



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

LUANA LOPES CASAS

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Minquartia guianensis* Aubl.
(OLACACEAE)

MANAUS
2016

LUANA LOPES CASAS

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Minuartia guianensis* Aubl.
(OLACACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof^ª Dr^ª Cecilia Veronica Nunez

**MANAUS
2016**

Bem sei que tudo podes, e nenhum dos teus planos pode ser frustrado.

Jó 42:2

RESUMO

Este trabalho, descreve a busca de substâncias bioativas a partir do estudo químico e biológico dos extratos brutos produzidos dos fungos endofíticos *Neosartorya hiratsukae* (anamorfo *Aspergillus*) e *Diaporthe hongkongensis* (anamorfo *Phomopsis*), que foram isolados das folhas de *Miconia guianensis*. *N. hiratsukae* foi cultivado em caldo Sabouraud sob a temperatura de 25 °C a 120 rpm em incubadora shaker durante 25 dias. *D. hongkongensis* foi cultivado em caldo Potato dextrose e Sabouraud sob a temperatura de 25 °C a 120 rpm em incubadora shaker durante 20 e 25 dias, respectivamente. A extração do micélio e do meio metabólico foi feita com os solventes orgânicos DCM, AcOet e MeOH, resultando nos extratos brutos após a evaporação do solvente. Após análises por placas de CCDC e RMN de ¹H os extratos brutos foram selecionados quanto ao perfil químico e fracionados em coluna aberta de sílica. Os extratos brutos de *N. hiratsukae* e *D. hongkongensis* apresentaram sinais característicos para presença de terpenos, substâncias aromáticas e triglicerídeos. Apesar da riqueza de substâncias interessantes não foi possível o isolamento devido a baixa quantidade de massa. Os extratos brutos de ambos os fungos foram testados para avaliação da atividade antibacteriana, antifúngica e tóxica frente à *A. salina*. Os extratos de *N. hiratsukae* não foram ativos em nenhum dos testes realizados. O extrato DCM do micélio de *D. hongkongensis* apresentou atividade nas concentrações de 0,8 e 0,4 mg/mL frente ao *Cryptococcus gattii*. O extrato acetato na maior concentração (1000 µg/mL) inibiu 100% do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* enquanto que a fase DCM inibiu 87,3 %. Já o extrato DCM teve uma porcentagem de inibição de 69% frente a *Escherichia coli*. Essas mesmas amostras quando testadas em uma concentração menor (500 µg/mL), tiveram uma redução significativa quanto à inibição. De modo geral, os fungos endofíticos isolados das folhas de *M. guianensis* apresentaram interessante potencial biotecnológico, devido a produção de metabólitos secundários com atividade antifúngica.

ABSTRACT

This paper describes the search for bioactive substances from the study of chemical and biological crude extracts of *Neosartorya hiratsukae* endophytic fungi (*Aspergillus* anamorph) and *Diaporthe hongkongensis* (anamorph *Phomopsis*), which were isolated from the leaves of *Minquartia guianensis*. *N. hiratsukae* was grown on Sabouraud broth under the temperature of 25 ° C at 120 rpm in an incubator shaker for 25 days. *D. hongkongensis* was grown in Potato dextrose broth and Sabouraud under the temperature of 25 ° C at 120 rpm in an incubator shaker at 20 and 25 days, respectively. The mycelium and extraction of the metabolic environment was taken with the organic solvent DCM, EtOAc and MeOH, resulting in crude extracts after evaporation of the solvent. After analysis by plaque ¹H NMR CCDC and crude extracts were selected as the chemical profile and fractionated on a column of silica opened. The extracts of *N. hiratsukae* and *D. hongkongensis* showed characteristic signs for the presence of terpenes, aromatics and triglycerides. Despite the wealth of interesting substances it has not been possible due to low isolation of bulk. The crude extracts of both fungi were tested for evaluation of antibacterial, antifungal and toxic opposite *A. salina*. *N. hiratsukae* extracts were not active in any of the tests. The DCM extract from mycelium *D. hongkongensis* showed activity at concentrations of 0.8 and 0.4 mg / ml against *Cryptococcus gattii*. The acetate extract at the highest concentration (1000 mg / mL) inhibited 100% of *Pseudomonas aeruginosa* growth while the DCM phase inhibited 87.3%. Already DCM extract had a percentage inhibition of 69% compared to *Escherichia coli*. These same samples when tested in a lower dose (500 ug / ml) had a significant reduction for inhibition. In general, the isolated endophytes of *M. guianensis* leaves showed interesting biotechnological potential due to production of secondary metabolites with antifungal activity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Esquema geral da integração entre metabolismo primário e secundário..... | 10 |
| Figura 2 - Terpenos de origem fúngica | 12 |
| Figura 3 - Alcaloides de origem fúngica | 13 |
| Figura 4 - Substâncias classificadas dentro dos compostos fenólicos isoladas de fungos endofíticos | 14 |
| Figura 5 - Comparação entre a forma de colonização de endófitos e patógenos | 16 |
| Figura 6 - Esqueletos químicos das moléculas isoladas de fungos citadas na tabela 1 | 19 |
| Figura 7 - <i>Minuartia guianensis</i> A. Visão geral da árvore B. Detalhes do tronco C. Folhas. | 22 |
| Figura 8 - Substâncias isoladas de <i>M. guianensis</i> | 24 |

CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| Figura 1 - CCDC dos extratos brutos de <i>N. hiratsukae</i> escolhidos para fracionamento (A). Extrato diclorometânico (B). Fase diclorometânica (C). Extrato acetato | 37 |
| Figura 2 - Espectro de RMN de ¹ H dos extratos brutos de <i>N. hiratsukae</i> (CDCl ₃ , 300 MHz) (A). Extrato diclorometânico (B). Fase diclorometânica (C). Extrato acetato | 38 |
| Figura 3 - Espectro de RMN de ¹ H da fração 6 do extrato acetato (CDCl ₃ , 300 MHz) | 40 |

CAPÍTULO II

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Placas de CCDC dos extratos brutos. Da esquerda para a direita: extrato DCM, fase DCM, extrato AcOet, fase AcOet, extrato metanólico. Meios líquidos PD = potato dextrose; SB = Saboraud | 50 |
| Figura 2 - Espectro de RMN de ¹ H dos extratos brutos do fungo <i>D. hongkongensis</i> (CDCl ₃ , 300 MHz) A. Extrato diclorometânico (PD) B. Extrato diclorometânico (SB) | 51 |
| Figura 3 - Espectro de RMN de ¹ H dos extratos brutos do fungo <i>D. hongkongensis</i> (CDCl ₃ , 300 MHz) A. Fase diclorometânica (PD) B. Fase diclorometânica (SB) | 52 |
| Figura 4 - Espectro de RMN de ¹ H dos extratos brutos do fungo <i>D. hongkongensis</i> (300 MHz) A. Extrato acetato (SB, CDCl ₃) B. Extrato acetato (PD, CDCl ₃) | 53 |
| Figura 5 - Espectro de RMN de ¹ H dos extratos brutos do fungo <i>D. hongkongensis</i> (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) A. fase acetato (SB) B. Fase acetato (PD) | 54 |
| Figura 6 - Espectro de RMN de ¹ H dos extratos brutos do fungo <i>D. hongkongensis</i> (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) A. Extrato metanólico (SB) B. Extrato metanólico (PD) | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt - Acetato de etila
BDA – Batata Dextrose Agar
BOD - Biochemical Oxygen Demand
CC – Cromatografia em Coluna
CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
CIM - Concentração Inibitória Mínima
COSY – *Correlation spectroscopy*
DCM - Diclorometano
DMSO – Dimetilsulfóxido
DMSO-*d*₆ – Dimetilsulfóxido deuterado
EM – Espectrometria de Massas
Hex - Hexano
HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*
HSQC - *Heteronuclear Single-Quantum Coherence*
MeOH – Metanol
ppm – Partes por milhão
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
SAB – Sabouraud Dextrose Agar
UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 8 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 9 |
| 2.1 Metabolismo secundário de micro-organismos..... | 9 |
| 2.1.1 Terpenos..... | 11 |
| 2.1.2 Compostos nitrogenados..... | 12 |
| 2.1.3 Compostos fenólicos..... | 13 |
| 2.2 Fungos endofíticos..... | 15 |
| 2.3 <i>Minuartia guianensis</i> Aubl..... | 21 |
| 3 OBJETIVOS..... | 25 |
| 3.1 Geral..... | 25 |
| 3.2 Específicos..... | 25 |
| 4 REFERÊNCIAS..... | 26 |
| CAPÍTULO I..... | 31 |
| Resumo..... | 32 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 32 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 34 |
| 2.1 Isolamento e identificação do fungo..... | 34 |
| 2.2 Cultivo e obtenção dos extratos..... | 34 |
| 2.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)..... | 34 |
| 2.4 Cromatografia em coluna (CC)..... | 35 |
| 2.5 Testes biológicos..... | 35 |
| 2.5.1 Atividade antibacteriana..... | 35 |
| 2.5.2 Atividade tóxica frente à <i>Artemia salina</i> | 35 |
| 2.5.3 Atividade antifúngica..... | 36 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 36 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 39 |
| 5 REFERÊNCIAS..... | 39 |
| CAPÍTULO II..... | 45 |
| Resumo..... | 46 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 46 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 47 |
| 2.1 Isolamento e identificação do fungo..... | 47 |
| 2.2 Cultivo e obtenção dos extratos..... | 48 |
| 2.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)..... | 48 |
| 2.4 Cromatografia em coluna (CC)..... | 48 |
| 2.5 Caracterização estrutural..... | 49 |
| 2.5 Testes biológicos..... | 49 |
| 2.5.1 Atividade antimicrobiana..... | 49 |
| 2.5.2 Atividade antifúngica..... | 49 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 49 |
| 4 CONCLUSÃO..... | 58 |
| 5 REFERÊNCIAS..... | 58 |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente tem crescido o interesse por pesquisas buscando substâncias bioativas produzidas por animais, plantas e micro-organismos. Esse interesse deve-se em parte ao aumento do número de micro-organismos resistentes aos diversos medicamentos empregados no tratamento dessas doenças, o que impulsiona estudos para o desenvolvimento de novos fármacos que combatam com eficiência tais resistências.

Dentre os organismos estudados, os micro-organismos endofíticos apresentam uma grande variedade de moléculas com potenciais atividades biológicas, que podem ser consideradas modelos para a produção de novos fármacos. Das substâncias obtidas por meio da bioprospecção destes organismos podemos destacar os alcaloides, esteroides, isocumarinas, terpenos e outros diversos grupos estruturais (RAMOS, 2008)

O interesse da comunidade científica concentrou-se nesses micro-organismos a partir da descoberta do potencial de produção de moléculas capazes de otimizar o crescimento da planta no que tange a produção de fitohormônios, proteção contra herbivoria e estímulo do metabolismo secundário por meio de alterações morfológicas nos tecidos do hospedeiro, e/ou provocando alterações fisiológicas (AZEVEDO, 1998).

Souza (2006) afirma que os micro-organismos endofíticos, principalmente bactérias e fungos, podem interagir com as plantas hospedeiras de forma benéfica ou mesmo “mimetizá-las” na produção de muitos compostos. Nesse sentido é de suma importância concentrar esforços na busca de endofíticos que sejam fontes de moléculas bioativas, levando em consideração o histórico de atividade biológica encontrada em suas plantas hospedeiras.

A exemplo, no que se refere ao conhecimento de suas moléculas bioativas, não se encontra na literatura nenhum registro de estudos da microbiota endofítica da espécie *Minuartia guianensis* Aubl. Essa espécie foi estudada apenas sob o enfoque fitoquímico de onde se obtiveram bons resultados quanto à atividade antifúngica contra *Cryptococcus gattii*, um dos agentes etiológicos da criptococose (CURSINO, 2011).

Diante disso, este trabalho realizou a prospecção dos fungos endofíticos das folhas de *Minuartia guianensis*, objetivando o isolamento, caracterização e atividade biológica dos extratos obtidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metabolismo secundário de micro-organismos

O termo “metabolismo secundário” refere-se ao conjunto de reações que culminam na produção de substâncias que não estão diretamente envolvidas no processo de crescimento e desenvolvimento do organismo. Juntamente com os metabólitos primários, eles participam dos processos bioquímicos que influenciam de modo importante a relação que o organismo estabelece com o meio ambiente (DEACON, 2006; CROTEAU, KUTCHAN e LEWIS, 2000).

Os metabólitos secundários produzidos por fungos constituem uma grande variedade de compostos que podem desempenhar papel vital em contextos agrícolas, farmacêuticos e industriais, ou podem ter efeitos devastadores sobre a agricultura, saúde animal e humana em virtude da sua toxicidade. Devido às suas características benéficas e deletérias, estas substâncias com elevada complexidade, assim como os genes responsáveis pela sua síntese, têm sido bastante estudados por microbiologistas e farmacêuticos (JUVVADI, SESHIME e KITAMOTO, 2005).

Dentre os metabólitos produzidos pelos fungos, destacam-se algumas características em comum: costumam ser produzidos no fim do crescimento exponencial ou em substratos com fontes limitadas de nutrientes, são produzidos a partir de intermediários metabólicos comuns, porém em vias biossintéticas reguladas por genes específicos, não são essenciais para o metabolismo primário e sua produção restringe-se à alguns gêneros ou espécies (DEACON, 2006).

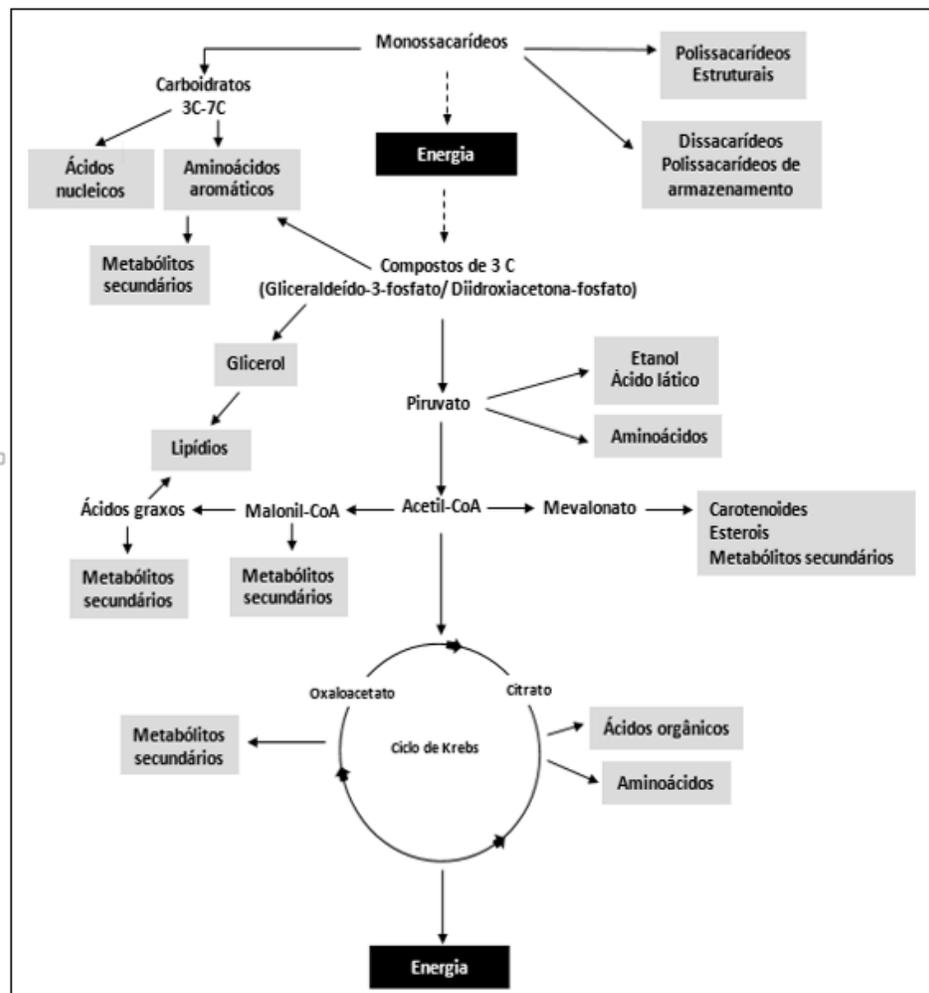
Entre as explicações do por que os fungos produzem uma diversidade e abundância de metabólitos secundários, uma muito provável é que o metabolismo secundário é necessário, independente do produto final. Para Deacon (2006) as vias do metabolismo secundário atuam como uma “válvula de escape” para remoção de intermediários do metabolismo primário quando a célula se encontra em período restrito de crescimento. Evitando o acúmulo dos intermediários, que são encaminhados para fora da célula ou acumulados em vesículas como compostos inativos.

