grupo contendo nitrogênio em suas nas estruturas moleculares (CORDELL et al., 2001; WINK, 2008).

A biotoxicidade seletiva dessas moléculas, quando utilizadas em doses adequadas podem mediar atividades farmacológicas úteis, promovendo a expectativa da vida humana. Os alcaloides são empregados principalmente como antimalárico, antineoplásico, tratamento do mal de Alzheimer, entre outras indicações terapêuticas (LINNE, 2007), demonstradas na tabela 1.

Os alcaloides são classificados de acordo com seus precursores biogênicos (DEWICK, 2002). Do ponto de vista estrutural, os alcaloides são divididos de acordo com suas formas e origens, podendo ser classificados como alcaloides verdadeiros, protoalcaloides e pseudoalcaloides. Os alcaloides verdadeiros derivam de aminoácidos e possuem um átomo de nitrogênio inserido em anel heterocíclico, já os protoalcaloides são substâncias nos quais o átomo de nitrogênio deriva de um aminoácido e o mesmo não faz parte do anel em uma estrutura heterocíclica, e pseudoalcaloides são moléculas, que não são derivados de aminoácidos, (DISCIMUS, 2007).

Com relação à presença de nitrogênio, um ou mais átomos de nitrogênio estão presentes nas estruturas moleculares, podendo existir como aminas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias. O nitrogênio também confere a basicidade para os alcaloides, o grau de basicidade varia grandemente,

dependendo da estrutura molecular, como também e a presença e localização de outros grupos funcionais (DEWICK, 2002).

Semelhante a outras aminas os alcaloides formam sais complexos com compostos de mercúrio, ouro, platina e outros metais, esses sais precipitam, os precipitados podem ser amorfos ou cristalinos, podem possuir cores diferentes variando do branco ao marrom alaranjado (HENRIQUES et al., 2004), essas características colorimétricas servem como base para indiciar a presença desses compostos nitrogenados, alguns reagentes auxiliam a evidenciar a presença de alcaloides tais como: reagente de Mayer, Dragendorff, Wagner, Bertrand, Hager (MATOS, 2009).

1.4 PROBLEMAS PARA A OBTENÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS A PARTIR DE PLANTAS

Em um estudo realizado por Brandão (2010) a produção de uma droga natural a base de plantas não atinge sempre o nível desejado. Segundo Chandra (2012) moléculas de interesse são produzidas em um estágio de desenvolvimento específico, em determinada condição ambiental, estresse, disponibilidade de um nutriente particular, associado a esses fatores as plantas podem ter crescimento lento, levando vários anos para atingir uma fase de crescimento adequado para o acúmulo de produtos.

McChesney e colaboradores (2007) relatam que a preocupação com a disponibilidade de uma quantidade de uma substância terapêutica requerida para as necessidades de desenvolvimento e de mercado, tem sido um fator limitante para a indústria farmacêutica com interesse em produtos naturais.

Para que um produto natural possa tornar-se uma realidade comercial, melhoria no seu processo de produção é uma necessidade (DEMAIN, 2006). Considerando as limitações associadas à produtividade e vulnerabilidade das espécies de plantas como fontes de novos metabólitos, os micro-organismos são uma fonte, facilmente renovável e inesgotável de novas estruturas que carregam potencial farmacêutico, além do mais a capacidade produtiva de uma dada substância pode ser controlada (SANTOS & VARVARALHO., 2011; CHANDRA, 2012). Quando comparado com as fontes de produtos naturais, tais como plantas e animais, os micro-organismos são uma fonte muito mais facilmente renovável e reprodutível (LAM, 2007).

Takahashi e Lucas (2008) afirmam que é vantajoso realizar a prospecção química de metabólitos fúngicos em relação às demais fontes, pois podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, e não geram prejuízo ao ecossistema, como pode ocorrer com a retirada de plantas de áreas naturais, nem problemas éticos como os que podem advir da prospecção de metabólitos bioativos a partir de insetos, anfíbios e outras espécies animais. Minimiza-se, dessa forma, o perigo de extinção de algumas espécies vegetais, mantendo a produção de fármacos e garantindo a vida de pessoas afetadas por inúmeras doenças (ARAÚJO., et al 2002; TEIXEIRA et al., 2011).

Dentre os micro-organismos os fungos endofíticos representam um recurso pouco explorado e uma importante fonte de moléculas bioativas. Estes metabólitos bioativos possuem ampla gama de atividades biológicas como, por exemplo, atividades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes (JALGAONWALA et al., 2011; ALY et al., 2011) e podem ser os materiais de partida para o desenvolvimento de produtos com potencial aplicação na agricultura, medicina, indústria alimentar, farmacêutica ou agroquímica (STROBEL et al., 2004; VERMA et al., 2009).

1.5 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Existem aproximadamente 1,5 milhões de espécies de fungos, dos quais apenas 5% estão descritos (HAWKSWORTH, 2001). Considerando que das 300 mil espécies de plantas que existem na terra, cada uma hospede, no interior de seus tecidos, um ou mais fungos endofíticos, são grandes as chances de se encontrar novos microrganismos, constituindo-se numa fonte rica em diversidade genética e, possivelmente de novos produtos naturais (STROBEL & DAISY, 2003).

Todos os micro-organismos que habitam o interior das plantas, pelo menos um período de seu ciclo de vida, sem causar danos aparentes em seu hospedeiro podem ser classificados com endofíticos, que são diferentes dos epifíticos (presentes na superfície) e dos fitopatógenos (causadores de doenças) (AZEVEDO et al., 2000; ARAÚJO et al., 2002; STROBEL et al., 2004; SAIKKONEN, 2007).

Segundo Azevedo (2013) essas distinções são feitas apenas para fins didáticos, pois um endófito, que vive no interior de uma planta de acordo com as condições ambientais e o estado fisiológico do hospedeiro pode ser considerado um patógeno latente. Wilson (1995) afirma que fitopatógenos podem estabelecer a condição endofítica não patogênica, por meio de alterações mutagênicas fazendo com que o mesmo se torne um endofítico não patogênico (FREEMAN & RODRIGUES, 1993). A condição inversa também pode ocorrer, um fungo endofítico, que vive de forma assintomática com seu hospedeiro, em algum momento pode se tornar um patógeno, por causa de um comportamento de estresse da planta (KOGEL et al., 2006).

Várias definições constam na literatura a respeito de micro-organismos endofíticos. Petrini (1991) define endófitos como sendo aqueles micro-organismos que habitam o interior das plantas, sem aparentes efeitos negativos no hospedeiro. Hallmann e colaboradores (1997) consideram que endófitos são aqueles microrganismos que podem ser recuperados do interior de plantas saudáveis após uma desinfestação externa, a fim de eliminar os micro-organismos epifíticos, entretanto uma das definições proposta mais recentemente, diz que micro-organismos endofíticos são aqueles que podem ou não crescer em meios de cultura e que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos a seus hospedeiros e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais (AZEVEDO & ARAÚJO, 2007).

A introdução dos fungos nas plantas ocorre por várias vias, sendo uma das principais, por meio das raízes, por ranhuras ocorridas pelo atrito com o solo durante o crescimento, aberturas naturais tais como estômatos e hidatódios (WAGNER & LEWIS, 2000; AZEVEDO, 2013). A colonização dos endofíticos pode ser intracelular, podendo ocorrer em uma única célula, intercelular e sistêmica (STONE et al., 2000). O xilema pode ser utilizado como meio que permite a movimentação passiva dos fungos endofíticos na planta (WAGNER & LEWIS, 2000), Araújo e colaboradores (2002) afirmam que os mais distintos órgãos vegetais como folhas, ramos, caules, raízes, estames, polén, ovários, anteras podem ser colonizados. Em geral, nas comunidades endofíticas, ocorre dominância de algumas poucas espécies em um determinado hospedeiro, havendo, também, certo grau de especificidade endofítico-hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

Alguns fatores podem influenciar a frequência de infecção dos fungos endofíticos, tais como: altitude, umidade, densidade da copa do hospedeiro, precipitação e o próprio hospedeiro (KUMARESAN & SURYANARAYNAN, 2001), associados aos fatores acima citados, alguns estudos mostram que a diversidade de fungos endofíticos é maior no período de chuvas, quando a dispersão de esporos também é maior (FAETH & HAMONN, 1997; COLLADO et al., 1999). Em geral, nas comunidades endofíticas, ocorre dominância de algumas poucas espécies em um determinado hospedeiro, havendo, também, certo grau de especificidade endofítico-hospedeiro (AZEVEDO, 1998).

Os fungos endofíticos são distinguidos em dois grupos principais; balansiaceos e não-balansiaceos. Endofíticos balansiaceos são grupos de ascomicetos pertencentes aos gêneros *Epichloe* e *Balansia* (anamorfos *Neotyphodium* e *Ephelis*) se desenvolvem sistêmica e intercelularmente e são transmitidos verticalmente através de sementes (SCHULZ & BOYLE, 2005). Os endofíticos não-balansiaceos, são transmitidos horizontalmente e a maioria pertence ao filo Ascomycota, estes tem sido isolado praticamente em todas as plantas (ARNOLD et al., 2001; SCHULZ & BOYLE, 2005).

As relações entre endofíticos/planta podem ser simbióticas, neutras, fitopatológica, mas a condição bastante comum que ocorre entre fungos e plantas é a simbiose (KOGEL et al., 2006). Os fungos endofíticos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários, conseqüentemente melhoram o desempenho de seu hospedeiro, protegendo-o de herbívoros, patógenos e de situações ambientais adversas, por outro lado os endofíticos recebem proteção e nutrientes do hospedeiro (CLAY & SCHARDL, 2002; ESPOSITO & AZEVEDO, 2010). Existe um equilíbrio entre os dois organismos, determinado pelo poder de virulência do fungo e a defesa da planta. Esse balanço pode ser alterado, desenvolvendo uma diminuição da defesa da planta ou aumentando a virulência do fungo, desequilibrando a relação simbiose (SAIKKONEN et al., 2004; SCHULZ et al., 2002).

A habilidade de biotransformação também é outro recurso que os fungos endofíticos possuem, metabólitos tóxicos produzidos pela planta hospedeira são biotransformados por endófitos que fazem a desintoxicação, e com efeito podem produzir novos metabólitos bioativos (ZIKMUNDOVA et al., 2002; SAUNDERS & KOHN, 2009). A interação metabólica de um endofítico com seu hospedeiro

pode levar a síntese de uma variedade de produtos naturais bioativos, com propriedades farmacológicas (STROBEL & DAISY, 2003).

Assim, espécies vegetais que sintetizam alguma substância com possível utilização farmacológica, podem ter a produção desse produto acentuada, se o mesmo ocorrer em algum indivíduo da sua população endofítica (CHANDRA, 2012). Fungos endofíticos podem produzir a mesma substância que o hospedeiro, essa habilidade pode ser justificada pela transferência gênica ocorrida durante os mecanismos evolutivos (ZHANG et al., 2006). Pesquisas feitas por Maehara e colaboradores (2013), resultaram no isolamento de fungos endófitos associados com *Cinchona ledgeriana* (Rubiaceae), e todos produziram o mesmo alcaloide (Cinchona) que o hospedeiro. Outros exemplos quanto à ocorrência de moléculas em plantas hospedeiras e fungos endofíticos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Substâncias que ocorrem em plantas hospedeiras sintetizadas também por fungos endofíticos

Planta Hospedeira	Fungo endofítico	Substância produzida	Rendimento	Referência
<i>Capsicum annuum</i>	<i>Colletotrichum capsic</i>	Taxol	687 µg/L	Kumaran et al., (2011)
<i>Taxus cuspidata</i>	<i>Pestalotiopsis versicolor</i>	Taxol	478 µg/L	Kumaran et al., (2010)
<i>N. foetida</i>	<i>E. infrequens</i>	Camptotecina	49.6 µg/g	Amna et al., (2006)
<i>N. foetida</i>	<i>Nodulisporium sp.</i>	Camptotecina	5.5 µg/g	Rehman et al., (2009)
<i>C. roseus</i>	<i>oxysporum Unidentified</i>	Vimblastina	0.205 µg/L	Yang et al., (2004)
<i>P. hexandrum</i>	<i>Trametes hirsuta</i>	Podofillotoxina	30 µg/g	Puri Nazir e Chawla (2006)
<i>Taxus media</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Paclitaxel	800 µg/g	Zhang et al., (2009)
<i>Taxus chinensis</i>	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Paclitaxel	846.1 µg/g	Liu et al (2009)
<i>Sabina recurva</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Podofillotoxina	28 µg/g	Kour et al (2008)

Um quesito relevante para a prospecção de fungos endofíticos é verificar o histórico quimiotaxonômico da planta hospedeira. A espécie vegetal *Duroia macrophylla* pertence à família Rubiaceae, espécies dessa família apresentam elevada importância econômica e terapêutica. A família Rubiaceae descrita por Antoine Laurent de Jussieu possui muitos gêneros (630), nos quais se distribuem mais de 10.200 espécies vegetais cosmopolitas, algumas de áreas tropicais, com representantes arbóreos, arbustivos, lianas e ervas (MABBERLEY, 1997).

Estudos fitoquímicos realizados com *Duroia macrophylla* apontaram grande potencial terapêutico das substâncias presentes nessa planta, sendo isolados o alcaloide indólico (raunitidina) (NUNEZ et al., 2009), 9-methoxyajmalicina e 10 methoxyajmalicina (NUNEZ, et al., 2012). Martins e colaboradores (2013) isolaram de *Duroia macrophylla* ácido ursólico e ácido oleanólico sendo o primeiro relato destes dois triterpenos no gênero *Duroia*, estes triterpenos apresentaram atividade contra a *M. tuberculosis*, também foram isolados 8 alcaloides indólicos, os quais geram uma patente com número de registro: BR1020140308636. O estudo dos alcaloides indólicos isolados dessa espécie, também geraram uma patente de nº: PI10201203380 (NUNEZ et al., 2012), além de ser tratar de uma estrutura molecular inédita, os testes realizados em células tumorais exibiram resultados satisfatórios, justificado pela efetiva atividade anticancerígena nas células testadas, fato que o caracteriza como potencial candidato para tratamentos neoplásicos.