Argumenta-se ainda que os genes que codificam as vias metabólicas secundárias são mais sujeitos a mutações (quando comparados aos do metabolismo primário) e a pressão de seleção favoreceria a predominância de mutações que conduzam a produtos que beneficiam o fungo. Por exemplo, as micotoxinas para evitar a predação dos animais, melanina para a proteção contra os danos causados pelos raios UV, hormônios sexuais para atração de

parceiros e substâncias com odor e sabor capazes de atrair insetos para dispersão de esporos (DEACON, 2006).

Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos encontram-se distribuídos em três principais grupos: os terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos (Figura 1). Abaixo veremos as principais características de cada uma dessas classes químicas.

Figura 1 - Esquema geral da integração entre metabolismo primário e secundário



Fonte: Deacon (2006)

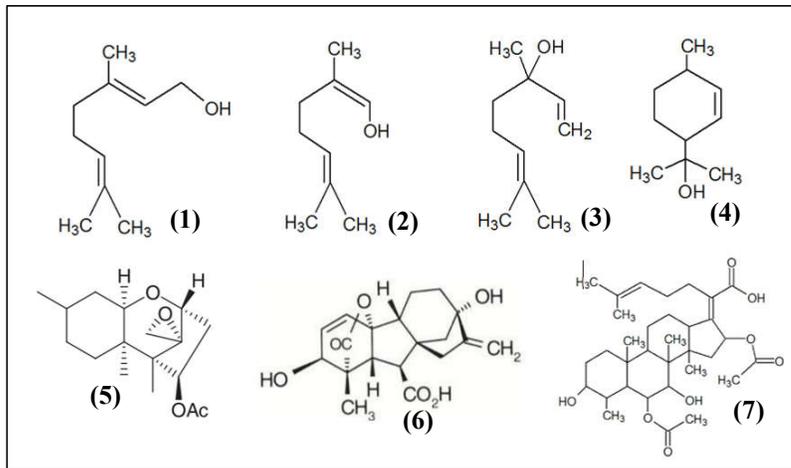
2.1.1 Terpenos

Os terpenos têm atraído cada vez mais atenção devido a compreensão de sua aplicação em vários setores da economia: na prevenção e terapia de doenças, inclusive o câncer, a sua atividade como inseticidas naturais e agentes antimicrobianos, propriedades que podem ser úteis para o armazenamento de produtos agrícolas e como blocos de construção para a síntese de muitos compostos de valor comercial (CARVALHO e FONSECA, 2006).

Os terpenos compreendem um amplo grupo de produtos naturais e são formados pela união de unidades de isopreno (C5), sendo esta a característica química mais marcante deste grupo. Estão divididos em famílias onde a classificação é feita com base na quantidade de unidades de isopreno presentes na molécula: monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25) triterpenos (C30) e carotenoides (C40). As unidades são geralmente ligadas no formato “cabeça-calda”. No entanto, triterpenoides e carotenoides são formados pela dimerização de unidades de 15 e 20, respectivamente (HANSON, 2008).

Nos fungos, os terpenos têm origem na via do mevalonato. De maneira geral, o primeiro estágio é a formação da hidroximetilglutaril-CoA. Após as reações de redução e descarboxilação têm-se como produto o isopentil-difosfato. O isopentil-difosfato é convertido em dimetilalil-difosfato facilitando a construção da cadeia de isoprenos (HANSON, 2008).

Há registros na literatura de numerosos terpenoides de origem fúngica. Os monoterpenos geraniol (1), nerol (2), linalol (3) e α -terpineol (4) (figura 2) são produzidos por espécies de *Ceratocystis*. O sesquiterpenoide tricodermina (5) e seus derivados são produzidos por espécies do gênero *Trichoderma* e possuem atividade antimicrobiana. Como representante do grupo dos diterpenos, o fungo *Giberella fujikuroi* produz o hormônio denominado de giberelina (6) amplamente distribuídos no reino Plantae mas em baixas concentrações. A cefalosporina P1 (7) e seus derivados pertencem à classe dos triterpenos e são amplamente utilizados como eficientes antibióticos (HANSON, 2008).

Figura 2 - Terpenos de origem fúngica

2.1.2 Compostos nitrogenados

Dentre os compostos nitrogenados mais comumente relatados no Reino Fungi encontram-se os alcaloides. Os alcaloides compreendem um grupo de compostos químicos naturais que contém em sua estrutura pelo menos um átomo de nitrogênio. Podem ser produzidos por bactérias, plantas, animais e por fungos na forma de metabólitos secundários. São derivados de aminoácidos ou de processos de transaminação e são classificados de acordo com o aminoácido que os originou. Podem ser derivados da lisina, ornitina, tirosina, triptofano, histidina e fenilalanina (ANISZEWSKI, 2007).

Do ponto de vista estrutural os alcaloides podem ser classificados como não-heterocíclicos - também denominados de protoalcaloides - ou heterocíclicos. Outras classificações também adotam as seguintes características: a) alcaloides verdadeiros são derivados de aminoácidos e possuem um nitrogênio em um heterociclo; b) protoalcaloides também são derivados de aminoácidos mas diferem do anterior por não conter átomo de nitrogênio em um heterociclo e c) pseudo-alcaloides não são originados a partir de aminoácidos mas possuem um átomo de nitrogênio em heterociclo (EL-SAKKA, 2010).

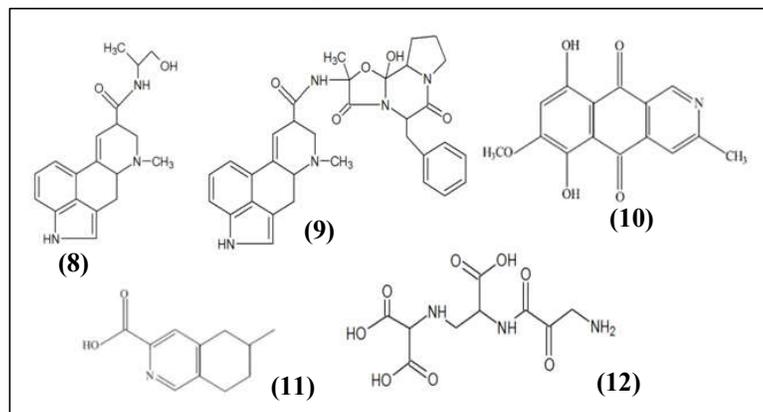
Os alcaloides mais utilizados como matéria-prima pela indústria, em sua maioria, foram isolados de plantas superiores. Porém, nas últimas décadas, houve um crescente aumento do isolamento dessas moléculas a partir de micro-organismos (EL-SAKKA, 2010). Um dos maiores exemplos dentro do reino Fungi foi a descoberta dos alcaloides produzidos pelo fungo *Claviceps purpurea* denominados de alcaloides *ergot*. Os alcaloides *ergot* são

produzidos a partir do aminoácido triptofano. Atualmente eles são usados para a obtenção do ácido lisérgico dietilamina (LSD) que, em doses baixas, é usado no tratamento da esquizofrenia (ANISZEWSKI, 2007).

Outros exemplos de alcaloides provenientes deste grupo são a ergometrina (8) e a ergotamina (9) (figura 3). A ergometrina é administrada em partos juntamente com a ocitocina e auxilia na redução do sangramento devido suas propriedades vasoconstritoras. Já a ergotamina é utilizada no tratamento de pessoas que desenvolvem crises agudas de enxaqueca (EL-SAKKA, 2010).

Mahmood et al (2010), em revisão sobre alcaloides isolados de fungos, destacaram outros alcaloides também de importância médica como a bostricoidina (10), o ácido fusarínico (11) e a licomarasmina (12), todos isolados de espécies do gênero *Fusarium*.

Figura 3 - Alcaloides de origem fúngica



2.1.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos pertencem à classe de compostos que inclui diversidade de estruturas simples e complexas, com pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES, 2007).

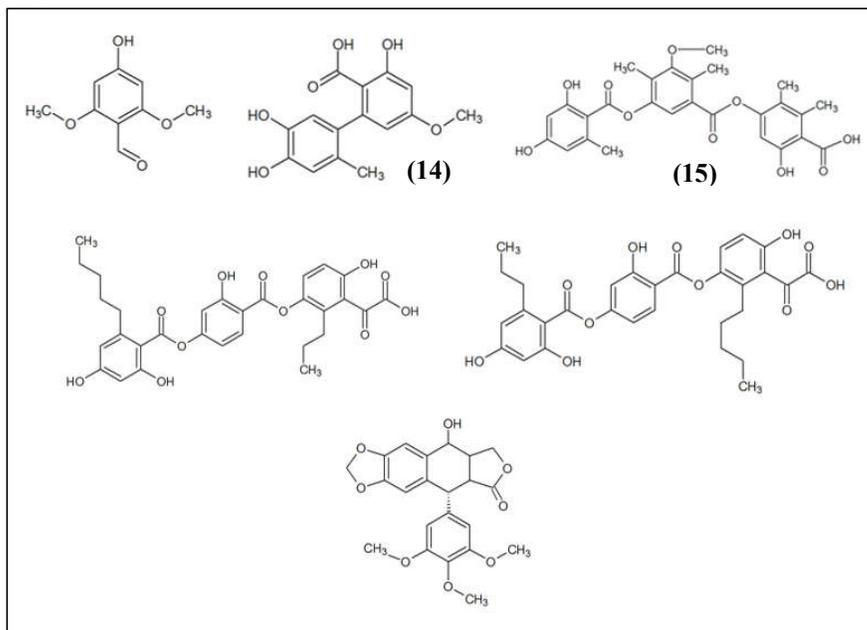
Graças a enorme variedade de estruturas e rearranjos, os compostos fenólicos em plantas são considerados como os principais reponsáveis pelo sistema de defesa quando estas encontram-se sob estresse ambiental como baixas temperaturas, infecção por patógenos, herbivoria e restrição a determinados nutrientes. Estão envolvidos também nos processos de pigmentação, crescimento e reprodução (LANTAZIO, 2013; LANTAZIO et al. 2008).

Alguns autores classificam os compostos fenólicos de acordo com seu esqueleto básico: C6 (fenol simples, benzoquinonas), C6—C1 (ácido fenólico), C6—C2 (acetofenona, ácido fenilacético), C6—C3 (ácido hidroxicinâmico, cumarina, fenilpropanos, cromonas), C6—C4 (naftoquinonas), C6—C1—C6 (xantonas), C6—C2—C6 (estilbenos, antraquinonas), C6—C3—C6 (flavonoides, isoflavonoides, neoflavonoides), (C6—C3—C6) 2,3 (bi-, triflavonoides), (C6—C3)₂ (lignanas, neolignanas), (C6—C3)_n (ligninas), (C6)_n (catecol melaninas) e (C6—C3—C6)_n (taninos condensados) (LANTAZIO et al. 2008).

Dentre os compostos fenólicos, encontram-se os flavonoides. Kumar e Pandey (2013) descrevem em sua revisão uma série de atividades biológicas atribuídas aos flavonoides como antioxidantes, antimicrobianos, hepatoprotetores, anti-inflamatórios, anti-viral e anti-cancerígenos.

São escassos os registros na literatura acerca da função, abundância e tipos de compostos fenólicos produzidos especificamente por fungos, mas Mousa e Raizada (2013) após extenso levantamento bibliográfico listaram o isolamento, identificação e atividade biológica de seis substâncias pertencentes a este grupo químico: 2-metoxi-4-hidroxi-6-metoximetilbenzaldeído (13) e altenusina (14) (atividade antifúngica), ácido coletotrico (15) (atividade antimicrobiana), ácido citonico A (16) e ácido citonico B (17) (atividade antiviral), podofilotoxina (18) (antiviral e anticâncer). As substâncias da figura 4 foram isoladas de fungos endofíticos.

Figura 4 - Substâncias classificadas dentro dos compostos fenólicos isoladas de fungos endofíticos



2.2 Fungos endofíticos

Segundo Petrini (1991) fungos endofíticos são micro-organismos que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem, aparentemente, causar qualquer efeito negativo aos seus hospedeiros. Lacava, Sebastianes e Azevedo (2010) ampliaram este conceito afirmando que micro-organismos endofíticos, incluindo os fungos, são todos aqueles cultiváveis ou não em meio de cultura que habitam o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro e sem produzir estruturas externas emergindo dos vegetais. Essa classificação é simplesmente em nível didático, pois um endófito, de acordo com as condições do ambiente e o próprio estado fisiológico do hospedeiro, pode ser considerado um patógeno latente (AZEVEDO, 1998).

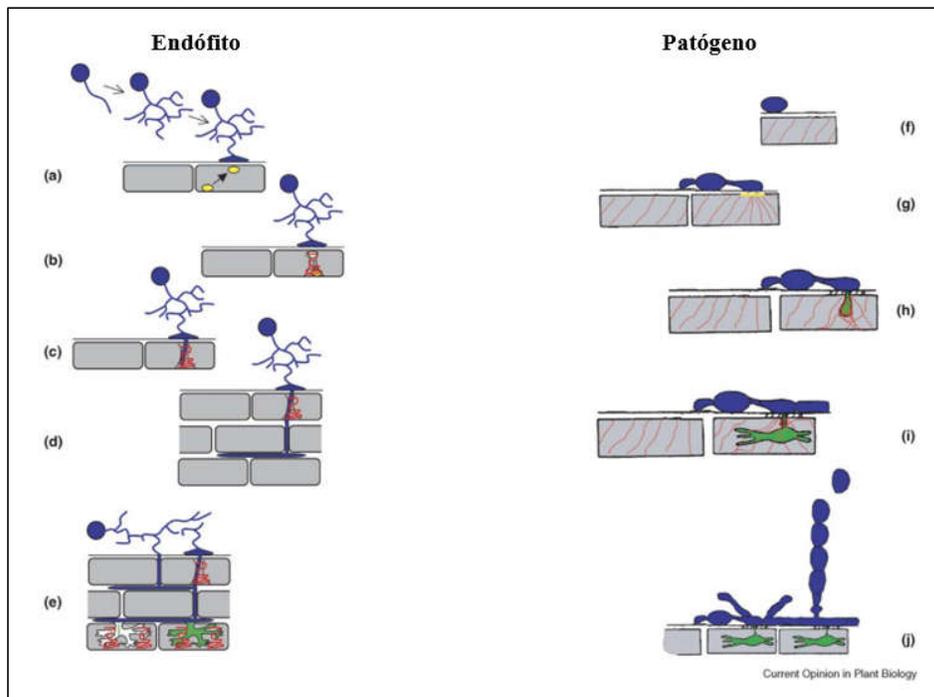
Após o estudo feito por Bary (1866) apud Neto, Azevedo e Araújo (2002), a pesquisa com plantas e suas moléculas foi direcionada sob outro ponto de vista. Bary isolou e descreveu pela primeira vez os micro-organismos endofíticos, porém durante mais de um século eles foram quase que ignorados, principalmente devido ao fato de que se conhecia muito pouco sobre suas reais funções no interior dos vegetais e também por não produzirem em seus hospedeiros, estruturas externas visíveis. No final dos anos 70, vários estudos demonstraram que os micro-organismos endofíticos possuíam algumas funções imprescindíveis para a defesa de seus hospedeiros. Confirmou-se então a hipótese de que estes micro-organismos viviam numa interação mutualística, recebendo nutrientes e proteção da planta hospedeira e produzindo compostos químicos como enzimas, alcaloides e antibióticos, entre outros, que em certas condições de estresse protegem e auxiliam a planta (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Em geral os micro-organismos endofíticos entram nos vegetais (horizontalmente) por meio de lesões naturais. As formas mais comuns são por meio das raízes secundárias laterais, estômatos, hidatódios e aberturas causadas por insetos. Outros endófitos são transmitidos via semente (verticalmente). Em plantas com propagação vegetativa os fungos passam de uma para outra através das estruturas utilizadas nesse tipo de propagação (AZEVEDO, 1998).

A figura 5 apresenta um esquema da diferença entre a forma de colonização de um endofítico e um fitopatógeno. Em **a** o fungo endofítico germina fora da célula vegetal e estabelece um contato com sinalizadores químicos, em contraste com **f** que o fitopatógeno primeiro entra em contato para depois germinar com a formação do apressório. Em **b** ocorre um reconhecimento e uma reprogramação da célula hospedeira para facilitar a entrada do endófito, enquanto que em **g** o fitopatógeno libera enzimas que degradam a parede celular. Em **c** e **d** demonstram a colonização pelo endófito, enquanto que em **h** e **i** a planta se defende

do fitopatógeno com a produção de proteínas de resistência. A figura e apresenta as relações simbióticas entre o endófito e sua hospedeira. A figura j demonstra o fitopatógeno absorvendo os metabólitos da hospedeira para completar seu ciclo de vida e consequente propagação (Kogel, Franken e Huckelhoven, 2006 adaptado por Souza, 2006).

Figura 5 - Comparação entre a forma de colonização de endófitos e patógenos



Fonte: Kogel, Franken e Huckelhoven (2006) adaptado por Souza (2006)

O interesse da comunidade científica se voltou para esses micro-organismos a partir da descoberta do potencial destes na produção de moléculas capazes de otimizar o crescimento da planta no que tange à produção de fitohormônios, proteção contra herbivoria e estímulo do metabolismo secundário por meio de alterações morfológicas nos tecidos do hospedeiro, e/ou provocando alterações fisiológicas (AZEVEDO, 1998).

Muitas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de elucidar os processos bioquímicos que envolvem a interação fungo-planta responsáveis pela produção de moléculas diferenciadas. Para tanto, existem duas propostas paralelas que tentam explicar esse fenômeno. Howitz e Sinclair (2008) propuseram a hipótese *xenohormesis* a qual afirma que moléculas produzidas pela planta em momentos de estresse podem servir como sinalizadores

químicos para organismos heterotróficos (animais e micróbios) que desenvolveram essas habilidades sob pressões seletivas evolutivas. Desta forma, é possível que certos grupos de genes permaneceram homólogos ao longo do tempo evolutivo em plantas, micróbios e animais, podendo ser ativados mediante associação adequada entre planta-endófito ou endófito-endófito.

Paralela a esta hipótese Carrol (1991) propôs a teoria do efeito mosaico que explica como os endofíticos influenciam na proteção contra a herbivoria do seu hospedeiro. Ele considera que os endofíticos criam uma composição química heterogênea dentro e entre os órgãos das plantas que é geneticamente uniforme, conseqüentemente, esses órgãos irão variar arbitrariamente em “sabor” para os herbívoros e em termos de infectividade para patógenos. Sejam quais forem as explicações existentes, o fato é que essa interação tem se mostrado vantajosa para ambos os participantes dela.

Analisando os benefícios que os endófitos desempenham em suas plantas hospedeiras, pesquisadores passaram a cogitar a possibilidade dessas moléculas terem aplicações mais específicas em benefício da sociedade. Eles consideraram que devido a ubiquidade de sua distribuição e a capacidade de habitar nos mais diversos ambientes garantiram, ao longo da evolução, mecanismos de defesa robustos para a adaptação desses micro-organismos. A diversidade biológica em que os fungos são encontrados, principalmente quando isolados de plantas das florestas tropicais, implica em diversidade química devido à constante inovação que existe em ecossistemas onde a corrida evolutiva pela sobrevivência é mais ativa. (STROBEL; DAISY, 2003).

Esses mecanismos incluem a produção de substâncias classificadas nos mais diversos grupos químicos capazes de garantir o sucesso e estabelecimento em hospedeiros e/ou em habitats competitivos e ligeiramente desfavoráveis. Isso significa que quanto maior for a variedade de ambientes aos quais estiverem adaptados, em decorrência da complexidade química do mundo que os envolve, maior será a chance de existir linhagens produtoras de alguma substância de interesse (COLEN, 2006; HANSON, 2008).

Ao longo dos anos, a prospecção de fungos endofíticos, de plantas reconhecidamente produtoras de compostos bioativos, revelou a capacidade destes em produzir os mesmos compostos que seus hospedeiros. Vários exemplos desse fenômeno são descritos na literatura, com destaque para o fungo *Taxomyces andreanae* isolado da planta *Taxus brevifolia* produtor de paclitaxel (Taxol) e seus derivados (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Esses metabólitos compreendem uma diversa gama de estruturas incluindo alcaloides, esteroides, isocumarinas, terpenos e outros diversos grupos estruturais (RAMOS, 2008). A

bioatividade destes compostos tem sido comprovada contra células cancerígenas, bactérias e fungos patogênicos e contra parasitas eucarióticos como aqueles causadores da malária (WICKLOW et al. 2005; WANG et al. 2002).

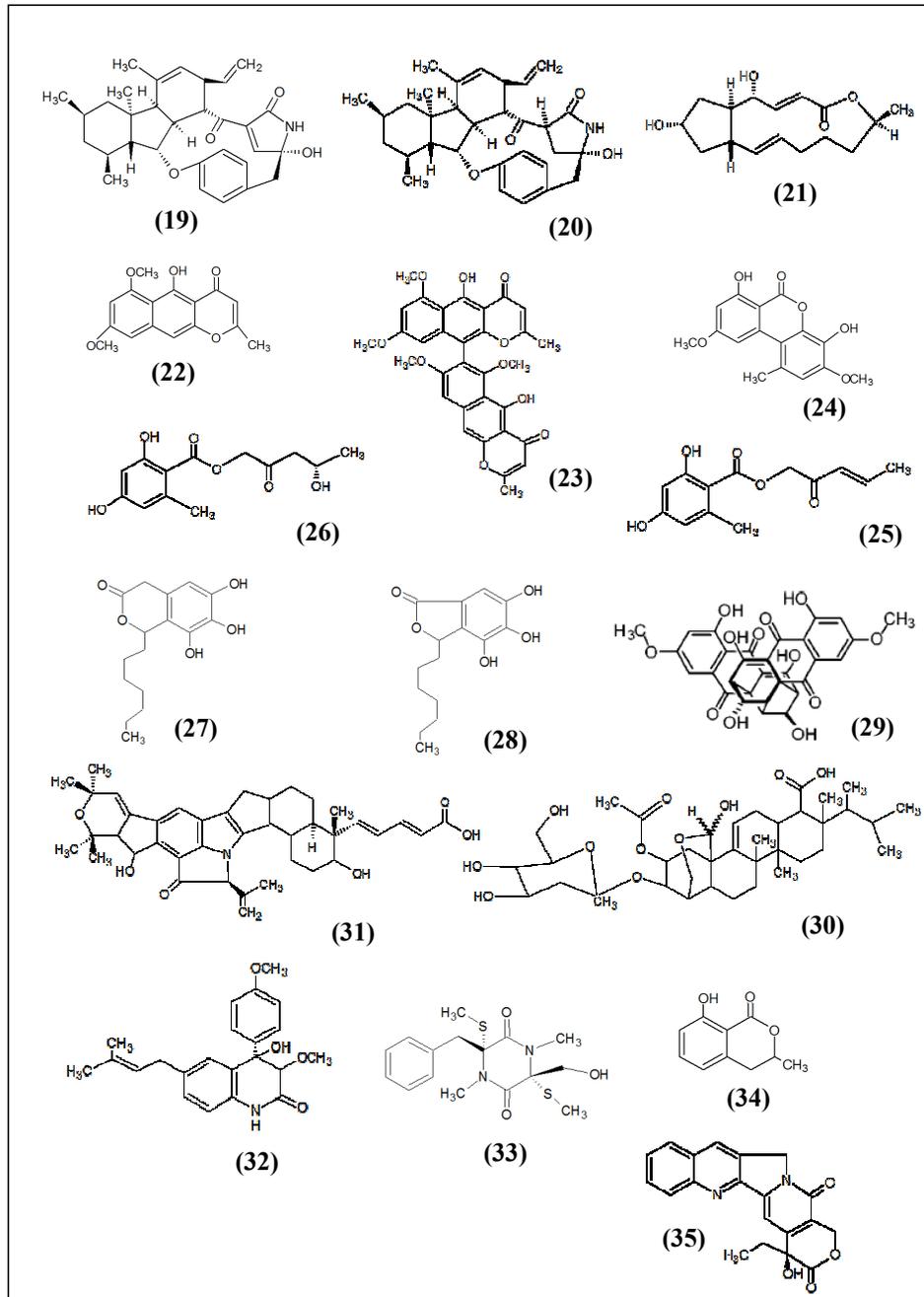
O quadro 1 ilustra algumas das substâncias isoladas, identificadas e com atividades biológicas comprovadas produzidas por fungos endofíticos. A figura 6 apresenta os respectivos esqueletos químicos das moléculas citadas na tabela 1.

Tabela 1 - Metabólitos secundários isolados de fungos endofíticos

| Fungo | Planta hospedeira | Substância | Atividade biológica | Referências |
|-----------------------------------|---|--|---|---|
| <i>Acremonium zeae</i> | <i>Zea mays</i> (Poaceae) | Pirrocidina A (19) Pirrocidina B (20) | Antibacteriana, antifúngica | Wicklow et al. (2005) |
| <i>Aspergillus clavatus</i> | <i>Taxus mairei</i> e <i>Torreya grandis</i> (Taxaceae) | Brefeldina A (21) | Antiviral, antineoplásica, fitotóxica | Wang et al., (2002) Betina (1992) Vurro et al. (1998) |
| <i>Aspergillus niger</i> | <i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae) | Rubrofusarina B (22) Aurasperona A (23) | Citotóxica, antioxidante, antifúngica | Song (2004) |
| <i>Cephalosporium</i> sp. | <i>Trachelospermum jasminoides</i> | Grafislactona A (24) | Antioxidante | Song (2005) |
| <i>Chaetomium globosum</i> | <i>Ephedra fasciculata</i> (Ephedraceae) | Globosumona A (25) Globosumona B (26) | Citotóxica | Bashyal (2005) |
| <i>Cytospora</i> sp. | <i>Conocarpus erecta</i> (Combretaceae) | Citosporona D (27) Citosporona E (28) Citoskirina A (29) | Antibacteriana Antitumoral | Brady (2000 a;b) |
| <i>Hormonema</i> sp. | <i>Juniperus communis</i> | Enfumafungina (30) | Antifúngica | Peláez et al. (2000) |
| <i>Nodulisporium</i> sp. | Não relatada | Ácido nodulispórico A (31) | Inseticida | Ondeyka et al. (1997) |
| <i>Penicillium</i> sp. | <i>Prumnopitys andina</i> (Podocarpaceae) | Peniprequinolona (32) Gliovictina (33) | Citotóxica Nematicida | Schmeda- Hirschmann et al. (2005) Kusano et al. (2000) |
| <i>Phoma tracheiphilla</i> | <i>Citrus</i> sp. (Rutaceae) | Melleina (34) | Fitotóxica | Parisi et al. (1992) |
| <i>Trichoderma atroviride</i> | <i>Camptotheca acuminata</i> (Nissaceae) | Camptotecina (35) | Anticancerígena | Pu et. al. (2013) |

Fonte: quadro adaptado de Gunatilaka (2006)

Figura 6 - Esqueletos químicos das moléculas isoladas de fungos citadas na tabela 1



Segundo Alvin, Miller e Neilan (2014) o uso de fungos endofíticos para o isolamento de compostos biologicamente ativos em detrimento ao uso das plantas possui três vantagens:

- em alguns casos, dependendo da molécula de interesse, é menos oneroso quando comparado à cultura de células vegetais, tendo em vista que este requer um tempo maior para o estabelecimento de protocolos. Isso ocorre devido às dificuldades existentes no processo de assepsia dos explantes devido a presença de micro-organismos (fungos e bactérias). A contaminação dos explantes é um sério problema porque, além de competirem pelos nutrientes, alguns deles produzem toxinas que influenciam o processo de regeneração do explante (ANDRADE, 2002).

- evita a exploração irracional das plantas que produzem a molécula-alvo podendo minimizar o perigo de extinção de algumas espécies vegetais, as quais são coletadas para a extração de produtos medicinais. Do ponto de vista ecológico, é extremamente importante a descoberta de fontes microbianas produtoras de fármacos de alto valor agregado, porque na maioria das vezes as moléculas de interesse são produzidas em quantidades reduzidas por espécies vegetais. Os endófitos apresentam-se como uma perspectiva muito importante para garantir a preservação destas espécies, mantendo a produção de compostos que garantam a vida de pessoas afetadas por inúmeras doenças (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

- podem produzir uma quantidade maior da molécula-alvo permitindo o processamento em grande escala como Pu et al. (2013) realizaram com a camptotecina¹. Eles isolaram o endofítico *Trichoderma atroviride* de *Camptotheca acuminata* com o objetivo de avaliar seu potencial quanto à produção de camptotecina. Após vários testes, obtiveram uma maior produção da molécula quando otimizaram o processo para 12 dias de incubação em meio SAB (Sabouraud Dextrose Broth) com pH em torno de 6,0, sob a temperatura de 37° C a 150 rpm.

Deste modo, é importante destacar que, assim como nos vegetais, a produção dos metabólitos em fungos varia de acordo com as condições ambientais a que eles estão expostos. Exemplo disso é o uso do *Aspergillus niger* para a produção de ácido cítrico (DEACON, 2006). Quando este é colocado em meio de cultivo enriquecido com açúcar facilmente metabolizado (20% ou mais) e com quantidades de fosfato e nitrogênio suficientes apenas para manter seu crescimento, ele converte 80% ou mais deste açúcar em ácido cítrico. O produto é exportado da célula e acumulado no meio de cultura resultando em um ambiente

¹ Camptotecina é um alcaloide pentacíclico isolado inicialmente de *Camptotheca acuminata* (Nissaceae) usada no tratamento do câncer. É a terceira droga anticâncer mais vendida no mercado ficando atrás apenas do taxol e da vinblastina.

com pH em torno de 3,0 ou menos, perfeitamente tolerável para este fungo. Por outro lado, quando submetido a um crescimento com nutrientes e pH normais, o fungo passa a produzir ácido itacônico pela oxidação direta da glicose pela enzima glicose oxidase. Ambos os produtos são utilizados pela indústria alimentícia.

Além desses benefícios, pode-se considerar também a possibilidade de síntese orgânica *in vitro* de substâncias com alta complexidade estrutural. Santos (2003) afirma que a produção *in vitro* de enzimas codificadas por transferência genética da planta para o fungo, pode ser uma ferramenta útil para a biotransformação de substratos levando a substâncias análogas e produtos naturais bioativos. Isso seria muito importante para estudos de relação estrutura-atividade biológica de substâncias de alta complexidade estrutural.