Na pretensão de aprofundar os estudos científicos sobre esses alcaloides e suas potencialidades biotecnológicas, como também a possível realização de ensaios em fases pré-clínicas é necessária obter maiores quantidades da substância. Assim, essa pesquisa visou a busca por fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* que possam produzir os mesmos alcaloides que seu hospedeiro e/ou outras substâncias que possam ser bioativas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Verificar o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos isolados de *Duroia macrophylla* quanto à produção de moléculas bioativas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter fungos endofíticos de *Duroia macrophylla*;
- Selecionar fungo(s) produtor (es) de substâncias interessantes;
- Realizar análises dos extratos através de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) com diferentes reveladores químicos e físicos;
- Fracionar os extratos interessantes por Cromatografia em Coluna aberta;
- Caracterizar as substâncias isoladas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM);
- Avaliar a toxicidade dos extratos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A coleta do material vegetal da *Duroia macrophylla* foi realizada em 10/05/2013 e 10/07/2014, na reserva ambiental Adolpho Ducke, (Figura 2) localizada no Km 26 da Estrada Manaus-Itacoatiara (AM-010). Foram coletadas folhas de boa qualidade fitossanitária e saudáveis, transportadas até o Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) para serem processadas. As exsicatas foram depositadas no herbário do INPA, com número de depósito 259228 e 261554, respectivamente. Duas coletas foram realizadas com o mesmo espécime.



Figura 2: Área de coleta

3.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Para o isolamento foram preparados meios de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e Ágar Sabouraud (SB). Os meios juntamente com outros materiais (cabos de bisturi, pinças, béqueres, placas de Petri, etc.) foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Antes do procedimento de desinfestação, as folhas foram submetidas a uma pré-desinfestação sendo lavadas com sabão neutro em água corrente. Posteriormente iniciou-se a etapa de desinfestação, realizada em cabine de segurança biológica. Os agentes desinfestantes foram álcool 70% e hipoclorito 2,5% e a metodologia foi conforme está descrito na figura 3.

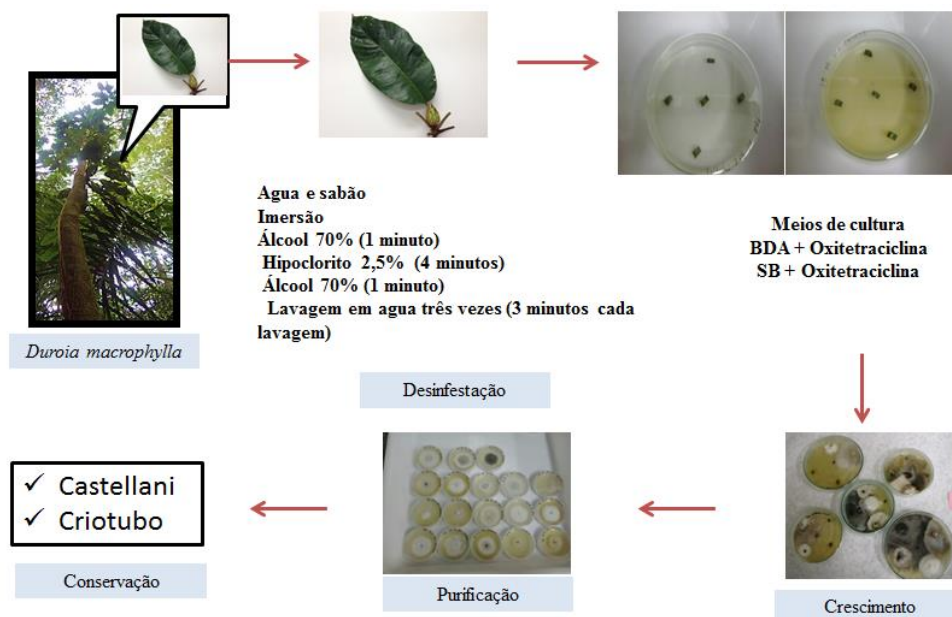


Figura 3: Procedimento de desinfestação, isolamento e purificação dos fungos endofíticos

Após a desinfestação as folhas foram cortadas em pequenos fragmentos com auxílio de bisturi e pinça. Os fragmentos obtidos foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA e SB acrescidos de antibiótico oxitetraciclina (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), sendo posteriormente incubadas em BOD a 30 °C por 48 horas. Foi realizado o controle da última água da lavagem a fim de verificar a eficiência do método de desinfestação quanto à eliminação da microbiota epifítica. Foram retirados 500 μL e inoculados em três placas contendo meios de cultura SB e BDA.

Passado 48 horas de inoculação dos fragmentos, foi possível iniciar o isolamento das colônias que surgiam. Estas foram repicadas para novos meios de cultura (BDA ou SB) a fim de realizar a purificação das colônias. O tempo total de isolamento foi de sete dias. Posteriormente, os isolados foram conservados através de duas metodologias distintas:

- Método castelani: pequenos blocos da associação de micélio/ágar foram colocados em frascos de vidro contendo água destilada estéril, estes foram mantidos em recipiente adequado a temperatura ambiente.
- Criopreservação: um fragmento do micélio de cada fungo foi transferido para uma solução contendo caldo nutriente e glicerol a 20% v/v, e mantidos em ultrafreezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A identificação taxônomica foi realizada pela fundação André Toselo.

3.3 SELEÇÃO DOS FUNGOS PRODUTORES DE SUBSTÂNCIAS DE INTERESSE

3.3.1 Avaliação prévia para a produção de metabólitos

Os fungos isolados foram cultivados em dois meios de cultura, os fungos crescidos em BDA foram inoculados em Batata Dextrose Caldo, acrescido de 0,2% de extrato de levedura (BDL), e os fungos isolados em SB foram inoculados em Sabouraud Dextrose Caldo, também com 0,2% de extrato de levedura (SBL). O experimento foi realizado em duplicata, para cada fungo utilizou-se Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura. Os Erlenmeyer foram acondicionados em incubadora de bancada com agitação a 30 °C e 120 rpm, por um período de 20 dias. Após o período de crescimento estabelecido, os fluidos fermentados foram separados da massa micelial por filtração a vácuo e foram realizadas as extrações tanto do micélio quanto dos líquidos fermentados. Procedimentos descritos no item 3.4.

Para obtenção de maior quantidade de extrato dos fungos selecionados na etapa descrita no item 3.3.1 foi realizado o cultivo com maiores números de repetições. Foram utilizados 10 frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meios de cultura estéreis, os frascos foram acondicionados em incubadora shaker a 30 °C, com agitação de 120 rpm durante 20 dias. Após o tempo de crescimento foi realizada a obtenção dos extratos.

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS

3.4.1 Extração dos micélios

A massa micelial de cada fungo foi imersa em acetato de etila. Para a obtenção dos conteúdos intracelulares, os frascos contendo os micélios foram postos em banho ultrassom e prosseguiu-se o procedimento de extração por vinte minutos, as extrações foram repetidas três vezes (Figura 4).

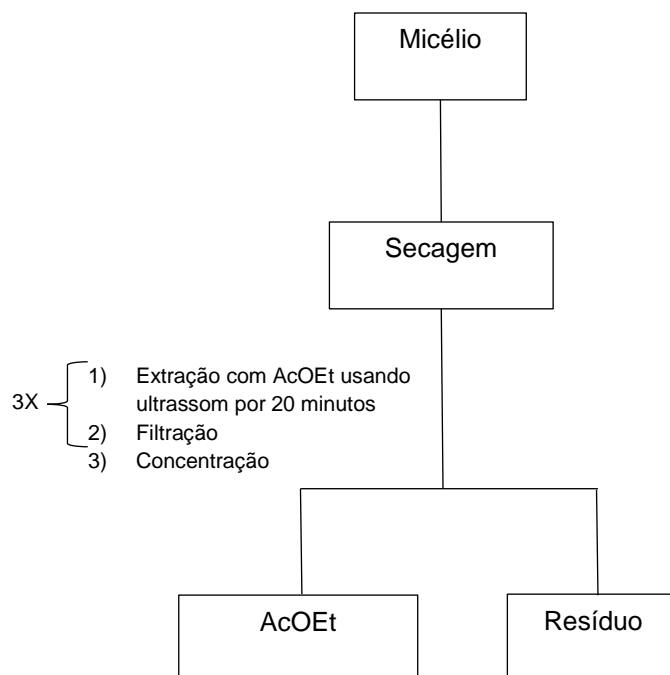


Figura 4: Fluxograma para obtenção dos extratos de micélios

3.4.2 Extração dos caldos

Os caldos foram submetidos à partição líquido-líquido utilizando solventes orgânicos (Diclorometano e Acetato de Etila) em ordem de polaridade crescente na proporção de 1:1 v/v. A extração foi feita em funil de separação (1000 mL) e repetida três vezes para cada solvente (Figura 5).

Os extratos orgânicos tanto dos caldos quanto dos micélios foram concentrados em rota evaporador e posteriormente levados a cabine de exaustão de gases.

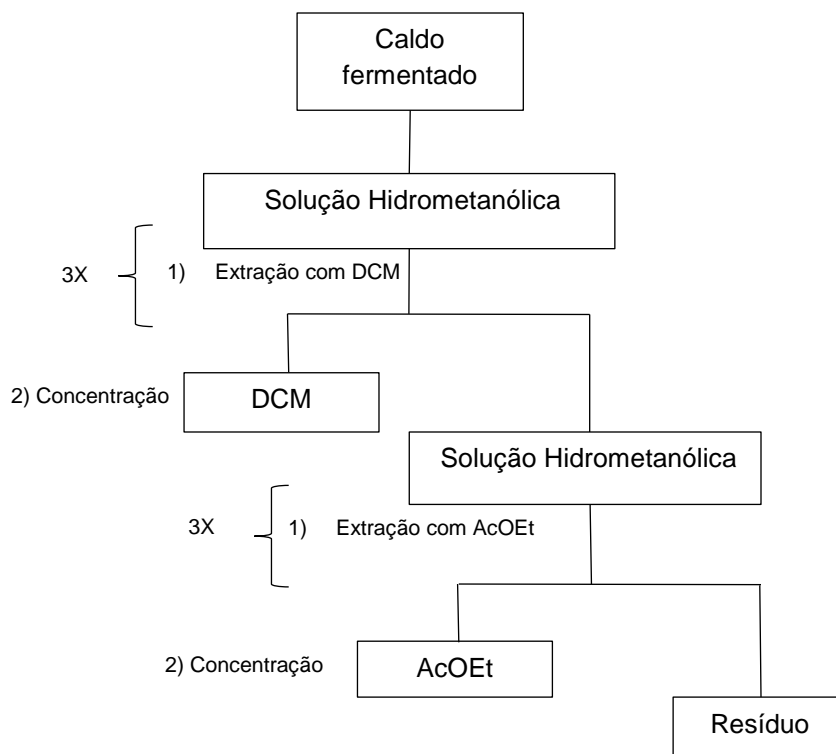


Figura 5: Fluxograma para obtenção dos extratos dos caldos fermentados

3.5 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

3.5.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

A análise inicial dos extratos foi feita por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) empregando cromatofolhas de alumínio, com sílica gel com indicador de fluorescência UV 254 nm. A eluição dos extratos foi realizada com diferentes solventes orgânicos, em diferentes proporções. Quanto ao indicativo de substâncias de interesse presentes nos extratos foram empregados reveladores físicos: luz ultravioleta (comprimento de onda de 254 nm e 365 nm), e reveladores químicos: sulfato cérico e reagente de Dragendorff.

3.5.2 Fracionamento dos extratos em coluna cromatográfica.

As análises em CCDC serviram de base para a escolha do método cromatográfico de fracionamento, quanto à fase estacionária e dos eluentes mais eficientes na separação dos extratos.

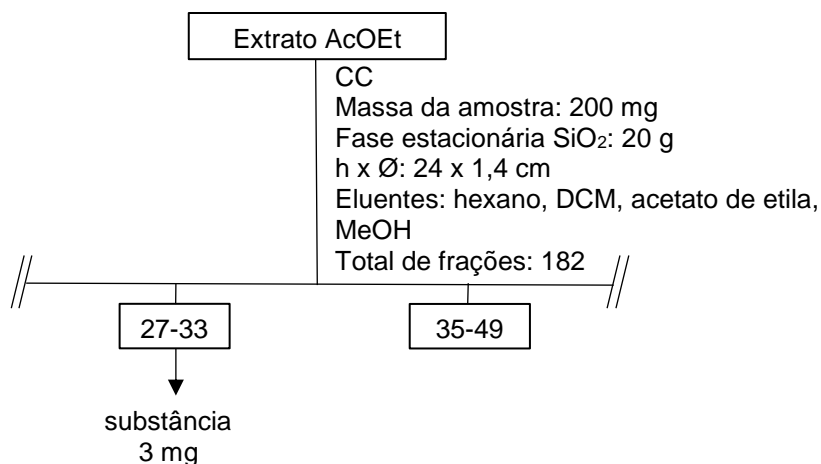


Figura 6: Fluxograma de fracionamento do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13

Tabela 2: Sistemas de eluição e frações obtidas da coluna cromatográfica do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13

Cromatografia em coluna aberta	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hexano/DCM 1:1	1-4
Hexano/DCM 4:6	14-30
Hexano/DCM 3:7	31-45
DCM 100%	46-60
DCM/AcOEt 9:1	61-76
DCM/AcOEt 8:2	77-96
DCM/AcOEt 7:3	97-138
DCM/AcOEt 1:1	139-158
AcOEt100%	159-165
AcOEt/MeOH 1:1	166-170
MeOH 100%	171-182

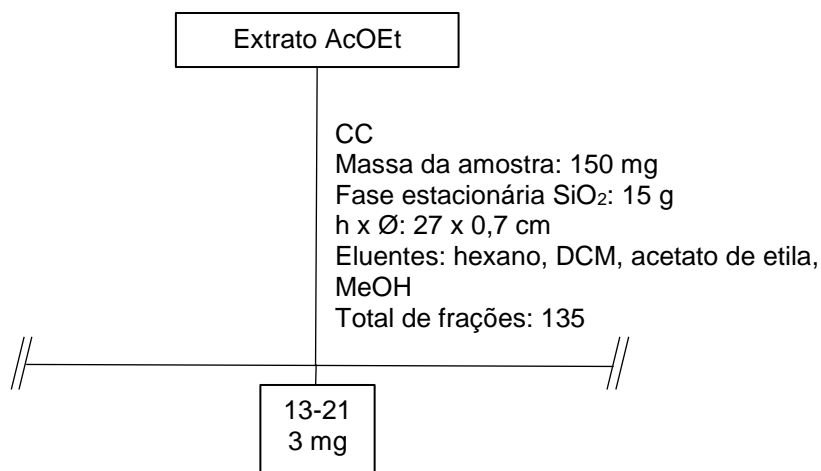


Figura 7: Fluxograma de fracionamento do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL DM 2 G15

Tabela 3: Sistemas de eluição e frações obtidas da coluna cromatográfica do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM2-G15

Cromatografia em coluna aberta	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hexano/DCM 1:1	1-6
Hexano/DCM 3:7	7-28
Hexano/DCM 2:8	29-38
DCM 100%	39-50
DCM/AcOEt 9:1	51-65
DCM/AcOEt 8:2	66-85
DCM/AcOEt 7:3	86-98
DCM/AcOEt 1:1	99-116
AcOEt100%	117-128
AcOEt/MeOH 1:1	129-135

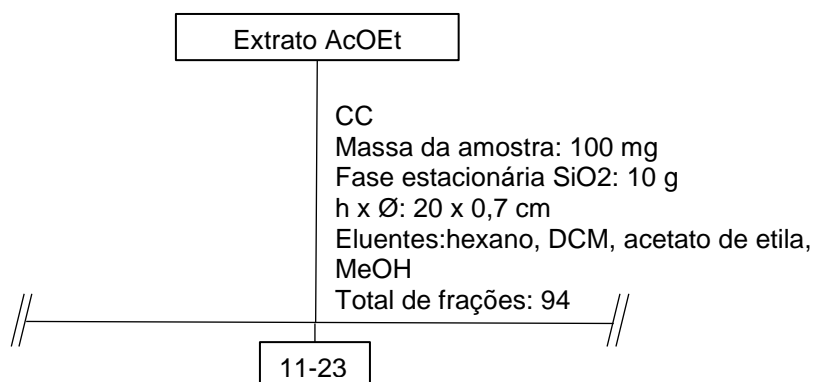


Figura 8: Fluxograma de fracionamento do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM8-G2

Tabela 4: Sistemas de eluição e frações obtidas da coluna cromatográfica do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM8-G2

Cromatografia em coluna aberta	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hexano/DCM 4:6	1-8
Hexano/DCM 3:7	9-26
DCM 100%	27-33
DCM/AcOEt 8:2	34-44
DCM/AcOEt 7:3	45-67
DCM/AcOEt 1:1	68-82
AcOEt 100%	83-94

3.6 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS E ESPECTROMÉTRICAS

3.6.1 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C uni e bidimensionais foram realizados no espectrômetro Bruker Fourier 300, operando em 300 MHz para o núcleo de ^1H e em 75 MHz para o núcleo de ^{13}C . Como padrão interno foi utilizado o solvente deuterado no qual as amostras foram solubilizadas.

3.6.2 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um modelo de espectrômetro de massas UltrOTOFG (ESI-TOF Mass Spectrometer, Bruker Daltonics) ligado a um sistema de cromatografia (HPLC) coluna ODS 50 x 2,0 mm, concentração da amostra = 1 mg/mL em acetonitrila (ACN); Fluxo = 0,4 mL/min; Inj = 1 μL - split de 0,05 mL (MS)/0,29 mL (desc) e P2840 psi. Sistema de eluição A (H_2O + 0,1% ácido fórmico) /B (ACN + 0,1% ácido fórmico). Condição de eluição: 0 a 10 min - 50% de B, de 10 a 11 min - 50 a 100% de B, de 11 a 12 min - 100% de B, de 12 a 13 min - 100 a 50% de B e de 13 a 14 min 50% de B.

3.7 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.7.1 Ensaios de toxicidade em *Artemia salina*

Para o ensaio de toxicidade foi realizado o seguinte procedimento, pesou-se 38 g de sal marinho, o mesmo foi solubilizado em 1 L de água destilada, sendo esta solução posteriormente filtrada. Foram adicionados 10 mg de cistos de

Artemia salina os quais foram deixados sob luz artificial por 48 horas em temperatura ambiente. Foram pesados 10 mg de cada extrato, os mesmos foram dissolvidos em 1 mL de DMSO.

Os ensaios foram realizados em placa de 24 poços, sendo que cada poço primeiramente recebeu 1 mL de água salina contendo *A. salina* (10 indivíduos por poço). Posteriormente foram adicionadas diferentes concentrações dos extratos em triplicata, além de um controle salino e um controle do solvente DMSO. A placa foi incubada por 24 horas sob luz artificial e temperatura ambiente. Após o tempo decorrido, foram contados manualmente os indivíduos vivos e os mortos.

3.7.2 Ensaio da Atividade antibacteriana

Em Placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, foram feitas cavidades de 6 mm de diâmetro nas quais foram depositadas alíquotas de 100 µL de cada extrato na concentração de 5 mg/mL, foi utilizado antibiótico oxitetraciclina na concentração de 125 µg/mL como controle positivo. Nas placas foram inoculados os micro-organismos teste (Quadro 1), posteriormente as placas foram colocadas em estufa por 24 horas e passado esse período, foi realizada a medição dos halos (em mm). A aferição dos diâmetros foi realizada com paquímetro.

Microrganismos teste	Sigla utilizada no ensaio	Temperatura de crescimento
<i>Edwardsiella tarda</i> (ATCC 15947 T)	ET	37 °C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145 T)	PA	37 °C
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883 T)	KP	37 °C
<i>Providencia rettgeri</i> (ATCC 29944 T)	PR	37 °C
<i>Salmonella enteritidis</i> (ATCC 13076 T)	SE	37 °C
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11775 T)	EC	37 °C
<i>Serratia marcescens</i> (ATCC 13880)	SM	37 °C
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12600 T)	AS	37 °C
<i>Aeromonas hydrophyla</i> (ATCC 7966 T)	AH	30 °C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (ATCC 13525 T)	PF	30 °C
<i>Nocardia brasiliensis</i> (ATCC 19296 T)	NB	30 °C
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579 T)	BC	30 °C

Quadro 1: Bactérias testes utilizadas para avaliar a atividade dos extratos

3.7.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

Os extratos avaliados neste teste foram os extratos AcOEt do micélio dos fungos BDL-DM 5-G13; BDL-DM8-G12; e BDL-DM2-G15.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada medindo a capacidade de sequestro de radicais livres do radical Fe^{3+} e do DPPH. Ao adicionar o provável antioxidante presente nos extratos, ocorre a perda do radical, que é evidenciada pela redução da absorbância em determinado comprimento de onda, onde as diminuições são correlacionadas em uma curva com o antioxidante padrão, o antioxidante padrão escolhido foi o ácido ascórbico.

Os resultados obtidos foram expressos em equivalência com o ácido ascórbico, o termo “equivalência com o ácido ascórbico” permite correlacionar à resposta obtida do extrato testado com a do antioxidante padrão e quanto mais próximo de 1,0 mais semelhante é a capacidade antioxidante da amostra em relação ao ácido ascórbico.

A solução do ácido ascórbico foi preparada com 44 mg diluída em 50 mL de água deionizada. A partir desta solução foram feitas diluições com as seguintes concentrações: 0, 88, 176, 352, 526, e 704 g/mL. Para o preparo da solução de DPPH foram solubilizados 28 mg do mesmo em 1 mL de DCM, posteriormente foi adicionado MeOH até atingir o volume de 100 mL. Para o preparo da solução de Fe^{3+} , 8,6344g de sulfato de férrico foram diluídos em uma solução de ácido clorídrico (HCl) 1% (v/v), onde posteriormente a solução foi transferida para um balão volumétrico com capacidade de 1 L. Após a dissolução o volume restante foi preenchido com a solução de ácido clorídrico. Para a visualização da ação oxidante do ferro, foi utilizado 1,10-fenantrolina, sendo preparada uma solução com 0,25 g de 1,10-fenantrolina diluídos em solução tampão de acetato de sódio (pH 4,5) com volume total de 100 mL.

Foram realizadas curvas-padrão, com ácido ascórbico, para cada agente oxidante: para curva com DPPH, foram adicionados em seis microtubos 990 μ L de DPPH e 10 μ L de ácido ascórbico nas diferentes concentrações, sendo realizadas as leituras de absorbância após 30 minutos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517nm. Para a curva com o ferro foram adicionados 10 μ L do ácido ascórbico diluído em seis microtubos, em seguida 10 μ L de Fe^{3+} e por fim, 980 μ L de 1,10-fenantrolina, sendo realizadas leituras de absorbância

após uma hora em espectrofotômetro no comprimento de onda de 508 nm. Os dados foram registrados em uma planilha que mostra a linearidade da curva.

Em relação à preparação dos extratos, utilizou-se 5 mg estes foram solubilizados em Acetato de etila. Posteriormente cada amostra foi transferida para um balão volumétrico com volume final de 10 mL. Para o teste com DPPH foram transferidos 10 μ L da amostra para um microtubo seguido pela adição de 990 μ L da solução DPPH, onde a mistura foi homogeneizada por 30 minutos, após esse tempo foi feita a aferição da absorbância em comprimento de onda de 517 nm. Para o teste com o ferro foram transferidos 10 μ L da solução padrão de Fe^{3+} com concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ para um microtubo, seguido pela adição de 10 μ L da amostra e 980 μ L da solução de 1,10-fenantrolina 0,25% (m/v), onde a mistura foi homogeneizada. Após uma hora, foi medida a absorbância em comprimento de onda de 508 nm.

Foi realizado um teste controle para cada tipo de agente oxidante, onde o controle foi preparado da mesma forma como as amostras, substituindo-se a amostra por água deionizada (NOVAES, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Para o isolamento e purificação dos endófitos, foram utilizados dois diferentes meios de cultura; batata dextrose ágar (BDA), e Ágar Sabouraud, (SB). Ambos os meios possuem nutrientes primários para o crescimento de fungos. Entretanto, deve ser considerada a hipótese de que existem cepas fúngicas que tem seu desenvolvimento restrito a presença de nutrientes e condições particulares. Neste contexto, os fungos isolados foram os que melhores se adaptaram as condições de crescimento empregadas.

Considerando também, que cada microrganismo endofítico possui diferentes condições ótimas de cultivo, e como não faz parte dos objetivos de nosso trabalho determina-las, foi empregado a mesma metodologia para os endofíticos em estudo.

A metodologia empregada para desinfestação da microbiota epifítica se mostrou eficiente, uma vez que não houve crescimento microbiano nos controles. As condições de cultivo utilizadas permitiram o desenvolvimento de 46 morfotipos sendo que um total de 22 fungos cresceram em ágar Batata Dextrose (BDA), e 24 fungos em ágar Sabouraud (SB) conforme demonstrado na figura 9 Para a organização dos isolados foi realizada uma distribuição por grupos, levando em conta as semelhanças morfológicas quanto à cor das colônias, bordas, a observação do verso das placas, assim foram estabelecidos 15 grupos.

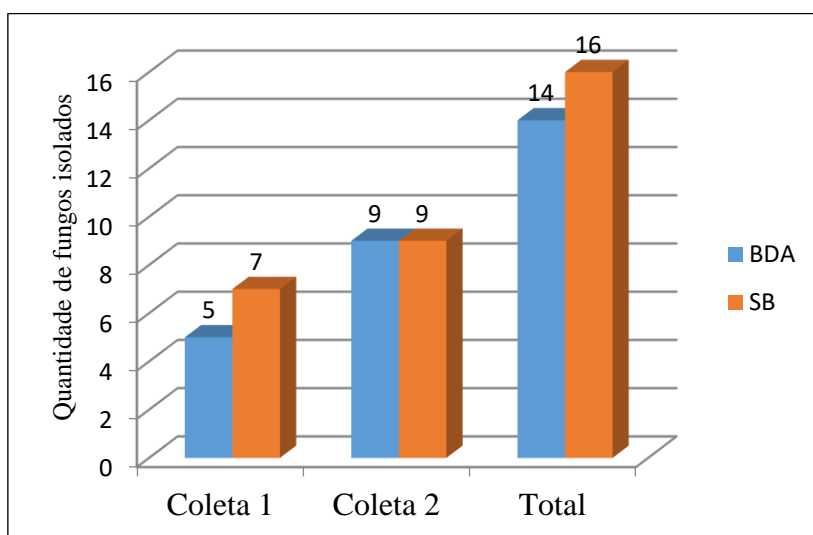


Figura 9: número de fungos isolados de acordo com os meios de cultura utilizados e as coletas feitas

De cada grupo foram selecionados alguns indivíduos para triagem quanto à produção de extratos, a tabela 5 apresenta os fungos cultivados e aqueles que foram selecionados estão marcados em vermelho.