2.3 *Minquartia guianensis* Aubl.

Segundo Sleumer (1984) há apenas uma espécie do gênero *Minquartia* e as espécies listadas a seguir são consideradas sinonímias botânicas: *Minquartia macrophylla* Ducke, *Minquartia parvifolia* A.C. Smith, *Minquartia punctata* (Radlk) Sleumer, *Eganthus poeppigii* V. Teigh, *Endusa punctata* Radlk e *Secretania loranthaceae* M.Arq (CAMARGO; FERRAZ, 2004).

A ocorrência geográfica de *Minquartia guianensis* Aubl. está associada às florestas neotropicais. A espécie se distribui das terras baixas a 1000 m de altitude, em solos arenosos ou argilosos, em regiões com precipitações anuais que variam de 2500 a 6500 mm e temperaturas de 24 °C a 35 °C. Na América Central está distribuída ao longo da Nicarágua, Costa Rica e Panamá e em algumas ilhas do Caribe. Na América do Sul ocorre nas Guianas, Suriname, Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Bolívia e Brasil. No Brasil, a espécie é encontrada nos estados do Acre, Amazonas, Roraima, oeste do Pará e Amapá ocorrendo em florestas maduras ou secundárias tanto de terra firme, como nas florestas periodicamente inundadas (FLORES 2002; LORENZI 1998; SLEUMER 1984; SALAZAR; SOIHET; MÉNDEZ, 2000).

M. guianensis (figura 7) é considerada uma espécie importante devido ao grande valor econômico de sua madeira. O tronco é comumente empregado como poste de luz e nas estruturas das casas, devido a sua resistência aos cupins. As cascas de *M. guianensis* são usadas por indígenas da região amazônica como medicinal e como veneno para pesca (RIBEIRO et al., 1999). Algumas populações indígenas do Equador usam a infusão das cascas no tratamento de infecções intestinais, dores musculares, irritações cutâneas, câncer de pulmão e tuberculose.

A exploração descontrolada da madeira tem levado populações de *Minuartia* ao declínio e a extinção da mesma já é esperada em algumas regiões ribeirinhas do Peru (NEBEL, 2001).

Figura 7 - *Minuartia guianensis* A. Visão geral da árvore B. Detalhes do tronco C. Folhas



Marles, Farnsworth e Neill (1989) isolaram o poliacetileno citotóxico o ácido (-)-17-hidroxi-9,11,13,15 octadecatetraínoico (36), também conhecido como ácido minquartinoico. Ele foi obtido a partir do fracionamento do extrato clorofórmico de onde se obteve atividade citotóxica frente a células de leucemia linfocítica P-388.

Um estudo realizado por Rasmussen et al. (2000) com as cascas do caule de *M. guianensis* coletadas no Equador também isolou o ácido minquartinóico, mas dessa vez o composto foi submetido a um ensaio diferenciado demonstrando atividade moderada em ensaio *in vitro* frente ao *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major* agentes etiológicos da malária e leishmaniose, respectivamente.

Cursino et al. (2008) realizaram um estudo onde foram testados os extratos diclorometânico e metanólico dos galhos de *M. guianensis* contra fungos filamentosos dermatofíticos (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*,

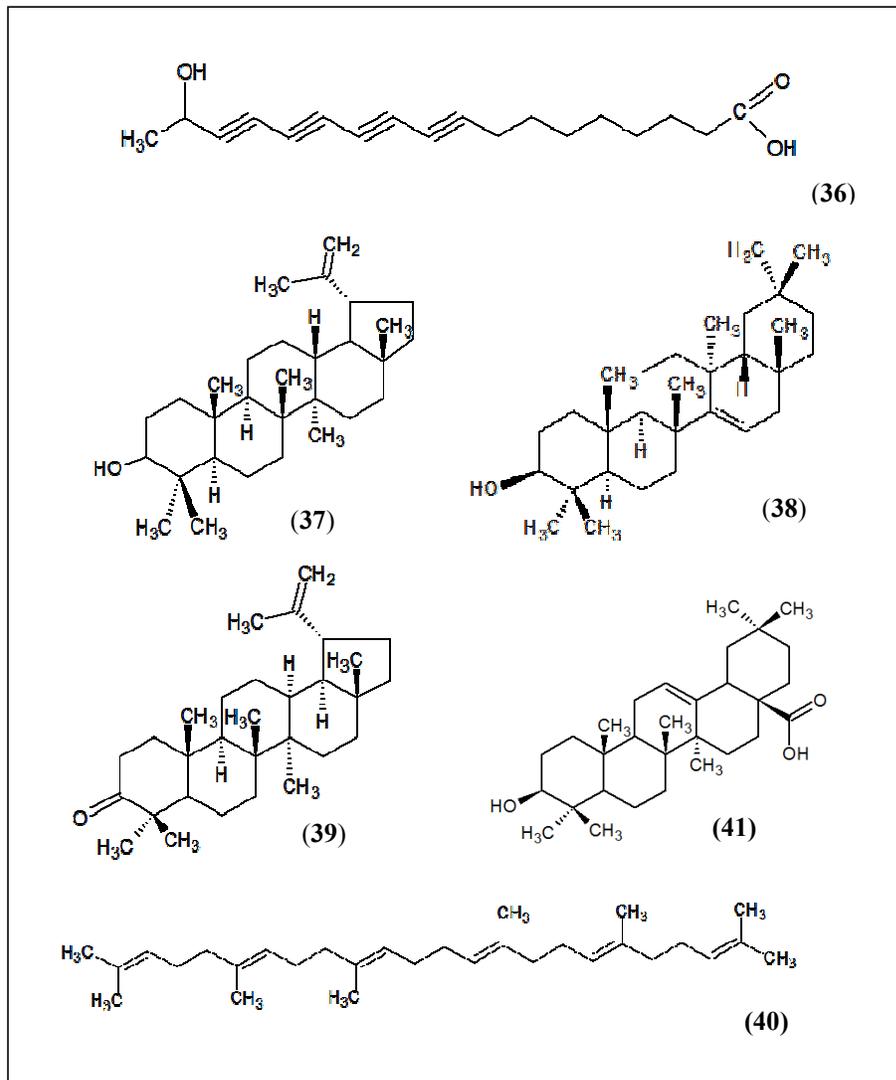
Trichophyton mentagrophytes, *T. rubrum* e *T. tonsurans*), fungos filamentosos não dermatofíticos (*Cladosporium cladosporioides*, *C. sphaerospermum*, *Fusarium* e *Scytalidium*) e leveduriforme (*Candida albicans*). Os resultados apresentaram significativa atividade antifúngica para todos os fungos filamentosos dermatofíticos testados.

Cursino et al. (2009) descreveram o isolamento dos triterpenos lupeol (37), taraxerol (38), lupen-3-ona (39) e esqualeno (40) obtido do extrato diclorometânico das folhas de *M. guianensis* (figura 8). Estes terpenóides foram isolados através de técnicas cromatográficas e identificados utilizando Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C . Na literatura disponível, estes foram os primeiros relatos destes triterpenos em *M. guianensis*.

Cursino (2011a) em outro trabalho também isolou o ácido minquartinóico sugerindo este como sendo o responsável pelo potencial antifúngico contra o patógeno *Cryptococcus gattii*. Cursino et al. (2011b) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos de *M. guianensis* frente às bactérias Gram-negativas (*Shigella flexneri* M90T, *Salmonella choleraesuis* 6958, *Escherichia coli* E2348/69) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* 33591 resistente à *Staphylococcus aureus* 25923 sensível a meticilina, *Bacillus cereus* 9634, *Bacillus liquefaciens*). O extrato que obteve maior desempenho de inibição sobre a maioria dos microorganismos testados foi o de DCM da folha. Desse extrato já haviam sido isolados quatro triterpenos (CURSINO et al., 2009) mas não foi possível testar as substâncias isoladas devido a pequena quantidade das mesmas.

Camargo (2011) também avaliou a atividade antibacteriana dos extratos das cascas, galhos e folhas frente às bactérias Gram-positivas *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*, Gram-negativa *E. coli* e avaliou a atividade antifúngica sobre *Candida albicans*. Os extratos hexânicos das folhas e galhos de *M. guianensis* mostraram-se ativos frente à *S. aureus* e o extrato metanólico do galho foi ativo frente à *C. albicans* por meio da técnica de difusão em ágar. Por meio do método de microdiluição apresentaram CIM (concentração mínima inibitória) superior a 1 mg/mL para *S. aureus*, *S. mutans* e *C. albicans*. Os extratos de *M. guianensis* foram inativos contra *E. coli*.

Os compostos (38), (40) e o ácido oleanólico (41), isolados dos extratos diclorometânicos de folhas e galhos de *M. guianensis*, foram testados contra o *Plasmodium falciparum*. Dentre os compostos testados, o (41) apresentou melhor atividade demonstrando assim um possível potencial para o desenvolvimento de um novo antimalárico (CURSINO et al., 2012).

Figura 8 - Substâncias isoladas de *M. guianensis*

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Obter substâncias de interesse biotecnológico de fungos endofíticos de *Minuartia guianensis* Aubl. (Olacaceae).

3.2 Específicos

- Avaliar a atividade antibacteriana, antifúngica e tóxica de extratos obtidos de fungos endofíticos de *M. guianensis*.

- Fracionar os extratos ativos ou aqueles que apresentam indícios de produção de substâncias com esqueletos químicos variados.

- Isolar e identificar as substâncias químicas presentes nos extratos fúngicos selecionados.

4 REFERÊNCIAS

ALVIN, A; MILLER, K.I; NEILAN, B. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**, v. 169, n. 7-8, p. 483–495, 2014.

ANDRADE, S.R.M. de. **Princípio da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa, 2002. 16p.

ANISZEWSKI, TADEUSZ. Alkaloids – secrets of life (alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 2007. 316p.

AZEVEDO, J. **Micro-organismos endofíticos**. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J. (Ed.). Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p. 117–137.

BASHYAL, B. P.; WIJERATNE, E. M. K.; FAETH, S.H.; GUNATILAKA, A. A. L. Globosumones A-C, cytotoxic orsellinic acid esters from the Sonoran Desert endophytic fungus *Chaetomium globosum*. **Journal of Natural Products**, v.68, p.724-728, 2005.

BETINA, V. Biological effects of the antibiotic Brefeldin A (Decumbin, Cyanein, Ascotoxin, Synergisidin): a retrospective. **Folia Microbiologica** v.37, n.1, p.3-11, 1992.

BRADY, S.F.; WAGENAAR, M.M.; SINGH, M.P.; JANSO, J.E.; CLARDY, J. The Cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. **Organic Letters**, v.2, n.25, p.4043-4046, 2000(a).

BRADY, S.F.; WAGENAAR, M.M.; SINGH, M.P.; JANSO, J.E.; CLARDY, J. Cytoskyrins A and B, new BIA active bisanthraquinones isolated from an endophytic fungus. **Organic Letters**, v.2, n.25, p.4047-4049, 2000(b).

CAMARGO, J.L.C; FERRAZ, I. D. *Minquartia guianensis* Aubl. **Manual de Sementes da Amazônia**, p. 1–7, 2004.

CAMARGO, M.R.M. 96p. **Avaliação da atividade antimalárica e antimicrobiana de *Geissosperum argenteum* Woodson e *Minquartia guianensis* Aubl. coletadas em Roraima**. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais) – Universidade Federal de Roraima, 2011.

CARROLL, G.C. **Beyond pest deterrence - alternative strategies and hidden costs of endophytic mutualisms in vascular plants**. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Org.). Microbial ecology of leaves. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 358–375.

CARVALHO, C.C.C.R. de; FONSECA, M.M.R. da. Biotransformation of terpenes **Biotechnology Advances**, v.24, p.134–142, 2006.

COLEN, G. 206p. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

CROTEAU R.; KUTCHAN, T.M; LEWIS, N.G. Natural products (Secondary metabolites), cap.24. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B; Grissem, W.; Jones, R. American Society of Plant Physiologists, 2000.

CURSINO, L.M.C.; MELO, L.A.S.; OLIVEIRA, J.A.A.de; NUNEZ, C.V. Atividade antifúngica dos extratos diclorometânico e metanólico dos galhos de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). In: **31ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia, 2008.

CURSINO, L.M.C.; MESQUITA, A.S.S.; MESQUITA, D.W.O.; FERNANDES, C.C.; PEREIRA JÚNIOR, O.R.; AMARAL, I.L. do; NUNEZ, C.V. Triterpenos das folhas de *Minquartia guianensis* Aubl. (Olacaceae). **Acta Amazonica**, v. 39, n.1, p.181-186, 2009.

CURSINO, L. M. DE. **Estudo fitoquímico e bioatividade dos extratos e frações de *Minquartia guianensis* (Olacaceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Recursos Naturais) - Universidade do Estado do Amazonas, 2011(a).

CURSINO, L.M.C.; SANTOS, I.; MARIÚBA, L.A.M.; JEFFREYS, M.F.; LIMA, N.M.; OLIVEIRA, J.L.; ORLANDI, P.P.; NUNEZ, C.V. Antibacterial activity of *Minquartia guianensis* extracts and phytochemical evaluation. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.23, n.6, p.505-510, 2011(b).

CURSINO, L.M.C.; NUNEZ, C.V.; PAULA, R.C.; NASCIMENTO, M.F.A.; SANTOS, P.A. Triterpenes from *Minquartia guianensis* (Olacaceae) in vitro antimalarial activity. **Quimica Nova**, v. 35, n.11, p.2165-2168, 2012.

DEACON, J.W. **Fungal Biology**. 4 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 371p.

EL-SAKKA, M.A. **Phytochemistry alkaloids**. 3 ed. Faculty of Pharmacy - Department of Pharmacognosy, Cairo. 2010.

FLORES, E.M. *Minquartia guianensis* Aubl. Part II. **Species Descriptions**. P.575-578, 1984.

HANSON, J. **The Chemistry of Fungi**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008. 221p.

HOWITZ, KONRAD T; SINCLAIR, D. A. Essay *Xenohormesis* : sensing the chemical cues of other species. **Cell**, v. 133, n. 3, p. 387–391, 2008.

JUVVADI, P.R; SESHIME, Y; KITAMOTO, K. Genomics reveals traces of fungal phenylpropanoid-flavonoid metabolic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. **The Journal of Microbiology**, v. 43, n.6, p.475-486, 2005.

KOGEL, K.H; FRANKEN, P; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v.9, p.358-363, 2006.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, p.1-16, 2013.

KUSANO, M.; KOSHINO, H.; UZAWA, J.; FUJIOKA, S.; KAWANO, T.; KIMURA, Y. Nematicidal alkaloids and related compounds produced by the fungus *Penicillium* cf. *simplicissimum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.64, n.12, p.2559-2568, 2000.

LACAVA, P.T.; SEBASTIANES, F.L.S.; AZEVEDO, J.L. de. **Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas**. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. (Org.). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2 ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. Cap. 15, p.533-569.

LANTAZIO, V. Phenolic Compounds: Introduction. Cap. 50. In: Natural products. Ramawat, K.G; Merillon, J.M.: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.1543-1580, 2013.

LANTAZIO, V.; KROON, P.A.; QUIDEAU, S.; TREUTTER, D. Plants phenolics – secondary metabolites with diverse functions (cap.2). In Recent advances in polyphenol research. DAAYF, F.; LANTAZIO, V. Blackwell Publishing, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Vol. 2. São Paulo: Editora Plantarum, 1998, 368p.

MAHMOOD, Z.A; AHMED, S.W; AZHAR, I; SUALEH, M; BAIG, M.T; ZOHA, S. Bioactive alkaloids produced by fungi. I Updates on alkaloids from the species of the genera *Boletus*, *Fusarium* and *Psilocybe*. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.23, n.3, p.349-357, 2010.