Tabela 5: fungos selecionados para a triagem e quantidade das massas obtidas dos extratos

Código dos fungos	Massa de extrato AcOEt de micélio (g)	Massa da fase DCM obtida do caldo (g)	Massa da fase AcOEt obtida do caldo (g)
BDL DM 16 G7	0,0900	0,0028	0,0045
SBL DM DM5 1C G12	0,0288	0,0158	0,0088
BDL DM 1 1C G15	0,0235	0,0078	0,0063
BDL DM 4 2C G3	0,0211	0,0082	0,0072
BDL DM 6 3 C G8	0,0318	0,0035	0,0072
BDL DM 9 2C G3	0,0428	0,0037	0,0092
BDL DM 10 2C G7	0,0321	0,0022	0,0043
SBL DM 13 2C G14	0,0654	0,0018	0,0137
BDL-DM8-G2	0,0140	0,0048	0,0064
BDL DM 6 3C G6	0,0665	0,0085	0,0120
BDL DM 7 2C G3	0,0662	0,0047	0,0023
BDL DM 3 3C G10	0,0532	0,0083	0,0058
BDL-DM5-G13	0,0230	0,0131	0,0203
BDL DM 16 1C G1	0,0567	0,0154	0,0172
SBL-DM1-G12	0,0669	0,0003	0,010
BDL-DM2-G15	0,190	0,0085	0,0038
BDL DM 7 3C G7	0,0659	0,0032	0,0011
BDL DM 6 2C G3	0,0438	0,0015	0,0034
BDL DM 4 1C G11	0,0312	0,0019	0,0047
BDL DM 8 2C G12	0,0453	0,0138	0,0146

Um total de 20 fungos foram cultivados, desses, quatro indivíduos se mostraram relevantes para a produção de moléculas de interesse, as características macroscópicas e microscópicas para os quatro fungos são mostradas na figura 10.

Quanto ao crescimento dos endofíticos selecionados foi notório um crescimento rápido quando comparados a outros isolados.

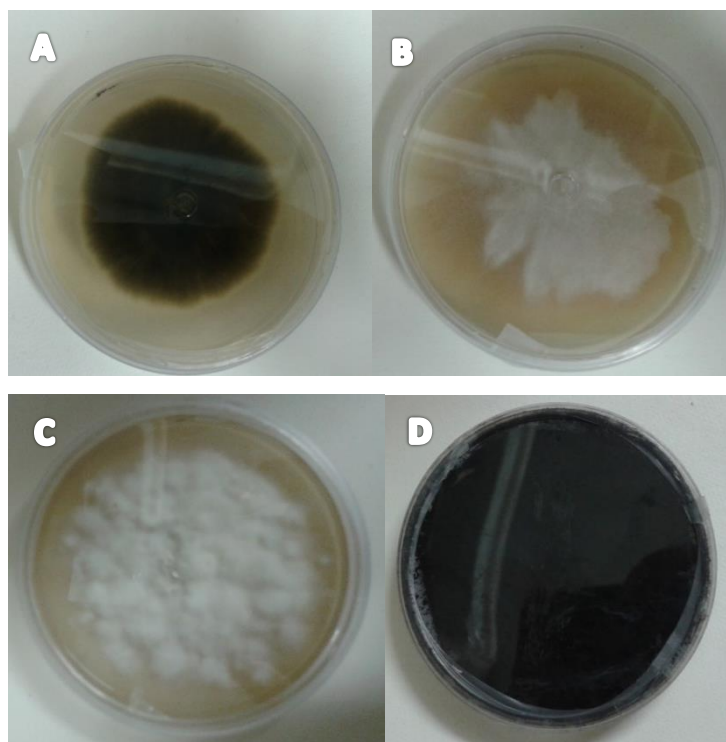


Figura 10: Aspectos morfológicos dos fungos: A) BDL-DM5-G13, B) BDL-DM2-G15, C) SBL-DM1-G12, D) BDL-DM8-G2

A partir da avaliação prévia quanto à produção de substâncias relevantes, os quatro fungos foram cultivados em meio líquido em escala ampliada, a fim de obter maior quantidade de massa.

4.2 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS

4.2.1 Fungo SBL-DM1-G12

A fase Acetato de Etila oriunda da partição líquido-líquido feita com o caldo fermentado, foi analisada em cromatoplasmas de CCDC e quando revelada com reagente Dragendorff, foi notório o surgimento da cor laranja reação que é característica para alcaloides (Figura 11). Posteriormente o espectro de RMN de ^1H confirmou a presença de alcaloide através nos sinais de hidrogênio nas regiões entre 9 e 10 ppm (figura 12 e 13), sinais nessa região são característicos da ligação de hidrogênio ligado a nitrogênio de alcaloide indólico.



Figura 11: CCDC revelada com reagente de Dragendorff, evidenciando a presença de alcaloide. Sistema de eluição utilizado AcOEt/Acetona 7:3

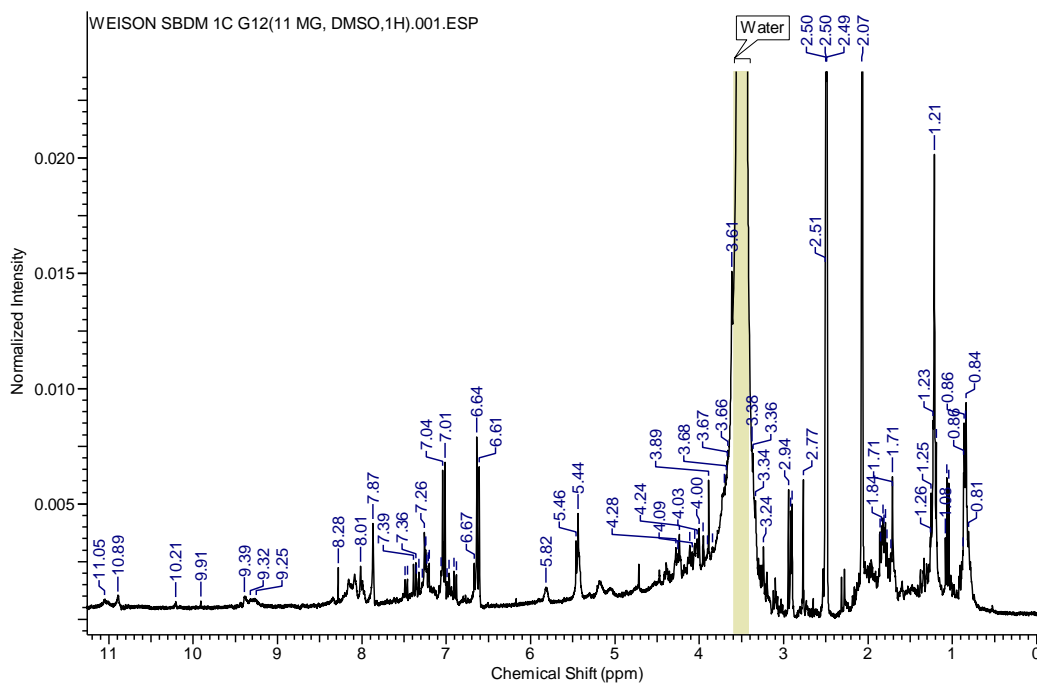


Figura 12: Espectro de RMN de ^1H da fase AcOEt do caldo bruto do fungo SBL-DM1-G12 (300 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$)

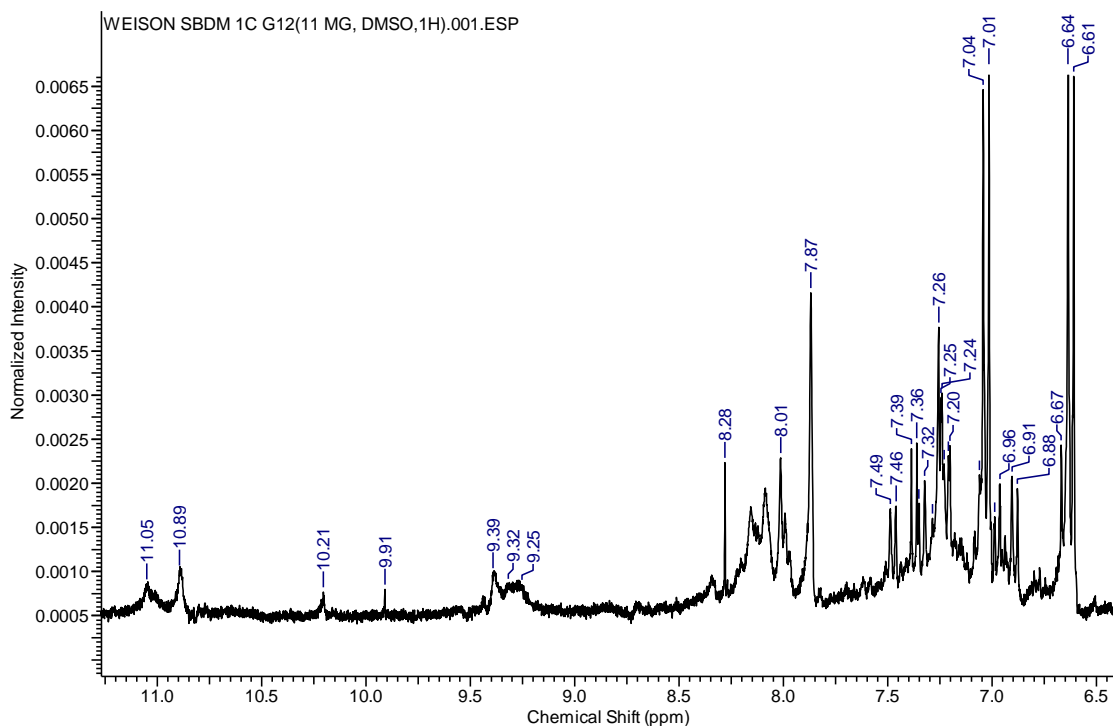


Figura 13: Ampliação da região entre 6,5 e 11,5 ppm, do espectro de RMN de ^1H da fase AcOEt do caldo bruto do fungo SBL-DM1-G12 (300 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$)

Após a constatação da presença de alcaloide foi realizado o cultivo com maior número de repetições para o fungo produtor da substância, após o período de crescimento foi feita a extração através da partição líquido/líquido do caldo, a fase AcOEt obtida teve massa de 100 mg. O extrato foi submetido à avaliação em CCDC, utilizou-se agente Dragendorff para revelar indícios da presença de alcaloides. Conforme apresentado na figura 14, não foram observados indícios da existência de alcaloides no extrato, pois não houve o surgimento da cor alaranjada.



Figura 14: CCDC revelada com reagente de Dragendorff evidenciando a ausência de alcaloides

A não produção de um determinado metabólito secundário pode ser justificada por repiques sucessivos que podem propiciar alterações nas características morfológicas, antigênicas, genéticas e de virulência em isolados fúngicos (CAVALCANTI, 2010). Conforme relatado por Kusari & Spiteller (2012) a redução da produção de metabólitos secundários sobre a repicagem repetida vezes em condições de monocultura axênicas caracteriza-se como um problema biotecnológico para a produção de substâncias bioativas a partir de endófitos.

As condições de fermentação *in vitro* tais como: o tipo de meio especificamente definido e composição, pontos de aeração, pO₂, pCO₂, pH, temperatura, agitação, são diferentes para o endófito quando comparadas ao meio ambiente da planta hospedeira, isso pode influenciar diretamente na obtenção de determinada substância (KUSARI et al., 2014).

Existem também outras razões que podem influenciar a produção de metabólitos secundários, Kusari e colaboradores (2013) relatam a interação de micro-organismos endofíticos com outros organismos, como por exemplo, comunicação endófitos-endófitos através de mecanismos moleculares. Linné (2007) relata que a produção de alcaloides tem um papel ecológico de proteção e o estímulo para a produção ocorre em interação com outros organismos.

Considerando o fato que endófitos residem dentro das plantas, é concebível que as plantas exercem influência sobre processos metabólicos dos endófitos. *Neotyphodium* é um endofítico de *Lolium multiflorum*, a produção de alcaloide (lolitrem) pelo fungo quando em associação com a planta é elevada, entretanto é indetectável em culturas de fungos cultivados *in vitro*, dando suporte à noção de que a sinalização planta pode ser necessária para induzir a síntese do alcaloide (YOUNG et al., 2006).

Em outro estudo Kusari e colaboradores (2011) verificaram a ausência de produção de camptotecina em um endofítico que antes produzia essa substância, constataram que a produção era ditada por uma enzima chave strictosidina sintase presente somente na planta hospedeira e não no fungo endofítico, esta foi a razão para a redução substancial da produção de camptotecina em subcultura sob condições axênicas.

Assim, pode considerar que a perda produtiva do alcaloide pelo fungo SBL-DM1-G12 possivelmente seja por causa da ausência de algum mecanismo molecular sinalizado pela *Duroia macrophylla*.

4.2.2 Fungo BDL-DM5-G13

Para o fungo BDL-DM5-G13 o extrato AcOEt do micélio se mostrou interessante, pois as análises de placas cromatográficas (CCDC) indicaram a possível presença de terpenos, quando reveladas com sulfato cérico. Foi notória também a presença de substâncias fluorescentes, indicadas pela Luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. O extrato não evidenciou a presença de alcaloides conforme mostra a figura 15.

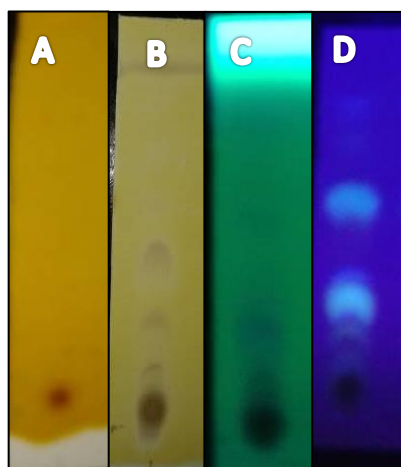


Figura 15: CCDC do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13, revelada com (A) reagente de Dragendorff, (B) sulfato cérico, (C) luz UV 254 nm e (D) luz UV 365 nm. Sistema de eluição DCM/AcOEt 9:1

Uma vez que o espectro de RMN de ^1H (Figura 16) mostrou sinais na região de substâncias aromáticas (entre 6 e 8 ppm), este fungo foi escolhido para ser cultivado em maior escala a fim de poder fracioná-lo e obter substâncias puras.

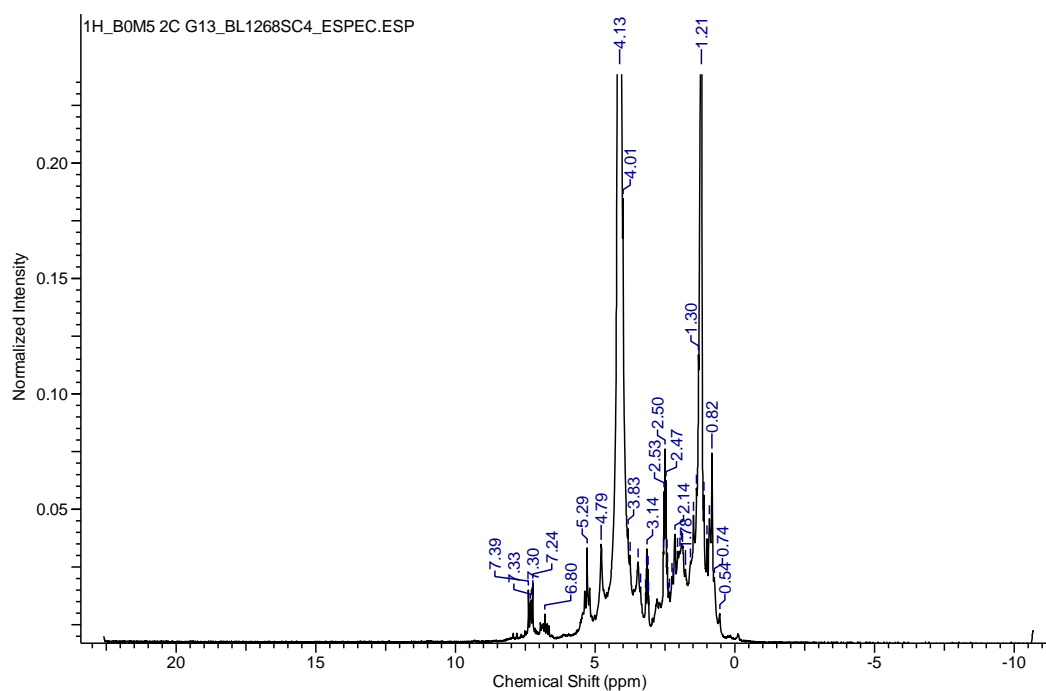


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em CDCl_3) do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13

Foi realizada a extração do micélio utilizando AcOEt, obteve-se 230 mg de extrato, dos quais 200 mg foram utilizados para o fracionamento em coluna cromatográfica, o fracionamento do extrato resultou em 182 frações, destas as que se mostraram interessantes foram as frações 27-33 (3 mg) e 39-45 (20 mg).

As frações 27 a 33 foram analisadas em CCDC, com o revelador físico luz UV nos comprimentos de onda 254 e 365 nm, em que foi observada a presença de substâncias cromóforas emitindo fluorescência; e para o revelador químico sulfato cérico, foi notada a presença de manchas laranja (Figura 17). As mesmas foram reunidas e submetidas a análises espectroscópicas de RMN de ^1H (Figura 18 e 19), bidimensionais (HMBC, HSQC e COSY) e espectrometria de massas.

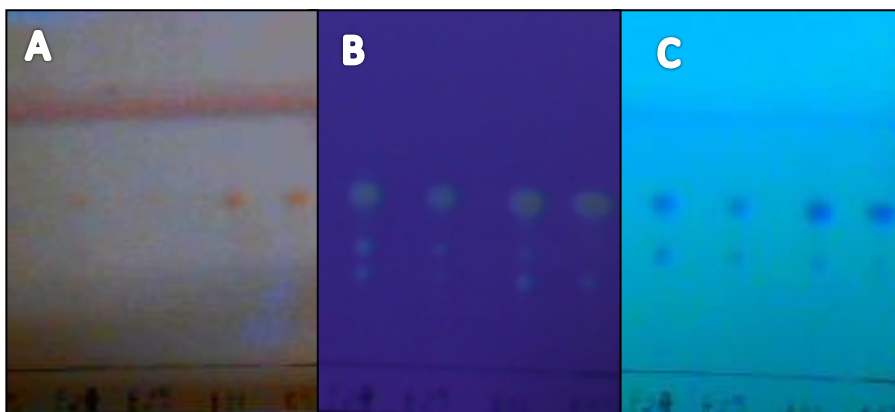


Figura 17: Cromatofolhas CCDC das frações 27 a 33 Reveladas; A) sulfato cérico, B) U.V 365 nm, C) U.V 254 nm. Sistema de eluição utilizado DCM 100%

A análise dos espectros de RMN de ^1H revelou a presença de apenas 4 sinais, dois na região de aromáticos (7,30 e 8,7 ppm) ambos com integral para 1H, sendo *d*, com $J = 9,3$ Hz e outros dois sinais na região de alifáticos, em 3,00 e 3,45 ppm, com integral para 2H, sendo *t*, com $J = 7,0$ Hz. Os espectros bidimensionais mostraram que continha 11 C e o espectro de massas apresentava um pico com m/z de 319,06 u.m.a Com estas informações foi proposta a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$. As correlações foram feitas com base nos espectros bidimensionais de HSQC e HMBC (Figura 20 e 21).

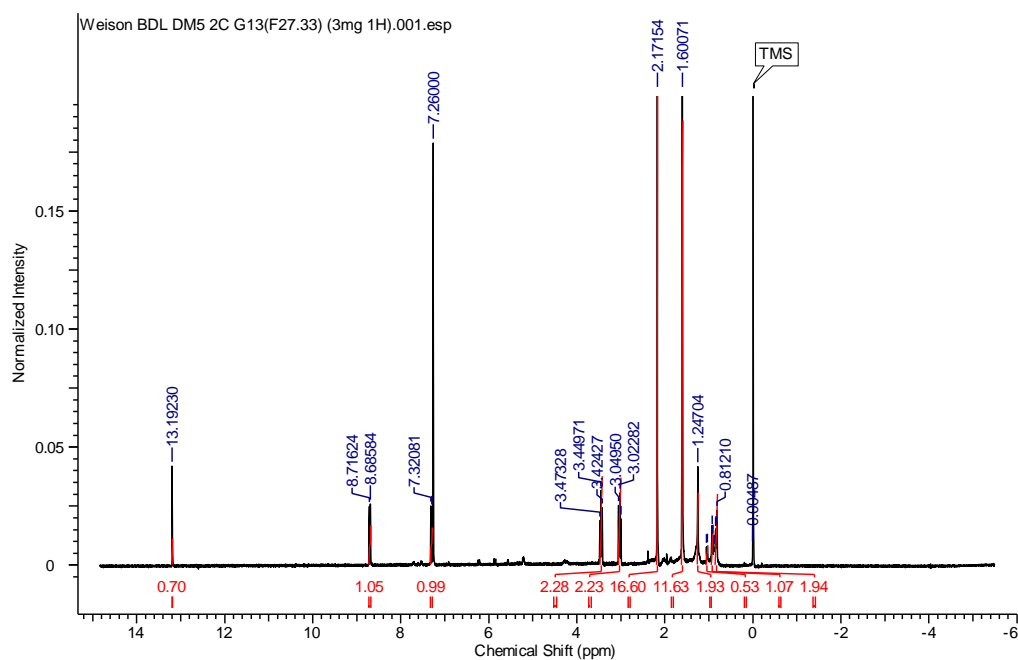


Figura 18: Espectro de RMN de ^1H da fração 27-33 do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13 (300 MHz, em CDCl_3)

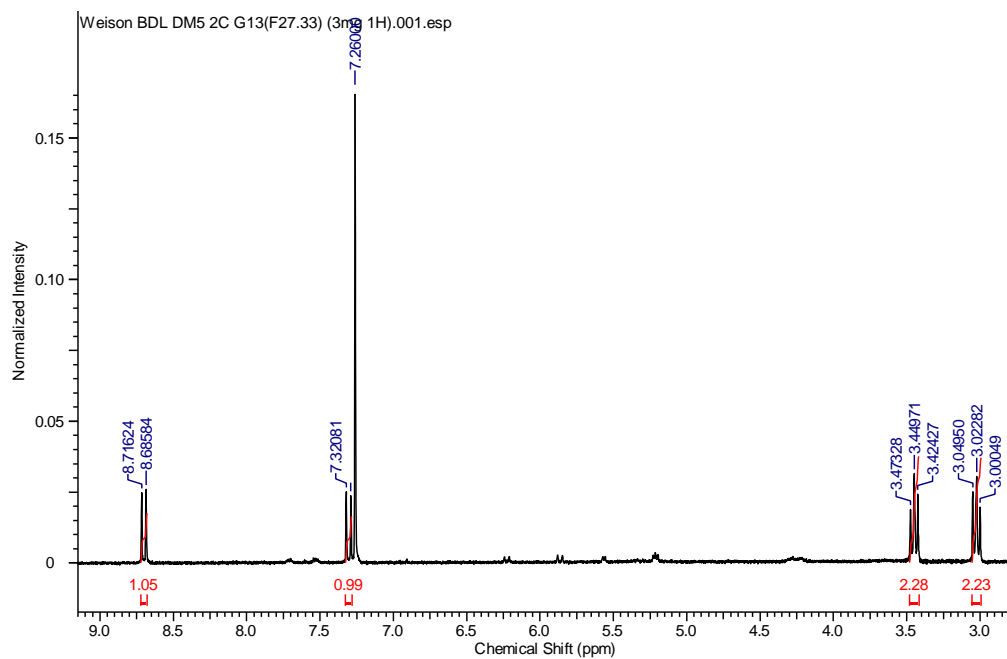


Figura 19: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da fração 27-33 do extrato AcOEt do micélio do BDL-DM5-G13 (300 MHz, em CDCl_3)

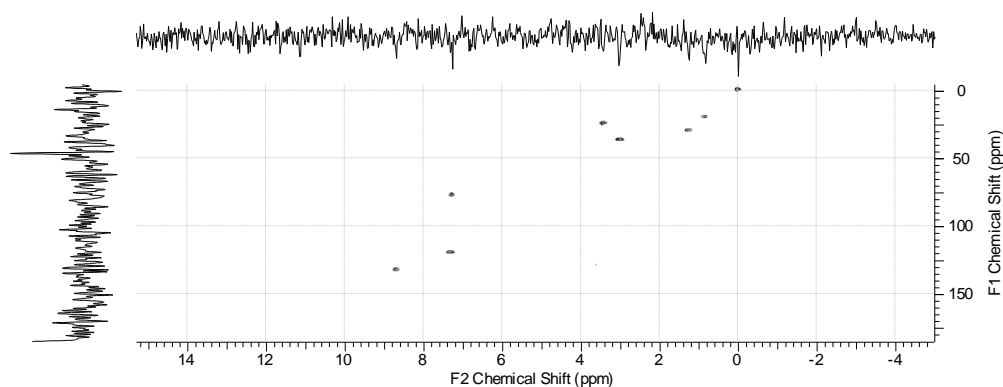


Figura 20: Mapa de contorno de HSQC da fração 27-33 do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13 (300 MHz, em CDCl_3)

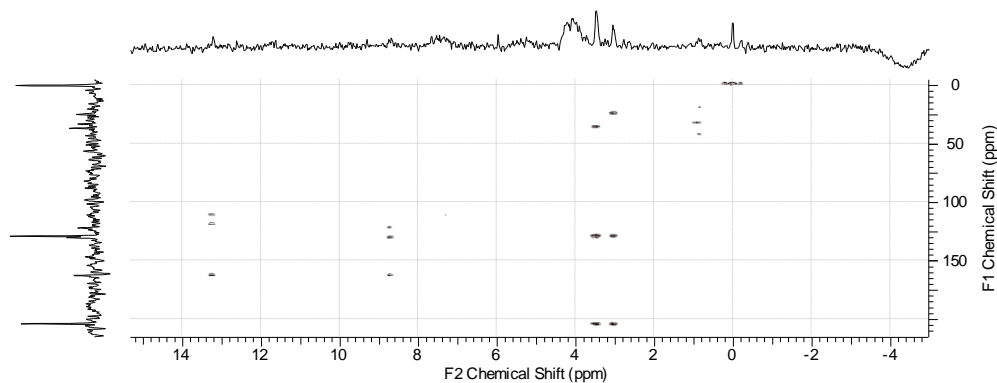


Figura 21: Mapa de contorno de HMBC da fração 27-33 do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM5-G13 (300 MHz, em CDCl_3)

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) da fração 27-33 (4,9-dihidroxi-1,2,11,12-tetrahydroperileno-3,10-quinona)

Posição	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	HMBC
1, 12	24,6	3,45 (2H, <i>t</i> , $J = 7,0$ Hz)	C-2, C-3, C-12b, C-12 ^a
2, 11	36,4	3,00 (2H, <i>t</i> , $J = 7,0$ Hz)	C-1, C-3, C-12 ^a
3, 10	203,6		
3a, 9a	111,0		
4, 9	162,2		
5, 8	118,8	7,30 (1H, <i>d</i> , $J = 9,3$ Hz)	C-3a, C-6 ^a
6, 7	131,7	8,70 (1H, <i>d</i> , $J = 9,3$ Hz)	C-4, C-3b, C-6 ^a
6a, 6b	122,0		
3b, 6c	121,7		
12a	129,0		
12b	129,8		
4, 9 - OH		13,19 (1H, <i>s</i>)	C-4, C-5, C-3 ^a

A substância isolada é a 4,9-dihidroxi-1,2,11,12-tetrahydroperileno-3,10-quinona (Figura 22), essa molécula foi descrita por Li e colaboradores (2006) e os sinais de RMN são similares. Em relação as atividades biológicas não foram encontradas nenhuma publicação a esse respeito, o que na verdade abre oportunidades para realização de distintos testes biológicos.