MARLES, R.J.; FARNSWORTH, N.R.; NEILL, D.A. Isolation of a novel cytotoxic polyacetilene from a traditional anthelmintic medicinal plant, *Minquartia guianensis*. **Journal of Natural Products**, v.52, n.2, p.261-266, 1989.

MOUSA, W.K; RAIZADA, M.N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. **Frontiers in Microbiology**, v.4, n.65, p.1-18, 2013.

NEBEL, G. *Minquartia guianensis* Aubl.: use, ecology and management in forestry and agroforestry. **Forest Ecology and Management**, v.150, p.115-124, 2001.

NETO, P.A.S.P; AZEVEDO, J.L; ARAÚJO, W.L. Micro-organismos endofíticos. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, ano 5, v.29, p.62-76, 2002.

ONDEYKA, J.G; HELMS, G.L.; HENSENS, O.D.; GOETZ, M.A.; ZINK, D.L.; TSIPOURAS, A.; SHOOP, W.L.; SLAYTON, L; DOMBROWSKI, A.W.; POLISHOOK, J.D.; OSTLIND, D.A.; TSOU, N.N.; BALL, R.G.; B. SINGH, S. Nodulisporic acid A, a novel and potent insecticide from a *Nodulisporium* sp. isolation, structure determination, and chemical transformations. **Journal of the American Chemical Society**, v.119, n.38, p.8809-8816, 1997.

PARISI, A.; PIATTELLI, M.; TRINGALI, C.; DI SAN LIO, G.M. Identification of the phytotoxin mellein in culture fluids. **Phytochemistry**, v. 32, n.4, p.865-867, 1993.

PELÁEZ, F. CABELLO, A.; PLATAS, G.; DIEZ, M.T.; DEL VAL, A.G.; BASILIO, A.; MARTANI, I.; VICENTE, F.; BILLS, G.F.; GIACOBBE, R.A.; SCHWARTZ, R.E.; ONISHI, J.C.; MEINZ, M.S.; ABRUZZO, G.K.; FLATTERY, A.M. KONG, L.; KURTZ, M.B. The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species biological activity and taxonomy of the producing organisms. **Systematic and Applied Microbiology**, v.23, p.333-343, 2000.

PETRINI, O. **Fungal endophytes of tree leaves**. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Org.). *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer-Verlag, 1991. p.179-187.

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

RAMOS, H.P. 60p. **Otimização das condições de cultivo do fungo *Arthrinium state of Apiospora montagnei* Sacc. para produção de metabólitos secundários com atividade biológica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008.

RASMUSSEN, H.B.; CHRISTENSEN, S.B.; KVIST, L.P.; KHARAZMI, A.; HUANSI, A.G. Absolute configuration and antiprotozoal activity of minquartynoic acid. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1295-1296, 2000.

RIBEIRO, J.L.S. da; HOPKINS, M.J.G; VICENTINI, A; SOTHERS, C.A; COSTA, M.A.S; BRITO, J.M.de; SOUZA, M.A.D. de; MARTINS, L.H.P; LOHMANN, L.G; ASSUNÇÃO, P.A.C.L; PEREIRA, E.C; SILVA, C.F; MESQUITA, M.R; PROCÓPIO, L.C. **Flora da Reserva Ducke**: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, 1999. 816p.

SALAZAR, R.; SOIHET, C.; MÉNDEZ, J.M. **Manejo de semillas de 100 especies forestales de America Latina**. Turrialba: CATIE, 2000. 204p.

SANTOS, R.M.G. dos. Metabolismo secundário dos fungos *Penicillium* sp e *Fusarium* moniliforme isolados como endofíticos de *Melia azedarach* (Meliaceae). 432p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, 2003.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; HORMAZABAL, E.; ASTUDILLO, L.; RODRIGUEZ, J.; THEODULOZ, C. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.27–32, 2005.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007, 1102p.

SLEUMER, H. O. **Flora Neotropica**: Olacaceae. Monograph 38. New York: The New York Botanical Garden, 1984.

SONG, Y.C.; LI, H.; YE, Y.H.; SHAN, C.Y.; YANG, Y.M.; TAN, R.X.. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. **FEMS Microbiology Letters**, v.241, p.67-72, 2004.

SONG, Y. C.; HUANG, W. Y.; SUN, C.; WANG, F.W.; TAN, R. X. Characterization of Graphis lactone A as the Antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.28, n.3, p.506-509, 2005.

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

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

STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

VURRO, M.; EVIDENTE, A.; ANDOLFI, A.; ZONNO, M.C.; GIORDANO, F.; MOTTA, A. Brefeldin A and α,β -dehydrocurvularin, two phytotoxins from *Alternaria zinniae*, a biocontrol agent of *Xanthium occidentale*. **Plant Science**, v.138, p.67–79, 1998.

WANG, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, W. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.34, p.51-57, 2002.

WICKLOW, D.T.; ROTH, S.; DEYRUP, S.T.; GLOER, J.B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycological Research**, v.109, n.5, p.610–618, 2005.

CAPÍTULO I**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DOS
EXTRATOS BRUTOS DE *Neosartorya hiratsukae*
(Udagawa, Tsub. & Y. Horie)**

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS DE
Neosartoria hiratsukae (Udagawa, Tsub. & Y. Horie)

*Casas, L.L.; **Nunez, V.C.

*Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil

**Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Resumo

Fungos endofíticos são micro-organismos que habitam no interior dos vegetais sem lhe causar danos. Nas últimas décadas muitos estudos têm sido realizados visando à prospecção de fungos endofíticos capazes de produzir substâncias biologicamente ativas, tais como alcaloides, esteroides, isocumarinas, terpenos e outras classes químicas. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente os extratos brutos de *Neosartoria hiratsukae*, isolado e identificado da folha de *Minuartia guianensis* Aubl. Olacaceae, bem como avaliar as atividades antimicrobiana e de toxicidade frente a *Artemia salina*. Folhas de *M. guianensis* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke e submetidas ao processo de desinfestação. Posteriormente, seus fungos endofíticos foram isolados e purificados. Dos fungos isolados, *N. hiratsukae* foi selecionado para estudo. Ele foi incubado por 25 dias em caldo BD em *shaker* a 120 rpm sob a temperatura de 30 °C. Os extratos brutos foram extraídos com solventes orgânicos (DCM, AcOet e MEOH) e submetidos aos métodos de CCDC, CC e RMN de ¹H. Os extratos brutos não apresentaram atividade biológica para nenhum dos testes biológicos. O perfil químico obtido por CCDC e CC e RMN de ¹H indicou a presença de terpenos, compostos aromáticos e triglicerídeos. Este é o primeiro registro de bioprospecção de fungos endofíticos em *M. guianensis*.

1 INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos^[1] são micro-organismos que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem, aparentemente, causar qualquer efeito negativo aos seus hospedeiros. O interesse da comunidade científica se voltou para esses micro-organismos a partir da descoberta do potencial destes na produção de metabólitos secundários que compreendem uma diversa gama de estruturas incluindo alcaloides, esteroides, isocumarinas, terpenos e outros diversos grupos estruturais^[2]. A bioatividade destes compostos tem sido comprovada contra células cancerígenas, bactérias e fungos patogênicos e contra parasitas eucarióticos como aqueles causadores da malária^[3,4].

As espécies de *Arpergillus* são bem comuns em diversos ambientes. Estão entre os mais bem-sucedidos grupos de fungos, possuindo importantes papéis na natureza e na economia da sociedade. Além disso, são responsáveis por produzir numerosas enzimas extracelulares, ácidos orgânicos, e são capazes também de produzir metabólitos secundários de interesse biotecnológico como a lovastatina e inibidores da colecistoquinina e neuroquinina, antifúngicos, etc. Algumas espécies comportam-se também como patógenos

causando as aspergiloses. Aspergilose é o nome dado a todas as doenças em animais causadas pelo crescimento de qualquer indivíduo membro deste gênero ^[5,6].

Neosartorya hiratsukae é um fungo pertencente ao filo Ascomycota (Fungi; Dikarya; Ascomycota) sendo considerado um teleomorfo de *Aspergillus* seção *Fumigati*. Foi descrito pela primeira vez por Udagawa, Tsubouchi, e Horie em 1991^[7] quando foi isolado do ar e de suco de aloe pasteurizado. Espécies teleomórficas pertencentes ao grupo de *Aspergillus* seção *Fumigati* foram organizadas no gênero *Neosartorya* por Malloch & Cain (1972)^[8]. A seção *Fumigati* inclui mais de 20 espécies de *Neosartorya* e 10 espécies anamórficas ^[9].

N. hiratsukae tem sido registrado como causador de aspergilose cerebral e peritonite em humanos bem como agente etiológico de dermatite em outros animais ^[10-12]. Estudos químicos realizados por Samson et al. (2007) ^[9] caracterizaram os avenaciolídeos como sendo as moléculas majoritárias produzidas por este fungo. Avenaciolídeo é uma substância insolúvel em água que possui atividades biológicas interessantes como antifúngico, antibacteriano e agente inibidor do transporte de glutamato na mitocôndria^[13].

Espécies de *Neosartorya* produzem estruturas de resistências denominadas de ascósporos que são frequentemente encontradas em alimentos^[14]. Fungos deste gênero têm sido pouco estudados quanto à produção de metabólitos secundários ^[15], principalmente quando estes são isolados como endofíticos de plantas tropicais.

N. udagawae isolado da planta *Aricecennia marina* produziu cinco compostos pertencentes ao grupo dos alcalóides indólicos, sendo que dois (neosatoriadinas A e B) apresentaram alta atividade biológica frente ao vírus *influenza A* (H1N1) ^[16]. De *N. spathulata* foi isolada a substância mangostina 3-sulfato que apresentou forte atividade contra o *Mycobacterium tuberculosis* ^[17]. O extrato bruto de *N. aureola* apresentou atividade antifúngica frente ao *F. verticillioides*. Após o fracionamento foi possível isolar as substâncias fiscalina e os análogos de triptoquivalina e fumiquinazolina ^[18]. Tanto *N. udagawae*, quanto *N. spathulata* e *N. aureola* foram isolados como endofíticos.

Tendo em vista o potencial de substâncias bioativas oriundas do gênero *Neosartorya*, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química dos extratos brutos de *N. hiratsukae*, isolado das folhas de *M. guianensis* Aubl. (Olacaceae), bem como suas respectivas atividades biológicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento e identificação do fungo

O material vegetal foi coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, AM nas coordenadas 2°55'24.69" S 59°58'26.12" W. Uma exsicata foi depositada no herbário do Inpa com o número de registro 261555. Foram utilizadas as folhas de *M.guianensis* para isolar o fungo *N. hiratsukae*. Para isso, as folhas foram levadas à câmara de fluxo laminar onde realizou-se o processo de desinfestação^[19,20]. As folhas lavadas foram seccionadas em pedaços com cerca de 1 cm e inoculados em 5 placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar) e 5 placas contendo meio SAB (Saboraud Agar) acrescidas com antibiótico (Oxitetraciclina 125 µg/mL). Em cada placa foram inoculados 5 fragmentos de folhas e as mesmas foram armazenadas em BOD a 30 °C por sete dias. O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens puras. As cepas foram preservadas em frascos com água destilada estéril – método Castellani – armazenadas em temperatura ambiente e em microtubos com caldo estéril e glicerol a 20 % em ultrafreezer a - 80 °C^[20]. A identificação do fungo foi realizada através da análise da região ITS conforme a metodologia descrita por White et al. (1990).^[21]

2.2 Cultivo e obtenção dos extratos

O fungo foi cultivado em 250 mL de meio líquido Sabouraud (SAB) com acréscimo de 0,2 % de extrato de levedura em frascos erlenmeyer de 500 mL em oito repetições. Os frascos foram mantidos em incubadora *shaker* sob a temperatura de 30 °C a 120 rotações por minuto (rpm) durante 25 dias. Decorrido o tempo de crescimento, o micélio e o caldo fermentado foram separados por meio de filtração a vácuo de onde se obteve a massa micelial e o caldo fermentado (meio metabólico)^[22]. Para a obtenção dos extratos dos micélios foram utilizados solventes orgânicos com polaridade crescente como o diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) sendo realizadas 3 extrações para cada solvente utilizando o ultrassom por 20 minutos. Os extratos dos caldos fermentados foram obtidos por extração líquido-líquido com DCM e AcOEt. Tanto os extratos do micélio como do caldo fermentado, foram concentrados em evaporador rotatório a 45°C, e posteriormente pesados em balança de precisão analítica.

2.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Os extratos foram analisados por CCDC afim de obter informações sobre as classes químicas presentes. Com auxílio de capilares, alíquotas dos extratos brutos foram aplicadas em placas

cromatográficas de sílica – PF 254 e onde foram utilizados diferentes sistemas de eluição [23]. Após a seleção do sistema de eluição mais eficiente, as placas cromatográficas foram observadas sob a luz ultravioleta (revelador físico) nos comprimentos de onda (λ) 254 e 365 nm. Em seguida as placas foram borrifadas com reveladores químicos como: sulfato cérico ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$), cloreto férrico (FeCl_3) e Reagente de Dragendorff [24-27].

2.4 Cromatografia em coluna (CC)

Dos extratos obtidos a partir do fungo *N. hiratsukae* foram selecionados o extrato DCM, a fase DCM (obtida a partir da extração líquido-líquido) e o extrato AcOEt para o fracionamento em coluna aberta. O fracionamento do extrato DCM resultou em 20 frações. Essa amostra (17 mg) foi fracionada em coluna aberta (12 cm de altura e 0,4 cm de diâmetro) de sílica gel 60 (1,36 g, partículas de 230-400 mesh – Sigma Aldrich), usando gradiente de MeOH em DCM (DCM 100%, DCM/MeOH 99:1, 98:2, 97:3, 95:5, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1). O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna foi de 10 mL. O fracionamento da fase DCM resultou em 41 frações. Esta amostra (94 mg) foi fracionada em coluna aberta (21 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro) de sílica gel 60 (7,76 g, partículas de 230-400 mesh – Sigma Aldrich), usando os mesmos sistemas listados para extrato DCM. O fracionamento do extrato AcOEt resultou em 53 frações. Esta amostra (168 mg) foi fracionada em coluna aberta (21 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro) de sílica gel 60 (13,44 g, partículas de 230-400 mesh – Sigma Aldrich), usando gradiente de AcOEt em DCM (DCM 100%, DCM/AcOEt 95:5, 9:1, 85:15, 8:2, 1:1), AcOEt 100% e MeOH 100%. O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna foi de 100 mL.

2.5 Testes biológicos

2.5.1 Atividade antibacteriana

Para o teste de atividade antibacteriana foi utilizado o método de microdiluição em placa de 96 poços. As amostras foram pesadas e solubilizadas em DMSO para obter a concentração final de 1 mg/mL. As amostras foram testadas frente às bactérias patogênicas humanas: *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) [28-29].

2.5.2 Atividade tóxica frente à *Artemia salina*

Os testes para verificar a possível atividade tóxica sobre o microcrustáceo *Artemia salina* foram realizados em triplicata de cada uma das amostras testadas, nas concentrações de 1000, 500 e 100 $\mu\text{g/mL}$ conforme metodologia de Meyer (1982) [30] adaptado por Cechinel et al.,

(2003) ^[31]. A determinação da toxicidade foi realizada através do percentual (%) de mortalidade das larvas.