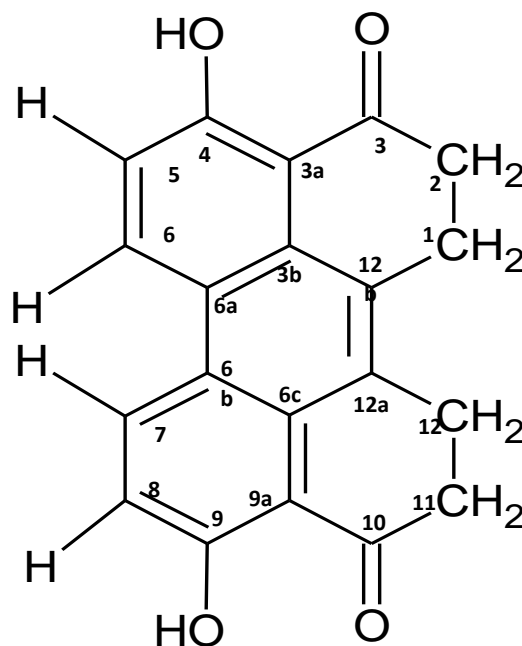


Figura 22: Estrutura química da 4,9-dihidroxi-1,2,11,12-tetrahydroperileno-3,10-quinona

As placas CCDC das frações 35 a 49 mostradas na figura 23 foram reveladas em luz UV 365 e 254 nm, sendo evidenciados grupamentos que emitiram fluorescência verde e amarelo. Para as cromatoplasmas reveladas com sulfato de cérico, manchas únicas de cor lilás representaram indícios quanto à presença dos terpenos.

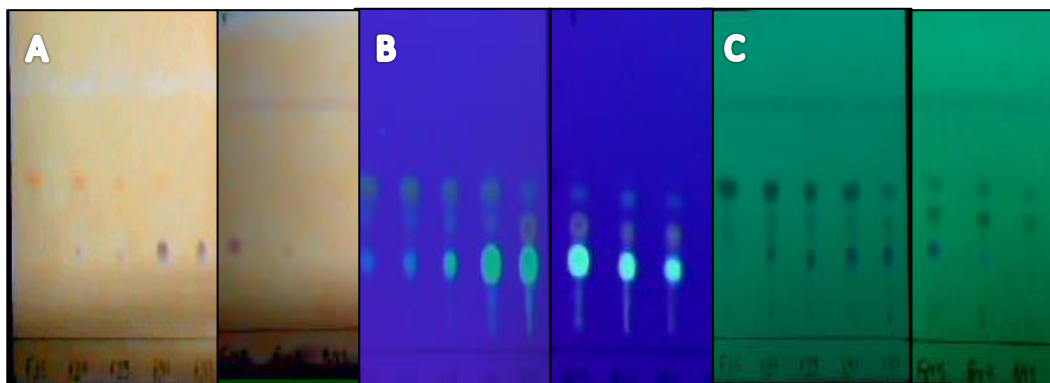


Figura 23: CCDC das frações 35 a 49 Reveladas: A) sulfato cérico, B) UV 365 nm C) UV 254 nm. Sistema de eluição utilizado DCM 100%

A identificação taxonômica pelo método molecular do fungo codificado BDL-DM5-G13 apontou como sendo *Graphium jumulu*, este gênero é disperso por insetos e comumente associado a lesões em árvores (CROUS et al, 2015). A produção da substância 4,9-dihidroxi-1,2,11,12-tetrahidroperileno-3,10-quinona por este gênero e espécie é o primeiro relato em ambiente amazônico.

Ainda do fracionamento do extrato do fungo BDL-DM5-G13, a fração 35 a 49 (20 mg) evidenciou a presença de substâncias interessantes. Foram feitas análises de RMN de ^1H , (Figura 19) HMBC e HSQC, espectrometria de massas. Porém a substância apresentou degradação e aparentemente se encontrava em mistura na mesma proporção com outra molécula.

4.2.3 Fungo BDL BDL-DM8-G2

Para o fungo BDL-DM8-G2 a análise em cromatofolhas CCDC do extrato AcOEt do micélio mostrou manchas de coloração lilás, quando reveladas com sulfato sérico, sugerindo a presença de terpenos, porém quando reveladas com reagente de Dragendorff não houve coloração sugerindo a ausência de alcaloides (Figura 24). Foi notório também a existência de substâncias fluorescente indicadas pela Luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm

(Figura 24). A análise de RMN de ^1H mostrou sinais de metilas características de terpenos (Figura 25).

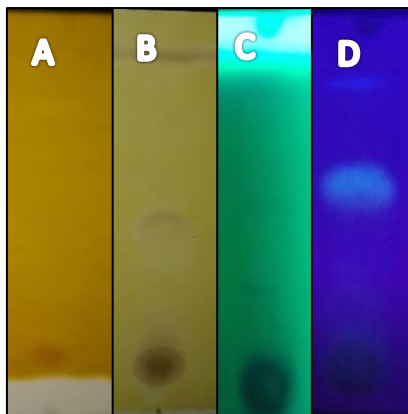


Figura 24: CCDC do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM8-G2, revelada com (A) reagente de Dragendorff, (B) sulfato cérico, (C) luz UV 254 nm e (D) luz UV 365 nm. Sistema de eluição DCM/AcOEt 9:1

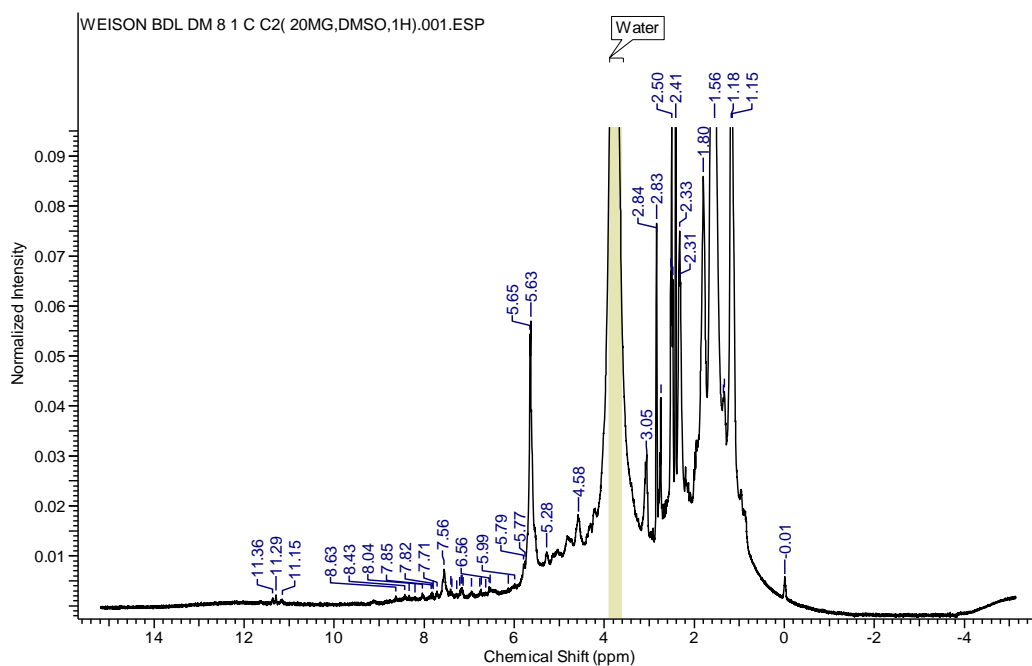


Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$) do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM8-G2

Para produção de biomassa na escala ampliada foi obtido 140 mg, utilizou-se 100 mg para realizar o fracionamento em coluna cromatográfica, deste fracionamento foram obtidas 94 frações, análises de CCDC com sulfato cérico apontaram as frações 11 a 23 como interessantes, nessas frações quando reveladas com sulfato cérico foram exibidas manchas lilás evidenciando a

possível presença de terpenos (Figura 26), as cromatoplacas CCDC foram também analisadas em luz ultravioleta 254 nm e 365 nm, onde foi observado substâncias que exibiam fluorescência.

Foram realizadas análises espectroscópicas de RMN de ^1H , HMBC e HSQC. Entretanto não foi possível estabelecer a estrutura visto que o possível terpeno se encontrava em mistura com outra molécula.

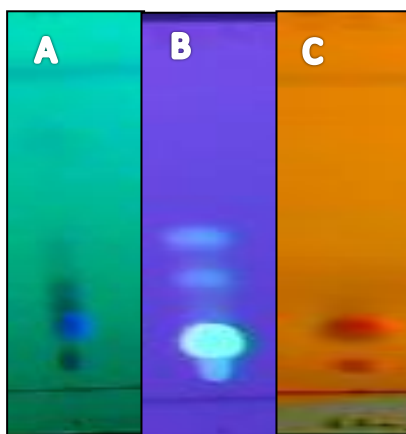


Figura 26: CCDC das reuniões das frações 11 a 23, Reveladas: A) UV 254 nm, B) UV 365 nm C) sulfato cérico. Sistema de eluição utilizado DCM 100%

4.2.4 Fungo BDL-DM2-G15

Para o fungo codificado BDL-DM2-G15 o extrato AcOEt do micélio se mostrou interessante, análises de cromatofolhas CCDC do extrato não evidenciou a presença de alcaloides, entretanto foi observado indício quanto a presença de terpenos em CCDC quando reveladas com sulfato cérico; foi notório também a existência de fluorescências, indicadas pela Luz UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm (Figura 27). Análise no RMN de ^1H (Figura 28) demonstrou sinais de hidrogênios metílicos denunciando a possível presença de terpenos.

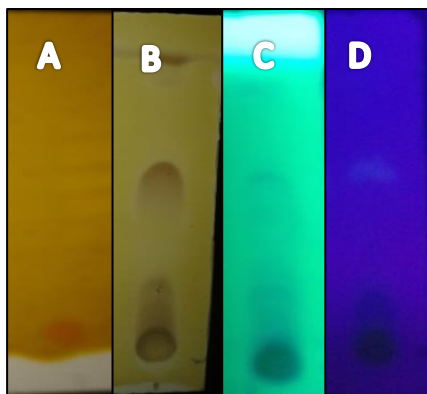


Figura 27: CCDC do extrato AcOEt do micélio do fungo BDL-DM2-G15 revelada com (A) reagente de Dragendorff, (B) sulfato cérico, (C) luz UV 254 nm e (D) luz UV 365 nm. Sistema de eluição DCM/AcOEt 9:1

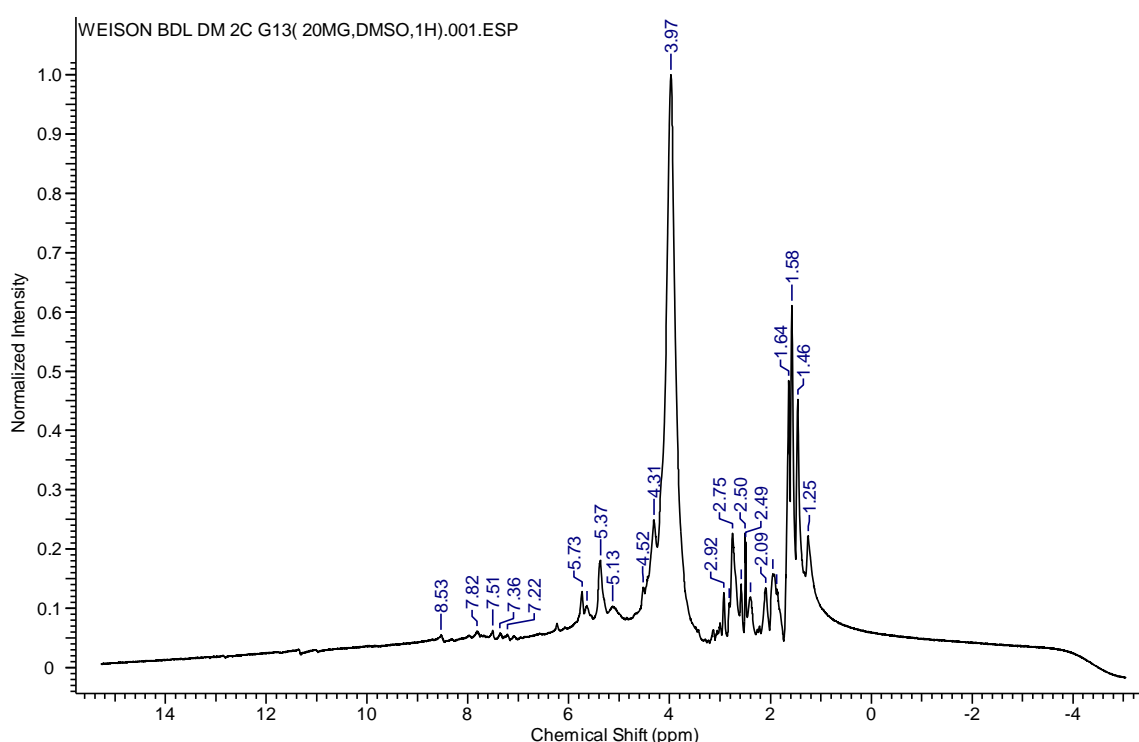


Figura 28: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, em $\text{DMSO}-d_6$) do extrato AcOEt de micélio

Do cultivo com maior número de repetições foi obtido 190 mg de extrato AcOEt do micélio, utilizou-se 150 mg para realizar o fracionamento em coluna cromatográfica, do fracionamento foram obtidas 135 frações, análises de CCDC com sulfato cérico apontaram as frações 13 a 21 como interessantes, nessas frações quando reveladas com sulfato cérico foi exibida manchas lilás evidenciando a possível presença de terpenos (Figura 29), as cromatofolhas CCDC foram também analisadas em luz ultravioleta 254 nm e 365 nm, onde foi observado substâncias que exibiam fluorescência.

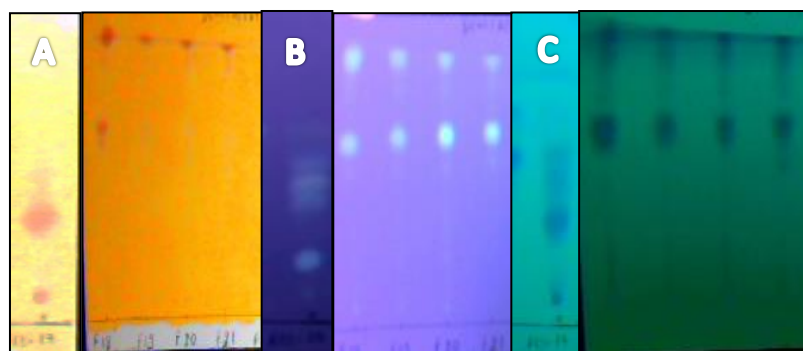


Figura 29: CCDC das frações 13 a 21 Reveladas; A) sulfato cérico. B) U.V 365 nm C) U.V 254 nm. Sistema de eluição utilizado DCM/AcOEt 9:1

Foram realizadas análises espectroscópicas de RMN de ^1H , HMBC e HSQC. Entretanto não foi possível estabelecer a estrutura visto que o possível terpeno se encontrava em mistura com outra molécula.

4.3 ENSAIO DE TOXICIDADE

Das concentrações utilizadas no ensaio, foi notória atividade tóxica somente para o extrato do fungo BDL-DM2-G15 na concentração de 500 μL e de 1000 μL de acordo com a classificação proposta por Harwig & Scott (1971). A concentração de 1000 μL resultou em uma letalidade de 77%, e para a concentração de 500 μL houve uma redução na letalidade, passando para 53%, conforme apresentado na tabela 7.

A toxicidade em *A. salina* foi proporcional ao aumento da concentração do extrato. Ponderando que nesse extrato foi detectado a presença de terpenos, e considerando a atividade tóxica apresentada, os extratos se mostram potenciais para serem utilizados em outros ensaios tais como antitumoral, anti-helmíntico, entre outros.

Tabela 7: Resultados do ensaio de toxicidade para *Artemia salina* frente às concentrações dos extratos utilizados

Amostras testadas	Concentrações					
	1000 μL	500 μL	250 μL	120 μL	60 μL	30 μL
BDL-DM8-G2	3%	0%	0%	0%	0%	0%
BDL-DM5-G13	3%	0%	0%	0%	0%	0%
BDL-DM2-G15	77%	43%	0%	0%	0%	0%

4.4 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos representa um dos testes de maior importância clínica realizado pelo laboratório de microbiologia (SEJAS et al., 2003). As cepas bacterianas testadas nesse trabalho são patógenas para animais. Baseada nas leituras dos halos de inibição, apresentadas na tabela 8, algumas bactérias apresentaram sensibilidade para os extratos.

Tabela 8: Resultados dos halos de inibição em milímetros (mm) para os extratos testados no ensaio antibacteriano

Amostras	Microrganismos avaliados												
	ET	PA	KP	PR	SE	EC	SM	AS	AH	PF	NB	BC	
BDL-DM8-G2	7	-	-	-	8	-	8	-	-	-	-	-	
BDL-DM5-G13	8	7	-	7	9	9	10,1	-	-	-	-	-	
BDL-DM2-G15	7	9	-	8	10,0	-	9	7	-	-	-	-	

Legenda: tamanho do halo (em mm): < 6: baixa atividade; 7-13: média atividade; > 13: alta atividade (Fonte: HU et al., 2004). ET: *Edwardsiella tarda*; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; KP: *Klebsiella pneumoniae*; PR: *Providencia rettgeri*; SE: *Salmonella enteritidis*; EC: *Escherichia coli*; SM: *Serratia marcescens*; SA: *Staphylococcus aureus*; AH: *Aeromonas hydrophyla*; PF: *Pseudomonas fluorescens*; NB: *Nocardia brasiliensis*; BC: *Bacillus cereus*.

Quadro 2: Resultados da avaliação da atividade antibacteriana dos extratos testados.

O extrato AcOEt bruto oriundo do fungo BDL-DM5-G13 apresentou atividade contra seis bactérias testes. Considerando o tamanho do halo de inibição o extrato foi classificado com media atividade sendo que foi destacado a atividade contra *S. marcescens* que resultou em halo de inibição de 10,1 mm, de acordo com a tabela de Wang et al., (2004) o extrato foi classificado com média atividade.

Do extrato testado foi obtida uma substância denominada 4,9-dihidroxi-1,2,11,12-tetrahidroperileno-3,10-quinona, alguns estudos relatam a atividade antibiótica para as perileno quinonas, porém por se tratar de extrato bruto a possibilidade de ter havido sinergismo deve ser considerada. Silva e colaboradores (1990) relatam que a ocorrência de substâncias com propriedades antagônicas entre si, dificultam a interpretação dos resultados, por mascaramento de efeitos.

O extrato AcOEt de micélio do fungo BDL-DM8-G2 apresentou atividade contra três bactérias patógenas conforme visto na tabela 8, porém de acordo

com a classificação de Hu e colaboradores (2004), os halos de inibição foram classificados com média atividade.

Do fracionamento realizado para esse extrato foram obtidas frações de substâncias em mistura, análises de CCDC juntamente com análises de RMN de ^1H evidenciaram a presença de terpenos, em outros trabalhos essa classe de substâncias são relatadas como tendo atividade antibiótica (TOGASHI et al., 2008; TROMBETTA et al., 2005; EBEL, 2010).

Para o extrato AcOEt de micélio do fungo BDL-DM2-G15, seis bactérias testadas foram sensíveis, conforme a classificação do halo de inibição feita por Hu et al., (2004) esse extrato apresentou media atividade, com destaque para a bactéria *Salmonella enteritidis*, onde apresentou halo de 10 mm, dentre muitos constituintes desse extrato foi evidenciada a presença de terpenos por RMN de ^1H e análises de CDCC.

4.5 ENSAIO ANTIFÚNGICO

Para a avaliação dos extratos quanto à inibição do crescimento de *Candida albicans* verificou-se que os mesmos não foram ativos contra a cepa, visto que não foi notória a presença de halos de inibição. Em outro estudo Souza e colaboradores (2004) avaliaram a atividade de fungos endofíticos isolados da *Palicourea longiflora* (Rubiaceae), e nenhum dos extratos testados apresentaram atividade contra *Candida albicans*.

4.6 ENSAIO ANTIOXIDANTE

O teste para atividade antioxidante dos extratos de fungos não apresentou resultado negativo tanto para o método DPPH quanto para o Fe^{3+} /fenantrolina (Tabela 9) os valores foram maiores quando comparados às equivalências do ácido ascórbico. Para determinado extrato ser considerado ativo o valor de equivalência em relação ao ácido ascórbico tem que ser próximo de zero ou menor.

Em contrapartida Martins e colaboradores (2014) realizaram um estudo com extratos da planta hospedeira, *Duroia macrophylla*, onde constatou-se propriedades antioxidantes satisfatórias, diferentemente dos resultados obtidos para os extratos dos fungos isolados dessa espécie.

Tabela 9: Atividade antioxidante dos extratos AcOEt de micélio mediante aos métodos DPPH e Fe³⁺/fenantrolina

Amostras	DPPH•		Fe ³⁺ /fenantrolina	
	[AA] _{eq}	Equiv. (mg extrato/mg ácido ascórbico)	[AA] _{eq}	Equiv. (mg extrato/mg ácido ascórbico)
DM2	0,327	15,345 ± 0,023	-0,108	-52,736 ± 0,051
DM5	0,348	14,497 ± 0,042	-0,016	-52,062 ± 0,061
DM8	0,306	16,647 ± 0,050	-0,111	-51,647 ± 0,043

5. CONCLUSÃO

- O presente trabalho permitiu o isolamento de 46 fungos endofíticos, a partir de folhas da *Duroia macrophylla*.
- Das condições experimentais utilizadas para a obtenção de substâncias de interesse, constatou-se que houve a produção de alcaloides, terpenos;
- Do fungo *Graphium jumulu* foi isolada a substância 4,9-dihidroxi-1,2,11,12-tetrahidroperileno-3,10-quinona;
- Os extratos testados apresentaram atividade antibacteriana contra sete cepas bacterianas destacando atividade principalmente frente a *Serratia marcescens* e *Salmonella enteritidis*.
- Os extratos não apresentaram atividade antioxidante e nem antifúngica.

6. PERSPECTIVAS

- Utilizar metodologias de bioprocessos que possam induzir e aumentar a produção da substância 4,9-dihidroxi-1,2,11,12-tetrahydroperileno-3,10-quinona, como também do(s) alcaloide(s) e terpenos.
- Avaliar outras atividades que a substância isolada possa ter principalmente frente a células cancerígenas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI-COSTA, T. DA S. A; VIEIRA, R. F; BIZZO, H. R; SILVEIRA, D. GIMENES, M. A. **Secondary metabolites**. in: DHANARASU, S. (Ed.). *Croomatography and its applications*. Rijeka: In Tech, Cap. 8, p. 131-164, 2012.
- ALY, A.H; DEBBAB, A; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. ***Appl Microbiol Biotechnol***. v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.
- AMNA, T; PURI, S.C; VERMA, V; SHARMA J.P; KHAJURIA, R.K; MUSARRAT J; SPITELLER, M; QAZI, G.N. Bioreactor studies on the endophytic fungus *Entrophospora infrequens* for the production of an anticancer alkaloid camptothecin. *Can J Microbiol* v. 52, p. 189-196, 2006.
- ARAÚJO, W.L; LIMA, A.O.S; AZEVEDO, J.L; MARCON, J.; SOBRAL, J.K, LAVACA, P.T. Manual: **Isolamento de Microrganismos Endofíticos**. Piracicaba: Departamento de Genética/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / Universidade de São Paulo, 2002.
- ARNOLD, A.E; MAYNARD, Z; GILBERT, G.S. Fungal endophytes in dycotyledonous trees: patterns of abundance and divesity. ***Mycological Research***, v. 5, n. 2, p. 1502-1507, 2001.
- AZEVEDO. *Ecologia microbiana*. Jaguariúna, Embrapa, p. 117-137, 1998.
- AZEVEDO, J.L; MACHERONI JUNIOR, W; PEREIRA, J.O; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advences on tropical plants. ***Journal of Biothechnology***, v. 3, n. 1, p. 40-65, 2000.
- AZEVEDO, L; ARAUJO, W.L. **Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants**, In: GANGULI, B; N, DESHMUKH, S.K (Eds) *Fungi: Multifaceted microbes*, p. 189-207, 2007.
- AZEVEDO, J.L. **Microrganismos endofíticos**. Disponível em <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Azevedo_Microrganismosendofiticos_000fdrap80702wx5eo0a2ndxyo89f39n.pdf> Acessado: 15/10/2013.
- BAKER, D.D; CHU, M; OZA, U; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical Discovery. ***Journal the Royal Society of Chemistry***, v. 24, p. 1225-1224, 2007.
- BLANK, M; LAVIE, G; MANDEL, M; HAZAN, S; ORENSTEIN, A; MERUELO D; KEISARI, Y. Antimetastatic activity of the photodynamic agent hypericin in the dark. ***Int. J. Cancer***: v. 111, p. 596–603, 2004.
- BOLZANI, V. S; VALLI M; PIVATTO, M; VIEGAS Jr, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry *Pure Appl. Chem.*, Vol. 84, No. 9, pp. 1837–1846, 2012.
- BRANDÃO, H, N. Química E Farmacologia De Quimioterápicos Antineoplásicos Derivados De Plantas. ***Quim. Nova***, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

- CHIN, Y.W; BALUNAS, M. J; CHAI, H.B; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Natural Sources *The AAPS Journal*, V. 8, n. 2 p. 239-253, 2006.
- CLARDY, J; WALSH, C. Lessons from natural molecules. *Nature*, v. 432, p. 829-37, 2004.
- CLAY, K; SCHARDL, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *American Naturalist*, v. 160, n. 6, p. 99-127, 2002.
- CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 95, p. 47–59, 2012.
- CORDELL, G.A; QUINN-BEATIE, M.L; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drug Discovery. *Phytoter. Res*, v. 15, p. 183-205, 2001.
- COLLADO, J; PLATAS, G; GONZÁLEZ, I; PELÁEZ, F. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. *New Phytologist*, v. 144, p.525-532, 1999.
- DAUB, M. E; HERRERO, S; CHUNG, K-R. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *Microbiology Letters* v. 252, p. 197-206, 2005.
- DAUB, M. E.; CHUNG, K-R Cercosporin: A Photoactivated Toxin in Plant Disease *APSnet Feature*, p. 1-12, 2007.
- DAUB M.E; CHUNG K. R. **Photoactivated perylenequinone toxins in plant pathogenesis**. in: The mycota v. plant relationships, 2nd ed., edited by deising h. berlin, heidelberg: springer-verlag, p. 201-219, 2009.
- DEMAIN, A. L. From natural products discovery to commercialization: a success story *J Ind Microbiol Biotechnol*. v. 33 p. 486-495, 2006.
- DEWICK, Paul. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach*. 2 ed [s.n], [s.l], 2002.
- DIAS, D. A; URBAN, S; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*. v. 2, p. 303-336, 2012.
- DISCIMUS, D. **Definition, Typology and Occurrence of Alkaloids**. ANISZEWSKI, T. in: Alkaloids – Secrets Of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications And Ecological Role. Elsevier, 2007.
- DIWU, Z. Novel theraputic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins. *Photochem Photobiol*, v. 61, p. 529– 539,1995.
- DU, J; TANG XL. Natural products against cancer: A comprehensive bibliometric study of the research projects, publications, patents and drugs. *J Can Res*, v. 10, p. 27-37, 2014.
- EBEL, R. Terpenes from Marine-Derived Fungi. *Mar. Drugs*, v. 8, p. 2340-2368, 2010.