2.5.3 Atividade antifúngica

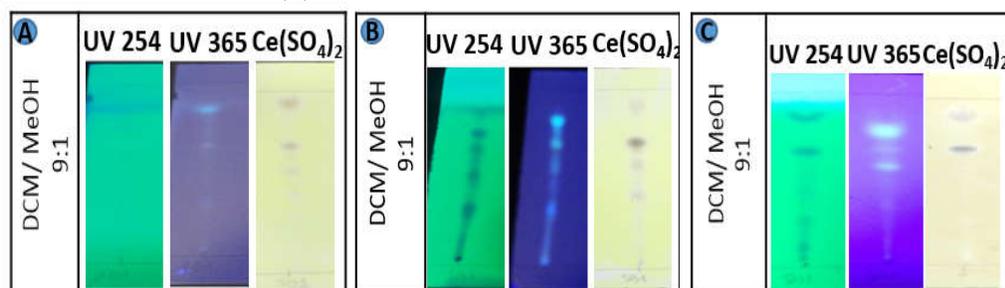
Para o teste de atividade antifúngica foram utilizados o *Cryptococcus gattii* e a *Candida albicans* obtidos de amostras clínicas e pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do Inpa. A metodologia utilizada foi a determinada pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) M27A2* ^[32]. O teste foi realizado em 10 concentrações (0,800, 0,400, 0,200, 0,100, 0,050, 0,025, 0,012, 0,006, 0,003, 0,001 mg/mL) tendo como controle positivo a Anfotericina B (16 µg/mL). A leitura da atividade antifúngica foi determinada após 48 e 72 horas (*C. albicans* e *C. gattii* respectivamente).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos que apresentaram reação positiva para terpenos e fluorescência nos reveladores físicos foram fracionados. As fluorescências visualizadas no λ 365 nm (Figura 1) do extrato e fase DCM e extrato acetato indicaram a presença de moléculas com duplas ligações conjugadas e/ou substâncias aromáticas. Observou-se a presença de substâncias características de terpenos, por revelar com $Ce(SO_4)_2$ (coloração roxa). Quando estes extratos foram revelados com $FeCl_3$ e Reagente de Dragendorff verificou-se a ausência de compostos aromáticos e alcaloides.

[LC1] Comentário: Verificar trabalhos que usaram o mesmo método de triagem de substâncias. Considerar tbm os prós e os contra de se utilizar este método. Por que não usar hplc?

Figura 1 - CCDC dos extratos brutos de *N. hiratsukae* escolhidos para fracionamento (A). Extrato diclorometânico (B). Fase diclorometânica (C). Extrato acetato

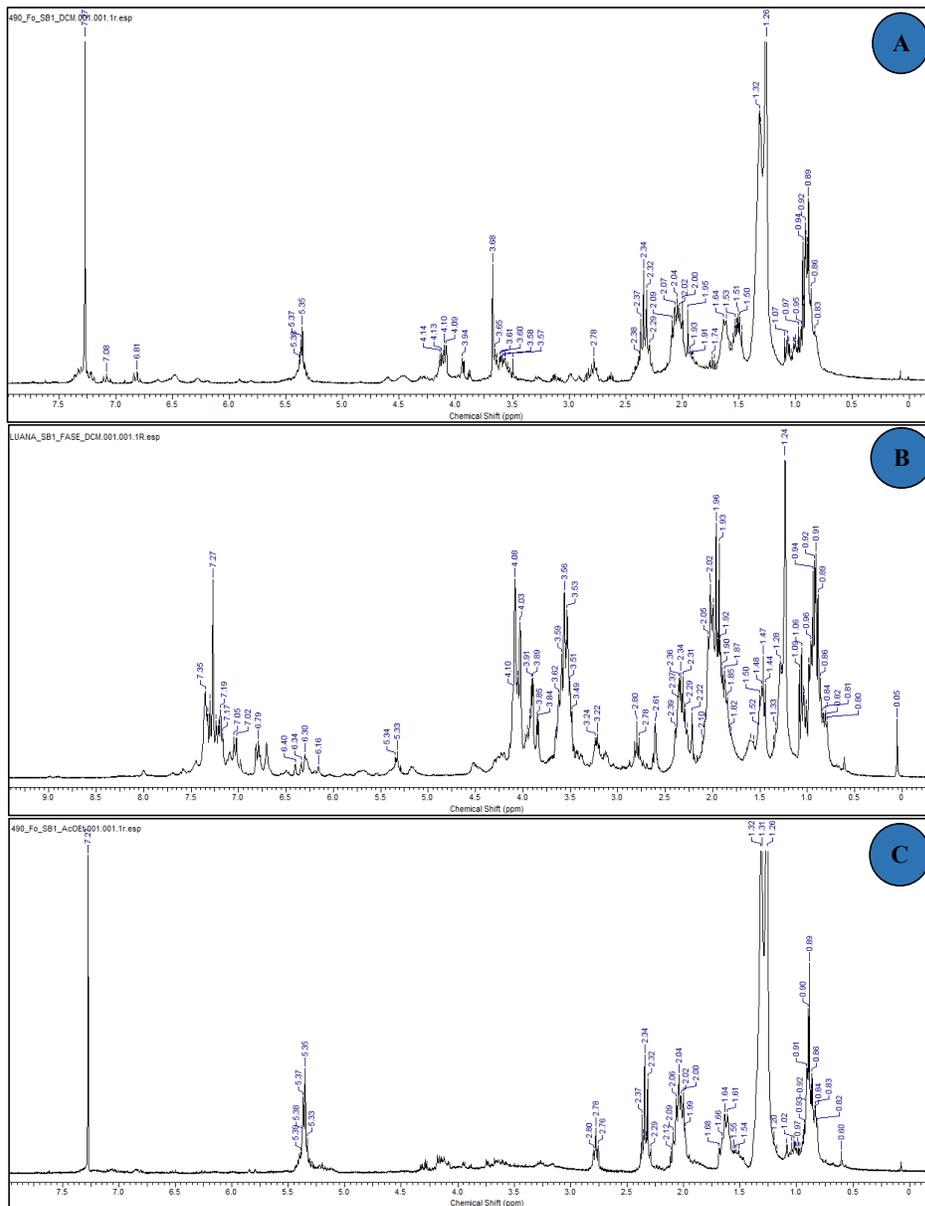


De um modo geral, os espectros de RMN de 1H (Figura 2) dos extratos brutos selecionados para fracionamento apresentaram sinais na região de hidrogênios metílicos, metilênicos e também na região de aromáticos a presença de substâncias com hidrogênios em cadeias acíclicas alifáticas, alifáticas mono e dissustituídas, alquenos e aromáticos ^[36-37].

[LC2] Comentário: Se quiser comentar a presença de terpenos e também flavonoides ou outras substâncias também seria interessante...

Algumas substâncias quando minoritárias na amostra, podem não ser reveladas mesmo na presença de reveladores químicos específicos quando analisados por CCDC [33]. No caso deste trabalho, não houve revelação com reagente de Dragendorff pela ausência de alcaloides nas amostras testadas.

Figura 2 - Espectro de RMN de ^1H dos extratos brutos de *N. hiratsukae* (CDCl_3 , 300 MHz) (A). Extrato diclorometânico (B). Fase diclorometânica (C). Extrato acetato



Tal análise feita por este reagente nas placas de CCDC pôde ser confirmada também pelos espectros de ^1H onde não foram encontrados sinais característicos de alcaloides (deslocamentos de 8,0 a 9,0 ppm). Em contraste ao obtido nesse trabalho, Yu et al., (2016)^[16] isolou de *N. udagawae* (endofítico de *Aricennia marina*) 5 compostos pertencentes ao grupo dos alcaloides indólicos, sendo que dois (neosatoriadinas A e B) apresentaram alta atividade biológica frente ao vírus *influenza A* (H1N1).

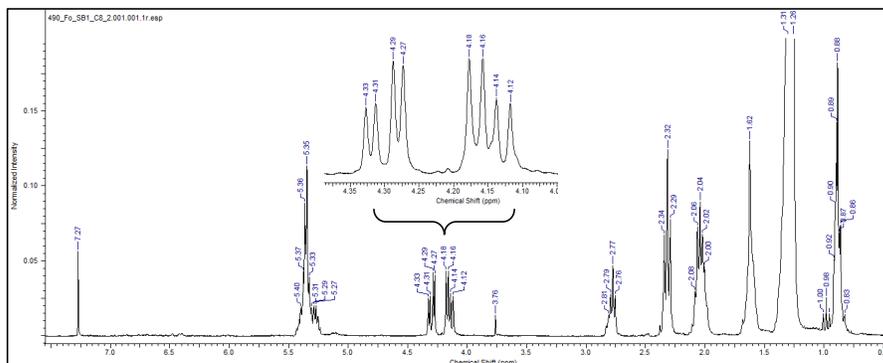
Poucos são os registros de bioprospecção com espécies de *Neosartorya* isolados de plantas, mas endofíticos de outros gêneros demonstraram a capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos. Li et al (2012)^[34] isolaram 36 metabólitos secundários de *Aspergillus fumigatus* (anamorfo de *Neosartorya*) de onde foram obtidas 16 moléculas com potente atividade antifúngica. De *Penicillium citrinum* foram isolados dois policetídeos inéditos com potente atividade citotóxica frente à linhagem L5178Y causadora de linfoma^[34].

No espectro da figura 2B podem ser visualizadas regiões com picos referentes à hidrogênios aromáticos (deslocamentos em torno de 7 ppm). Esses hidrogênios são mais deslocados devido ao fenômeno de desproteção causado pela disposição da molécula em formato de anel^[36-37]. Isso significa que a amostra possui substâncias que apresentam anel aromático, porém as mesmas encontram-se em baixa concentração, não sendo suficiente para ser evidenciada por CCDC quando utilizado o revelador FeCl_3 .

As análises das CCDC reveladas com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ indicaram a possível presença de terpenos. Ao analisar os três espectros de *N. hiratsukae* foi possível verificar a existência de hidrogênios de terpenos em todas as amostras. Índícios da presença de terpenos nos espectros de RMN de ^1H podem ser observados quando há sinais característicos de hidrogênios metílicos no deslocamento entre 0,7 e 2,0 ppm e a presença de ligação dupla isolada entre 5 e 6 ppm^[38].

No espectro de RMN de ^1H da fração 6 do extrato acetato (Figura 3) foi observada a presença de sinais característicos de triglicérides (prótons glicéricos 4,05-4,40 ppm)^[39].

Figura 3 - Espectro de RMN de ^1H da fração 6 do extrato acetato (CDCl_3 , 300 MHz)



Para Chapla (2014)^[40] a produção dessas substâncias é bastante interessante, pois em estudos prévios foram isolados triglicerídeos que apresentaram atividade biológica contra *Mycobacterium tuberculosis*. Fungos produtores de triglicerídeos também têm sido estudados sobre o enfoque da produção de biodiesel^[41].

Quanto aos testes biológicos as amostras não tiveram atividade frente às cepas de bactérias testadas. Os resultados do teste de toxicidade frente à *A. salina* demonstraram que os extratos na maior concentração (1000 $\mu\text{g/mL}$) não foram tóxicos.

4 CONCLUSÃO

No presente trabalho foi possível constatar que os extratos brutos de *N. hiratsukae* apresentaram indícios da presença de triglicerídeos, terpenos e compostos aromáticos. Porém, não possuem atividade antimicrobiana contra as bactérias e fungos testados. E não houve indícios de toxicidade frente à *A.salina* de nenhum dos extratos testados. Mas enfatiza-se que este é o primeiro registro de bioprospecção de *Neosartorya* como endofítico em uma espécie da família Olacaceae.

5 REFERÊNCIAS

1. PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J.H.; HIRANO, S.S. (Org.). Microbial ecology of leaves. New York: Springer-Verlag, 1991. p.179-187.
2. RAMOS, H.P. 60p. Otimização das condições de cultivo do fungo *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. para produção de metabólitos secundários com atividade

biológica. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008.

3. WICKLOW, D.T.; ROTH, S.; DEYRUP, S.T.; GLOER, J.B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, v.109, n.5, p.610–618, 2005.

4. WANG, J.; HUANG, Y.; FANG, M.; ZHANG, Y.; ZHENG, Z.; ZHAO, Y.; SU, W. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.34, p.51-57, 2002.

5. BENNETT, J.W. An Overview of the Genus *Aspergillus*. In. *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Machida, M; Gomi, K. Japan:Caister Academic Press, p.1-17, 2010.

6. AN, Z. *Handbook of Industrial Micology*. Volume 22. New York: Marcel Dekker, 2005.

7. UDAGAWA, S; TSUBOUCHI, H; HORIE, Y. *Neosartorya hiratsukae*, a new species of food-borne Ascomycetes. *Transactions of the Mycological Society of Japan*, v.32, p.23–29, 1991.

8. MALLOCH, D; CAIN, R. F. The Trichocomataceae: Ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces*, and *Penicillium* imperfect states. *Canadian Journal of Botany*, v.50, p.2613–2628, 1972.

9. SAMSON, R.A; HONG, S; PETERSON, S.W; FRISVAD, J.C; VARGA, J. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in Mycology* 59: 147–203. 2007.

10. GUARRO, J; KALLAS, E,G; GODOY, P; KARENINA, A; GENÉ, J; STCHIGEL, A; COLOMBO A.L. Cerebral aspergillosis caused by *Neosartorya hiratsukae*, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v.8, n.9, p.989-991, 2002.

11. KOUTROUTSOS, K; ARABATZIS, M; BOUGATSOS, G; XANTHAKI, A; TOUTOUZA, M; VELEGRAKI, A. *Neosartorya hiratsukae* peritonitis through continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Journal of Medical Microbiology*, v.59, p.862–865, 2010.
12. HAN, J; NA, K. Dermatitis caused by *Neosartorya hiratsukae*: Infection in a Hedgehog. *Journal of Clinical Microbiology*, v.46, n.9, p. 3119–3123, 2008. 763p.
13. MAGATON, A.S; RUBINGER, M.M.M; MACEDO JÚNIOR, F.C; ZAMBOLIM, L. Synthesis and antifungal activity of new bis- γ -lactones analogous to avenaciolide. *J. Braz. Chem. Soc*, v.18, n. 2, p.284-290, 2007.
14. DIJKSTERHUIS, J. Heat-resistant ascospores. In: Dijksterhuis, J; Samson, R.A. *Food Mycology: A Multifaceted Approach to Fungi and Food*. Volume 25. CRC Press, p. 101–117, 2007.
15. EAMVIJARN, A; GOMES, N.M; DETHOUP, T; BUARUANG, J; MANOCH, L; SILVA, A; PEDRO, M; MARINI, I; ROUSSIS, V; KIJJOA, A. Bioactive meroditerpenes and indole alkaloids from the soil fungus *Neosartorya fischeri* (KUFC 6344), and the marine-derived fungi *Neosartorya laciniosa* (KUFC 7896) and *Neosartorya tsunodae* (KUFC 9213). *Tetrahedron*, v.69, p. 8583-8591, 2013.
16. YU, G; ZHOU, G; ZHU, M; WANG, W; ZHU, T; GU, Q; LI, D. Neosartoryadins A and B, fumiquinazoline alkaloids from a mangrove-derived fungus *Neosartorya udagawae* HDN13-313. *Org. Lett.*, v.18, p.244–247, 2016.
17. ARUNRATTIYAKORN, P; SUKSAMRARN, S; SUWANNASAI, N; KANZAKI, H. Microbial metabolism of α -mangostin isolated from *Garcinia mangostana* L. *Phytochemistry*, v.72, p.730–734, 2011.
18. KAUR, A; SWENSON, DC; WICKLOW, D.T; GLOER, J.B. New fiscalin, tryptoquivaline, and fumiquinazoline analogues from an endophytic isolate of *Neosartorya aureola*. *Planta Med* – v. 79, PL25, 2013.