- EISENREICH, W; BACHER, A; ARIGONI, D; ROHDICH, F; Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 61, n. 12, p. 1401-1426, 2004.
- ESPOSITO, E; AZEVEDO, J. L; **Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**, 2a. ed., EDUCS: Caxias do Sul, 2010.
- FAETH, S; HAMONN, K. Fungal endophytes in Oak Trees: long-term patterns of abundance and associations with leafminers. *Ecology*, v. 78, p. 820-827, 1997.
- FEHER, M, SCHMIDT J. M: Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J Chem Inf Comput Sci*, v. 43, p. 218-227, 2003.
- FREEMAN, S; RODRIGUEZ, R. J. Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualismo. *Science*, v. 260, p. 75-78, 1993.
- GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 8 p. 271–280, 2004.
- GIROTTI, A. W. Photodynamic Lipid Peroxidation in Biological Systems. *Photochemistry and Photobiology*, v. 51, n. 4, p. 497–509, 1990.
- GOOBO-NETO, L; LOPES, N P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- HALLMAN, J; QUADT-HALLMAN, A; MAHAFFEE W.F; KLOEPPER J.W; Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 11, p. 480-484, 2007.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 13, p. 894-900, 2008.
- HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res*, v. 105, n. 12, p.1422-1432, 2001.
- HENKEL, T; BRUNNE, R. M; REICHEL, M. H: Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angew Chem*, v. 38, p. 643-647, 1999.
- HENRIQUES, A.T; LIMBERGER, R.P; KERBER, V.A; MORENO, P.R.H. **Alcaloides generalidades e aspectos básicos**.
- SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G; DE MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2004.

- HUDSON, J. B; IMPERIAL V; HAUGLAND R. P; DIWU Z. Antiviral Activities of Photoactive Perylenequinones. ***Photochemistry and Photobiology***, v. 65 n. 2, p. 352-354 1997.
- HU, S. H; WANG, J.C; KUNG, H. F; WANG, J. T; LEE, W. L; YANG, Y. H. Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. ***Kaohsiung Journal of Medical Science***, v. 12, p. 591-599, 2004.
- JALGAONWALA, R.E; MOHITE, B. V; MAHAJAN, R. T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. ***J. Microbiol. Biotech. Res***, v.1 n. 2, p. 21-32, 2011.
- KELLER, N.P; TURNER, G; BENNETT, J.W., Fungal Secondary Metabolism from Biochemistry to Genomics. ***Nature Reviews Microbiology***, v. 3, p. 937-947, 2005.
- KOGEL, K. H; FRANKEN, P; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite-what decides? ***Current Opinion in Plant Biology***, v. 9, p. 358-363, 2006.
- KOUR, A, SHAWL AS, REHMAN S, SULTAN P, QAZI PH, SUDEN P, KHAJURIA RK, VERMA V. Isolation and identification of na endophytic strain of *Fusarium oxysporum* producing podophyllotoxin from *Juniperus recurva*. ***World Journal of Microbiology and Biotechnology***, v. 24, p. 1115-1121, 2008.
- KRAUSE, J; TOBIN, G. Discovery, Development, and Regulation of Natural Products. In *Using Old Solutions to New Problems - Natural Drug Discovery in the 21st Century*, book edited by Marianna Kulka, 2013.
- KUMARESAN, V; SURYANARAYANAN, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. ***Mycological Research***, v.11, n.105, p. 1388-1391, 2001.
- KUMARAN, R.S; KIM, H.J; HUR, B.K. Taxol promising fungal endophyte, *Pestalotiopsis* species isolated from *Taxus cuspidate*. ***J Biosci Bioeng***, v.110, p. 541–546, 2010.
- KUMARAN, R.S; JUNG, H; KIM, H.J. In vitro screening of taxol, na anticancer drug produced by the fungus, *Colletotrichum capsici*. ***Eng Life Sci***, v. 3, p. 264-271, 2011.
- KUSARI, S; ZÜHLKE, S; SPITELLER, M.Effect of artificial reconstitution of the interaction between the plant *Camptotheca acuminata* and the fungal endophyte *Fusarium solani* on camptothecin biosynthesis. ***J Nat Prod***, v. v. 74, n. 4, p. 764-75, 2011.
- KUSARI S; SPITELLER, M. **Metabolomics of Endophytic Fungi Producing Associated Plant Secondary Metabolites: Progress, Challenges and Opportunities**. ROESSNER, U. In: *Metabolomics*, 2012.
- KUSARI, S; PANDEY, S. P; SPITELLER M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. ***Phytochemistry***, v. 91 p. 81–87, 2013.

- KUSARI, S; SINGH S; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 6, 2014.
- LAM, K.S. New aspects of natural products in drug Discovery. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 6, p. 280-288, 2007.
- LI, P. Z. X; XU, N. L. J; MENG, D.-L; SHA, Y. A new perylenequinone from the fruit bodies of *Bulgaria inquinans* **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 8, n. 8, p. 743-746, 2006.
- LINNÉ, CARL VON **Biological Significance of Alkaloids**. ANISZEWSKI, T. in: Alkaloids – Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role. Elsevier, 2007.
- LIU, K; DING X, DENG B, CHEN W. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. **Journal of Industry Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 1171-1177, 2009.
- MABBERLEY, D.J. **The plant book**. A portable dictionary of the vascular plants. 2.ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997.
- MAEHARA, S; SIMANJUNTAK, P; MAETANI, Y; KITAMURA, C; OHASHI, K; SHIBUYA, H. Ability of endophytic filamentous fungi associated with *Cinchona ledgeriana* to produce *Cinchona* alkaloids. **Journal of Natural Medicines**, v.67, p.421-423, 2013.
- MARTINS, D; CARRION, L.L ; RAMOS, D. F ; SALOMÉ, K. S ; DA SILVA, P. E ;BARISON, A; NUNEZ , C.V. Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae) **BioMed Research International**, p. 1-7, 2013.
- MARTINS, D; FACHIN-ESPINAR, M.T; OLIVEIRA, T.A; LIMA K. C. S.; R. CAVALCANTI, 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.
- MATOS, F.J.A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 3 ed, Fortaleza; UFC, 2009.
- MCCHESENEY, J.D; VENKATARAMAN, S.K; HENRI, J.T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, n. 68, p. 2015-2022, 2007.
- MILLER, G.G; BROWN, K; MOORE, R.B; DIWU, Z; LIU, J.X; HUANG, L; LOWN, J.W; BEGG, D.A; CHLUMECKY, V; TULIP, J; MCPHEE, M.S. Uptake kinetics and intracellular localization of hypocrellin photosensitizers for photodynamic therapy – a confocal study. **Photochem Photobiol**, v. 61, p. 632–638, 1995.
- MISHRA, B.B; TIWARI V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

- MULROONEY, C.A; O'BRIEN, E.M; MORGAN, B.J; KOZLOWSKI, M.C. Perylenequinones: Isolation, Synthesis, and Biological Activity. **European J Org Chem**, v. 21, p. 3887-3904, 2012.
- MUSTAFA, N. R; VERPOORTE, R. Phenolic compounds in *Catharanthus roseus*. **Phytochem ver**, v. 6, p. 243–258, 2007.
- NEWMAN, D.J; CRAGG, G.M; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod**, v. 66, p. 1022–1037. 2003.
- NEWMAN, D. J; CRAGG G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod**, v. 75, p. 311-335, 2012.
- NUNEZ, C.V; SANTOS, P.A; ROUMY, V; HENNEBELLE, T; SAHPAZ, S; MESQUITA, S. A. M; Bailleul, F. Raunitidine isolated from *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **Planta médica**, v. 75, 2009.
- NOVAES, J.A. Desenvolvimento e Validação De Método Para A Quantificação Da Capacidade Redutora De Extratos Vegetais Secos. Dissertação de Mestrado – Universidade do Estado do Amazonas, 2007.
- 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, 2012.
- NUNEZ, C.V., VASCONCELOS, M. C. NOVO ALCALOIDE ANTITUMORAL DE *Duroia macrophylla*. 2012, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI10201203380, data de depósito: 31/12/2012, título: "Novo Alcaloide Antitumoral de *Duroia macrophylla*", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.
- ORTHOLAND, J. Y; GANESAN A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8 p. 271–280, 2004.
- PARK, S-A I; KI-HYANG, K; CHONG-KIL L. Immunomodulatory Effects of Hypocrellin A on MHC-restricted Antigen Processing *Sunim. Immune Network*, v. 11, n. 6 p. 412-414, 2011.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves, **Microbial Ecology of Leaves**, p. 179-187, 1991.
- POSER, G.L; MENTZ, L. A. **Diversidade biológica e sistemas de classificação**. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento, 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2004.
- PURI NAZIR, S.C; CHAWLA, A.R. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **J Biotechnol**, v. 122, p. 494-510, 2006.
- REHMAN S, SHAWL AS, KOUR A, ANDRABI R, SUDAN P, SULTAN P, VERMA V, QAZI GN. An endophytic *Neurospora* sp. From *Nothapodytes foetida*

producing camptothecin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 44, p. 203-209, 2008.

- RIZZO, S; WALDMANN, H. Development of a Natural Product Derived Chemical Toolbox for Modulation of Protein Function. *Chem. Rev*, v. 114, p. 4621–4639, 2014.
- ROBBERS, J.E; SPEEDIE, M.K; TYLER, V.E. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. São Paulo: Premier, 1997.
- SAIKKONEN, K; WÄLI, P; HELANDER, M; STANLEY, H. F. Evolution of endophyte – plant symbioses. *Trends in Plant Science*, v. 9, n. 6, p. 275-280, 2004.
- SAIKKONEN, K. Forest structure and fungal endophytes. *British Mycological Society*, v. 21, p. 67-74, 2007.
- SANTOS, T.T; VARVARALHO, M.A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.
- SAUNDERS, M; KOHN, M.L Evidence for alteration of fungal endophyte community assembly by host defense compounds. *New Phytologist*, v. 182, n. 1, p. 229–238, 2009.
- SEJAS, L.M; SILBERT, S; REIS, A.O; SADER, H.S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil., *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003.
- SCHULZ, B; BOYLE, C. The endophytic continuum *Mycological Research*, v. 109, n. 6, p. 661–686, 2005.
- SCHULZ, B; BOYLE, C; DRAEGER, S; ROMMERT, A. K; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.
- SOUZA, A.Q.L; DE SOUZA, A.D.L; ASTOLFI, S.F; PINHEIRO M.L.B; 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 Amazonica*, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- SUNAZUKA, T; HIROSE, T; OMURA, S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites. *Acc. Chem*, v. 41, p. 302-314, 2008.
- STONE, J.K; BACON, C.W; WHITE, J.F. **An overview of endophytic microbes: endophytism defined.** In: C.W. BACON & J.F. WHITE (Ed.) *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker.pp 3-30, 2000.
- STROBEL, G; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

- STROBEL, G; DAISY, B; CASTILLO, U; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **J. Nat. Prod**, v. 67, n. 2, p. 257-268, 2004.
- TAKAHASHI, A. J; LUCAS E. E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.
- TEIXEIRA, M.F.S; SILVA, T.A; PALHETA, R.A; CARNEIRO, A.L.B; ATAYDE, M. H. **Fungos da Amazônia uma Riqueza inexplorada**: Aplicações Biotecnológicas. Manaus: EDUA, 2011.
- TOGASHI, N; INOUE, Y; HAMASHIMA, H; TAKANO, A. Effects of Two Terpene Alcohols on the Antibacterial Activity and the Mode of Action of Farnesol against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 13, p. 3069-3076, 2008.
- TROMBETTA, D; CASTELLI, F; SARPIETRO, M.G; VENUTI, V; CRISTANI, M. T; DANIELE CLAUDIA; SAIJA, A; MAZZANTI, G; BISIGNANO G. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.
- VERMA, V. C; KHARWARA, R.N; STROBEL, G.A. Chemical and Functional Diversity of Natural Products from Plant Associated Endophytic Fungi **Natural Product Communications**, v. 4, n. 11, p. 1511-1532, 2009.
- VIEGAS Jr, C. V; SILVA, BOLZANI, V. Da S; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, n.2, 2006.
- WAGNER, B.L; LEWIS, L.C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Applied Microbiology**, v.66, p.3468-3473, 2000.
- WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v ROBBERS, J.E; SPEEDIE, M.K; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997.
- WINK, M. **Ecological Roles of Alkaloids** FATTORUSSO, E; TAGLIALATELA-SCAFATIIN, O. in: Modern Alkaloids Structure, Isolation, Synthesis and Biology 2008.
- YANG, X; ZHANG, L; GUO. B; GUO, S. Preliminary Study of Vincristine-Producing Endophytic Fungus Isolated from Leaves of *Catharanthus Roseus*. **Chin Tradit Herbal Drug**, v. 35, p. 79-81, 2004.
- YAGAN, S; YUKRUK, F; UNLU, G.V. Antimicrobial activities of four perylenediimides. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 7, p. 427-432, 2015.
- YOUNG, C.A; FELITTI, S; SHIELDS, K; SPANGENBERG, G; JOHNSON, R.D; BRYAN, G.T; SAIKIA, S; SCOTT, B. A complex gene cluster for indole-diterpene biosynthesis in the grass endophyte *Neotyphodium lolii*. **Fungal Genet. Biol**, v. 43, p. 679–693, 2006.
- ZIKMUNDOVA, M; DRANDAROV, K; BIGLER, L; HESSE, M; WERNER, C. Biotransformation of 2-benzoxazolinone and 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-

one by fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. ***Applied an Enviromental Microbiology***, v.68, p. 4863-4870, 2002.

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 HC, LIU JM, LU HY, GAO SL. Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of chalcone isomerase gene with the elicitation treatment. ***Plant Cell***, v. 28, p. 1205-1213, 2009.