19. PEREIRA, J.O; AZEVEDO, J.L; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*. *Mycologia*, v.85, p.362-364, 1993.
20. ARAÚJO, W.L; LACAVAL, P.T; MARCON, J; LIMA, A.O.S; SOBRAL, J.K; PIZZIRANI-KLEINER, A.A; AZEVEDO, J.L Guia prático: isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos. Piracicaba: Calo, 2010. 167 p.
21. WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. p.315-322. 1990.
22. SOUZA, A. Q. L. DE. Potencial genético e químico dos endófitos de *Murraya paniculata* L. (Jack). 128p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, 2006.
23. LOPES, J.L.C. Cromatografia em camada delgada. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (Org.). *Fundamentos de cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. p. 67-86.
24. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 6.ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990. 279p.
25. COSCIA, C.J. *CRC Handbook of Chromatography Terpenoids*. Florida: CRC Press. Inc, 1984, vol.1, p.183.
26. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007, 1102p.
27. WAGNER, H.; BLADT. S.; ZGAINSKI, E.M. *Plant Drug Analysis*. Alemanha: Springer – Verlag Berlin Heidelberg, 1984, 320p.
28. ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* v.64, p.711-713, 1998.

29. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 6 ed. 2003.
30. MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, n.8, p. 31 – 34, 1982.
31. CECHINEL FILHO, V.; NOLDIN, V.F.; MONACHE, F.D.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I.L.; PEDROSA, R.C.; YUNES, R.A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. *Quimica Nova*, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.
32. NCCLS. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição*. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
33. ZANCA, S.S. Análise fitoquímica sazonal e cultura de tecidos *in vitro* de *Duroia macrophylla* Huber. Dissertação (Mestrado em Botânica), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. 2015. 119p.
34. LI, X; ZHANG, Q; ZHANG, A; GAO, A. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. *J. Agric. Food Chem.* v.60, p.3424–3431, 2012.
35. LAI, D; BRÖTZ-OESTERHELT, H; MÜLLER, W.E.G; WRAY, V; PROKSCH, P. Bioactive polyketides and alkaloids from *Penicillium citrinum*, a fungal endophyte isolated from *Ocimum tenuiflorum*. *Fitoterapia*, v.91, p.100–106, 2013.
36. PAVIA, D.L; LAMPMAN, G.M; KRIZ, G.S; VYVYAN, J.R. Introdução à espectroscopia. 4 ed. Editora Cengage Learning, 2010.

37. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7 ed. Editora LTC, 2006.
38. GAYSINSKI, M; ORTALO-MAGNÉ, A; THOMAS, O.P; CULIOLI, G. Extraction, purification, and NMR analysis of terpenes from brown algae. In: STENGEL, D.B; CONNAN, S. Natural products from marine algae. Springer New York, p.207-223. 2015.
39. KILLNER, M.H.M. Emprego da espectroscopia NIR e RMN de ¹H de baixo campo no monitoramento da reação de transesterificação para a produção de biodiesel. Determinação de parâmetros de qualidade de diesel por RMN de ¹H de baixo campo. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2013. 123p.
40. CHAPLA, V.M. Bioprospecção dos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Eugenia jambolana* e utilização de modificador epigenético no cultivo do fungo *Lecythophora* sp. Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual Paulista – UNESP. 2014. 251p.
41. MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

CAPÍTULO II

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DOS
EXTRATOS BRUTOS DE *Diaporthe hongkongensis* (Gomes,
Glienke & Crous)**

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E BIOATIVIDADE DOS EXTRATOS BRUTOS DE *Diaporthe hongkongensis* (Gomes, Glienke & Crous)

*Casas, L.L.; **Nunez, V.C.

*Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brasil

**Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Resumo

Fungos endofíticos são micro-organismos que habitam no interior dos vegetais sem lhe causar danos. Nas últimas décadas muitos estudos têm sido realizados visando à prospecção de fungos endofíticos capazes de produzir substâncias biologicamente ativas, tais como alcaloides, esteroides, isocumarinas, terpenos e outras classes químicas. Assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente os extratos brutos de *Neosartorya hiratsukae*, isolado e identificado da folha de *Minuartia guianensis* Aubl. Olacaceae, bem como avaliar as atividades antimicrobiana, e de toxicidade frente a *Artemia salina*. Folhas de *M. guianensis* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke e submetidas ao processo de desinfestação. Dos fungos isolados, *Diaporthe hongkongensis* foi selecionado para estudo. Ele foi incubado por 20 dias em PD e 25 dias em SB em incubadora *shaker* a 120 rpm sob a temperatura de 30 °C. Os extratos brutos foram extraídos com solventes orgânicos e analisados por CCDC, CC e RMN de ¹H. O extrato DCM apresentou inibição de *C. gattii* nas concentrações de 0,8 e 0,4 mg/mL. O perfil químico obtido por RMN de ¹H indicou a presença de terpenos, compostos aromáticos e triglicerídeos. Este é o primeiro registro de bioprospecção de fungos endofíticos em *M. guianensis* na literatura.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Diaporthe*, anamorfo *Phomopsis* pertence ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, subclasse Sordariomycetidae, ordem Diaporthales, família Diaporthaceae (Rossman, Farr e Castlebury, 2007).

Espécies do gênero *Diaporthe* Nitschke (*Phomopsis*) têm sido descritas em uma ampla gama de hospedeiros em todo o mundo e como um dos gêneros mais frequentemente isolados (Fischer et al., 1994; Shamon e Sieber 2000). Podem ser encontrados como fitopatogênicos de importância econômica, endofíticos, saprofíticos e como patógenos humanos e outros mamíferos (Gomes, 2012, Rehner, Uecker, 1994; Rossman, Farr e Castlebury, 2007).

A espécie *D. hongkongensis* foi isolada do fruto de *Dichroa febrifuga* (Hydrangeaceae) em 2002, mas foi identificada somente em 2012 (Gomes, 2012). Foi encontrada como endofítica em *Macrosolen cochinchinensis* (Zou et al. 2015) e como fitopatogênica em parreiras na China, causando muitos prejuízos econômicos (Dissanayake et al. 2015).

As descobertas de novos metabólitos de fungos biologicamente ativos têm sido foco da produção científica em todo o mundo, incluindo novos antibióticos, agentes

quimioterápicos e defensivos agrícola. O gênero *Diaporthe* tem sido relatado como um gênero em potencial para o uso na biotecnologia com várias descobertas importantes, incluindo novos metabolitos fúngicos estruturalmente significativos e fisiologicamente ativos (Gomes, 2012).

Estudos de bioprospecção com fungos deste gênero levaram ao isolamento de diversas substâncias com atividade biológica. Entre elas pode-se citar atividade antimalárica, antimicrobiana (como o ácido 3-nitropropiónico), antifúngica e citotóxica frente às linhagens cancerígenas HepG2, MCF-7 e NCI-H187 (Kornsakulkarn et al., 2015; Lu et al, 2015; Hussain et al., 2012). Todos os fungos que deram origem às atividades testadas foram encontrados como endofíticos.

Segundo Petrini (1991) fungos endofíticos são micro-organismos que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem, aparentemente, causar qualquer efeito negativo aos seus hospedeiros. O interesse da comunidade científica se voltou para esses micro-organismos a partir da descoberta do potencial destes na produção de metabólitos secundários que compreendem uma diversa gama de estruturas incluindo alcaloides, esteroides, isocumarinas, terpenos e outros diversos grupos estruturais (RAMOS, 2008). A bioatividade destes compostos tem sido comprovada contra células cancerígenas, bactérias e fungos patogênicos e contra parasitas eucarióticos como aqueles causadores da malária (WICKLOW et al. 2005; WANG et al. 2002). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização química dos extratos brutos de *D. hongkongensis*, isolado das folhas de *M. guianensis* Aubl. (Olacaceae), bem como suas respectivas atividades biológicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento e identificação do fungo

O material vegetal foi coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, AM nas coordenadas 2°55'24.69" S 59°58'26.12" W. Uma exsicata foi depositada no herbário do Inpa com o número de registro 261555. Foram utilizadas as folhas de *M. guianensis* para isolar o fungo *D. hongkongensis*. Para isso, as folhas foram levadas à câmara de fluxo laminar onde realizou-se o processo de desinfestação^[18,19]. As folhas lavadas foram seccionadas em pedaços com cerca de 1 cm e inoculados em 5 placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar) e 5 placas contendo meio SAB (Saboraud Agar) acrescidas com antibiótico (Oxitetraciclina 125 µg/mL). Em cada placa foram inoculados 5 fragmentos de folhas e as mesmas foram armazenadas em BOD a 30 °C por sete dias. O crescimento dos fungos foi monitorado e repiques sucessivos foram realizados até a obtenção das linhagens

puras. As cepas foram preservadas em frascos com água esterilizada estéril – método Castellani – armazenadas em temperatura ambiente e em microtubos com caldo estéril e glicerol a 20 % em ultrafreezer a - 80 °C [20]. A identificação do fungo foi realizada através da análise da região ITS conforme a metodologia descrita por White et al. (1990).

2.2 Cultivo e obtenção dos extratos

O fungo foi cultivado em dois meios de cultura diferentes. De cada meio líquido (SB e PD) foram incubados 250 mL com acréscimo de 0,2% de extrato de levedura em frascos Erlenmeyer de 500 mL em oito repetições. Os frascos foram mantidos em incubadora shaker sob a temperatura de 30 °C a 120 rotações por minuto (rpm) durante 20 e 25 dias (PD e SB respectivamente). Decorrido o tempo de crescimento, o micélio e o caldo fermentado foram separados por meio de filtração a vácuo de onde se obteve a massa micelial e o caldo fermentado (meio metabólico) (SOUZA, 2006). Para a obtenção dos extratos dos micélios foram utilizados solventes orgânicos com polaridade crescente como o diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) sendo realizadas 3 extrações para cada solvente utilizando o ultra-som por 20 minutos. Os extratos dos caldos fermentados foram obtidos por partição líquido-líquido com DCM e AcOEt. Tanto os extratos do micélio como do caldo fermentado, foram concentrados em evaporador rotatório e posteriormente pesados em balança de precisão analítica.

2.3 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Os extratos foram analisados por CCDC para se obter informações sobre as classes químicas presentes. Com auxílio de capilares, alíquotas dos extratos brutos foram aplicadas em placas cromatográficas de sílica – PF 254 e onde foram utilizados diferentes sistemas de eluição (LOPES, 2006). Após a seleção do sistema de eluição mais eficiente, as placas cromatográficas foram observadas sob a luz ultravioleta (revelador físico) nos comprimentos de onda (λ) de 254 e 365 nm. Em seguida as placas foram borrifadas com reveladores químicos como: sulfato cérico ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$), cloreto férrico (FeCl_3), e cloreto de alumínio (AlCl_3) Reagente de Dragendorff (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1990; COSCIA, 1984; SIMÕES, 2007; WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984).

2.4 Cromatografia em coluna (CC)

Dos extratos obtidos a partir do fungo *D. hongkongensis* foi selecionado o extrato diclorometânico (obtido do micélio crescido em SB) para o fracionamento em coluna aberta. O fracionamento do extrato DCM resultou em 123 frações. Esta amostra (256 mg) foi

fracionada em coluna aberta (36 cm de altura e 1,2 cm de diâmetro) de sílica (20,48 g, partículas de 230-400 mesh – Sigma Aldrich), usando os sistemas: HEX/DCM 3:7, DCM 100%, DCM/MeOH 98:2, 95:5, 9:1, 8:2, 7:3, 1:1. O volume de cada sistema de eluição adicionado à coluna foi de 100 mL.

2.5 Caracterização estrutural

Após evaporação do solvente e análise por CCDC as frações 71-75 foram reunidas e escolhidas para dar prosseguimento à caracterização estrutural. Para identificação foram utilizados métodos espectroscópicos (RMN de ^1H , ^{13}C uni e bidimensional) e espectrométricos (espectrometria de massa de alta resolução).

2.5 Testes biológicos

2.5.1 Atividade antimicrobiana

Para o teste de atividade antibacteriana foi utilizado o método de microdiluição em placa de 96 poços. As amostras foram pesadas e solubilizadas em DMSO para obter a concentração final de 1 mg/mL. As amostras foram testadas frente às bactérias patogênicas humanas: *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) (ELOFF, 1998; CLSI, 2003).

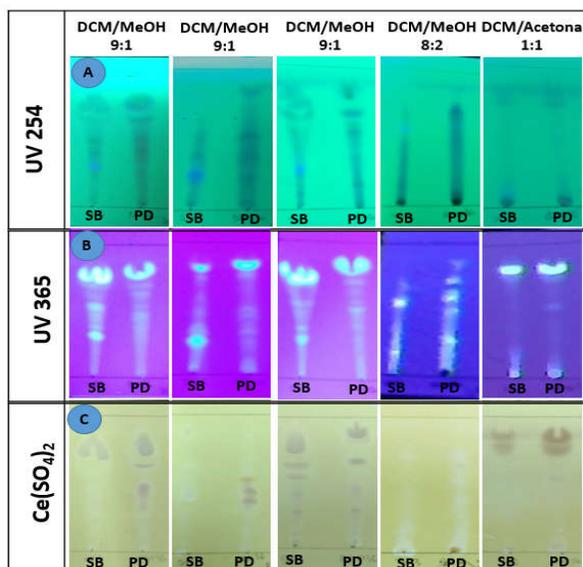
2.5.2 Atividade antifúngica

Para o teste de atividade antifúngica foram utilizados o *Cryptococcus gattii* e a *Candida albicans* obtidos de coletas clínicas e pertencentes à Coleção Micológica do Inpa. A metodologia utilizada foi a determinada pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) M27A2 ^[31]. O teste foi realizado em 10 concentrações (0,800, 0,400, 0,200, 0,100, 0,050, 0,025, 0,012, 0,006, 0,003, 0,001 mg/mL) tendo como controle positivo a Anfotericina B (16 µg/mL). A leitura da atividade antifúngica foi determinada após 48 e 72 horas (*C. albicans* e *C. gattii* respectivamente).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas placas de CCDC (figura 1) podem ser visualizados os extratos provenientes dos dois caldos.

Figura 1 - Placas de CCDC dos extratos brutos. Da esquerda para a direita: extrato DCM, fase DCM, extrato AcOet, fase AcOet, extrato metanólico. Meios líquidos PD = potato dextrose; SB = Saboraud



Todos os espectros obtidos por extração líquido-líquido foram comparados com o branco (meio de cultivo sem inoculação de fungo) e não apresentaram sinais semelhantes, evidenciando que os sinais observados são provenientes da produção metabólica dos fungos.

De um modo geral, os espectros de RMN de ¹H (Figura 2-6) dos extratos brutos apresentaram sinais na região de hidrogênios metílicos, metilênicos e também na região de aromáticos a presença de substâncias com hidrogênios em cadeias acíclicas alifáticas, alifáticas mono e dissustituídas, alquenos e aromáticos [36-37].

As análises das placas de CCDC reveladas com Ce (SO₄)₂ indicaram a possível presença de terpenos. Ao analisar os espectros das figuras de 2, 4, 5 e 6 foi possível verificar a existência de hidrogênios de terpenos. Índícios da presença desta classe nos espectros de RMN de ¹H podem ser observados quando há sinais característicos de hidrogênios metílicos no deslocamento entre 0,7 e 2,0 ppm e a presença de ligação dupla isolada entre 5 e 6 ppm [38].

No espectro de RMN de ¹H da fração 6 do extrato acetato (Figura 3) foi observada a presença de sinais característicos de triglicerídeos (prótons glicéricos 4,05-4,40 ppm) [39]. De modo geral, foi possível perceber que, mesmo em meios de cultura e dias de incubação diferentes, o fungo permaneceu produzindo os mesmos metabólitos.

Figura 2 - Espectro de RMN de ^1H dos extratos brutos do fungo *D. hongkongensis* (CDCl_3 , 300 MHz) A. Extrato diclorometânico (PD) B. Extrato diclorometânico (SB)

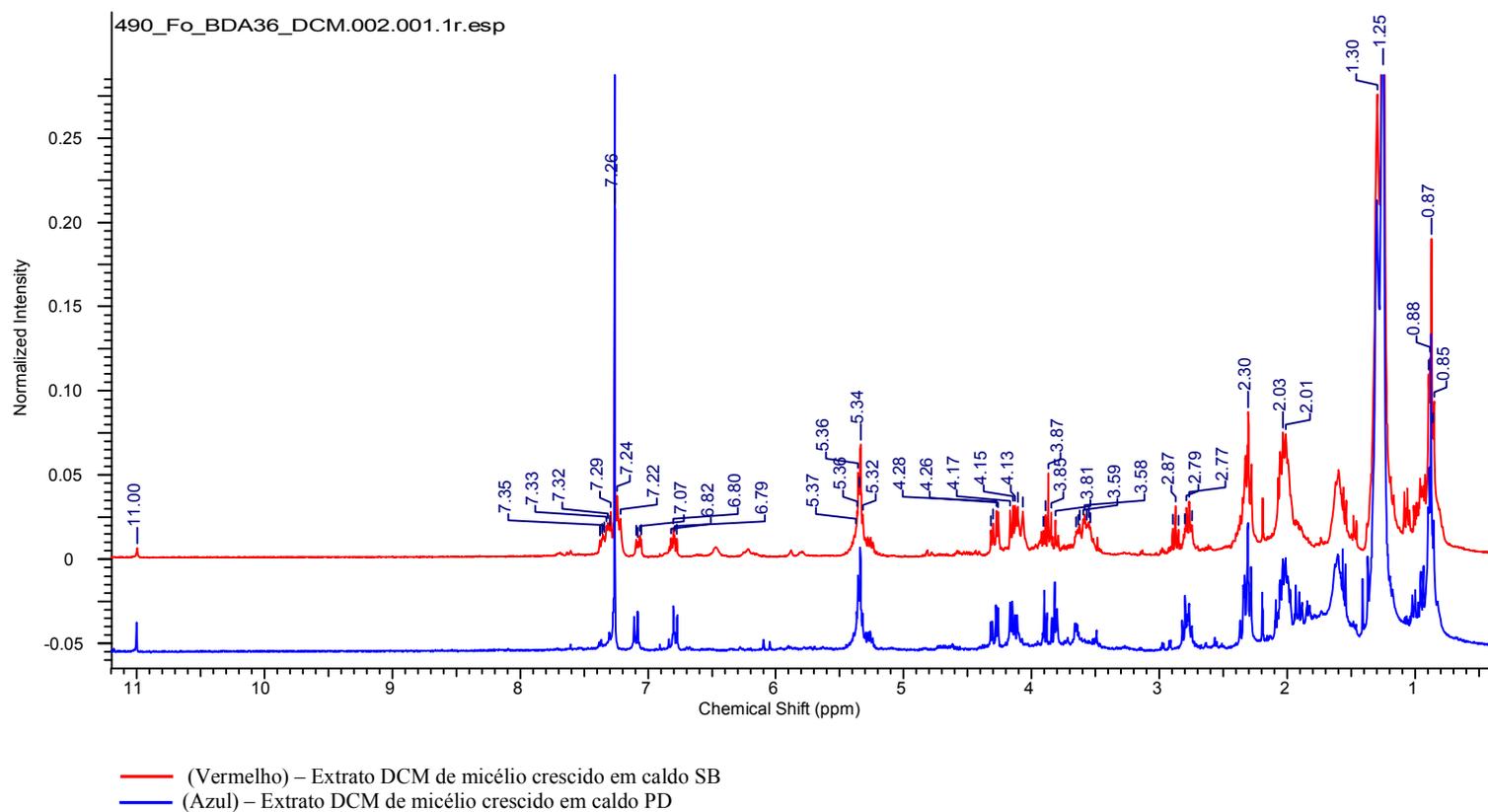


Figura 3 - Espectro de RMN de ^1H dos extratos brutos do fungo *D. hongkongensis* (CDCl_3 , 300 MHz) A. Fase diclorometânica (PD) B. Fase diclorometânica (SB)

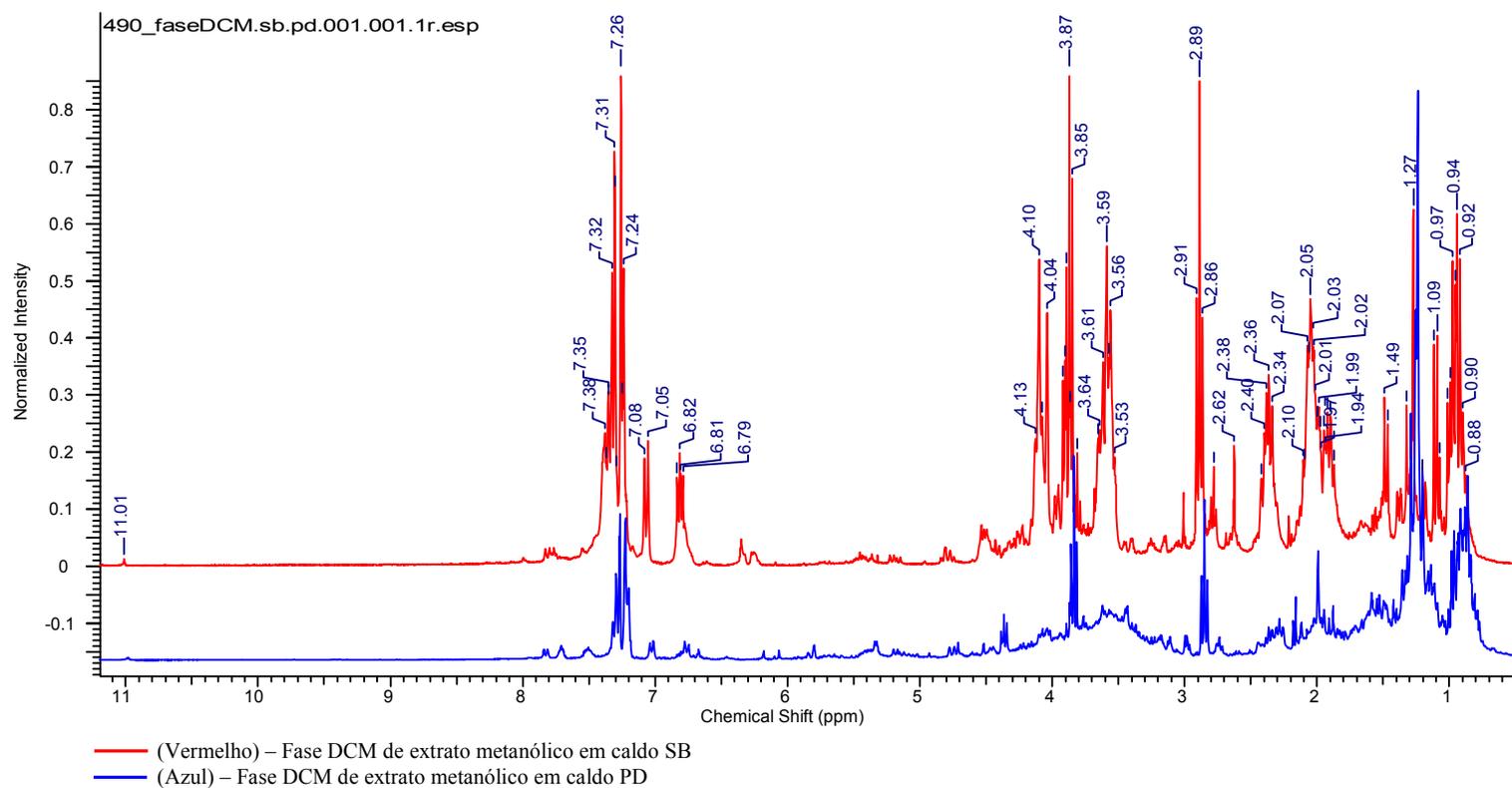
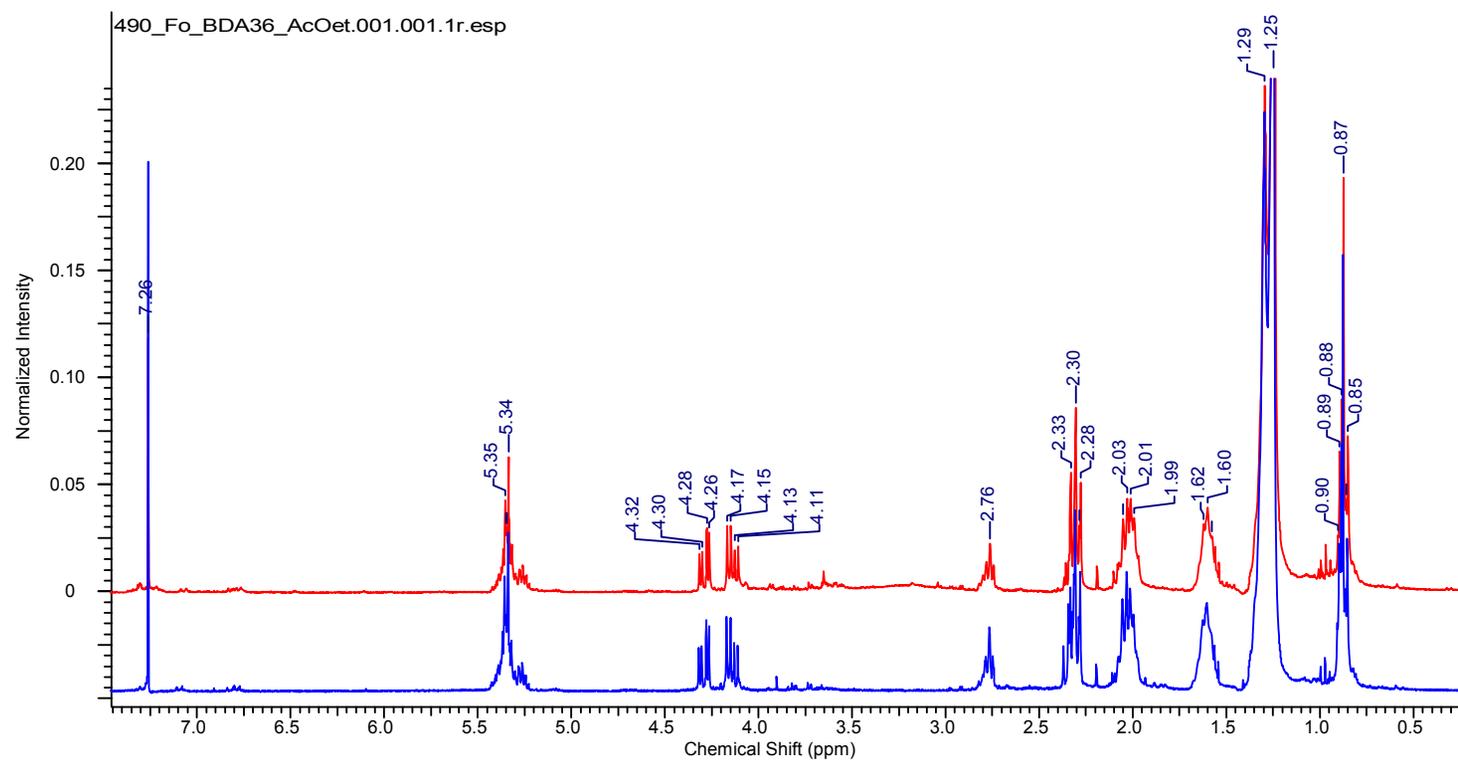


Figura 4 - Espectro de RMN de ^1H dos extratos brutos do fungo *D. hongkongensis* (300 MHz) A. Extrato acetato (SB, CDCl_3) B. Extrato acetato (PD, CDCl_3)



— (Vermelho) – Extrato acetato de micélio crescido em caldo SB

— (Azul) – Extrato acetato de micélio crescido em caldo PD

Figura 5 - Espectro de RMN de ^1H dos extratos brutos do fungo *D. hongkongensis* (300 MHz, DMSO_{d6}) A. fase acetato (SB) B. Fase acetato (PD)

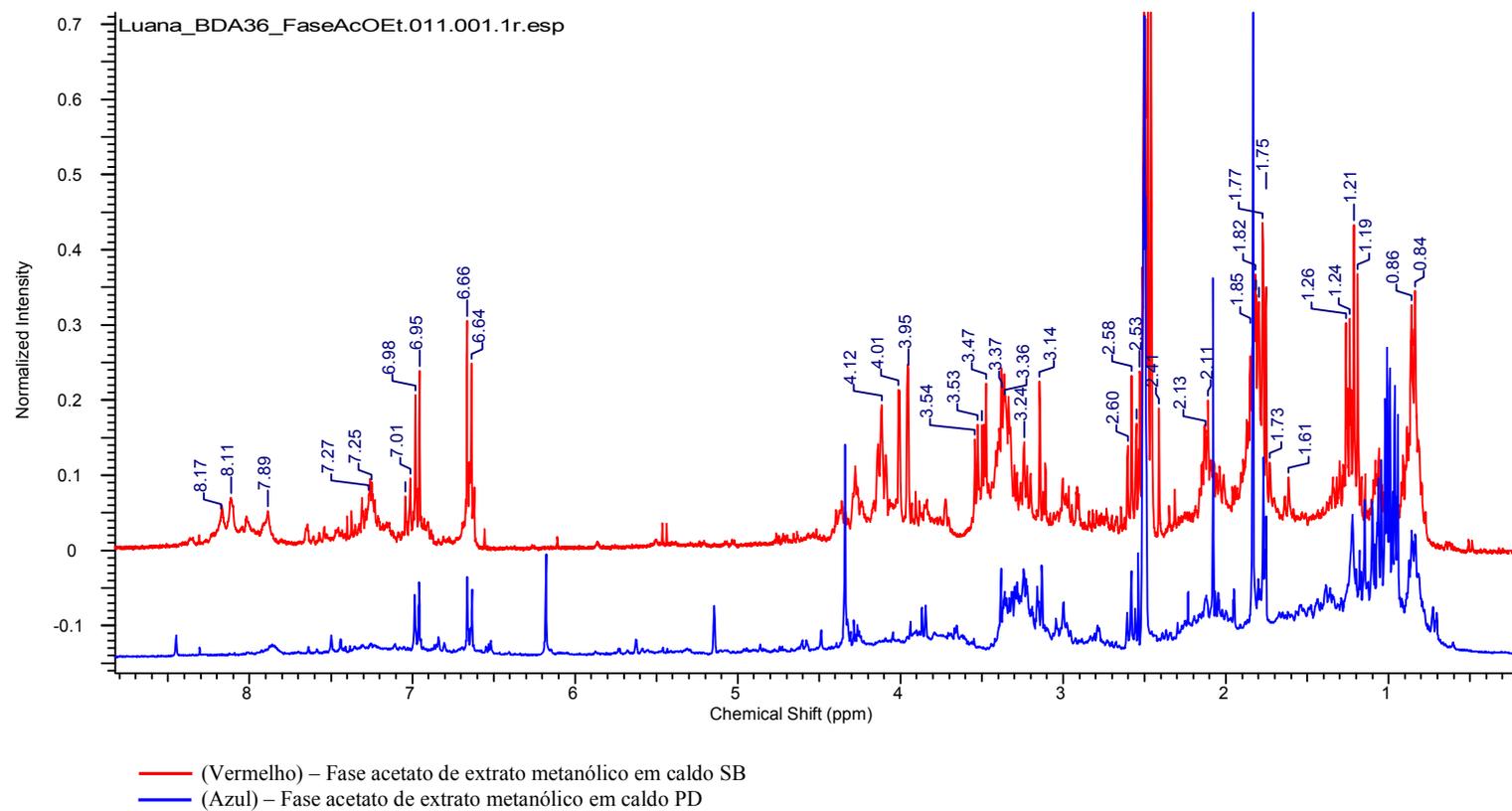
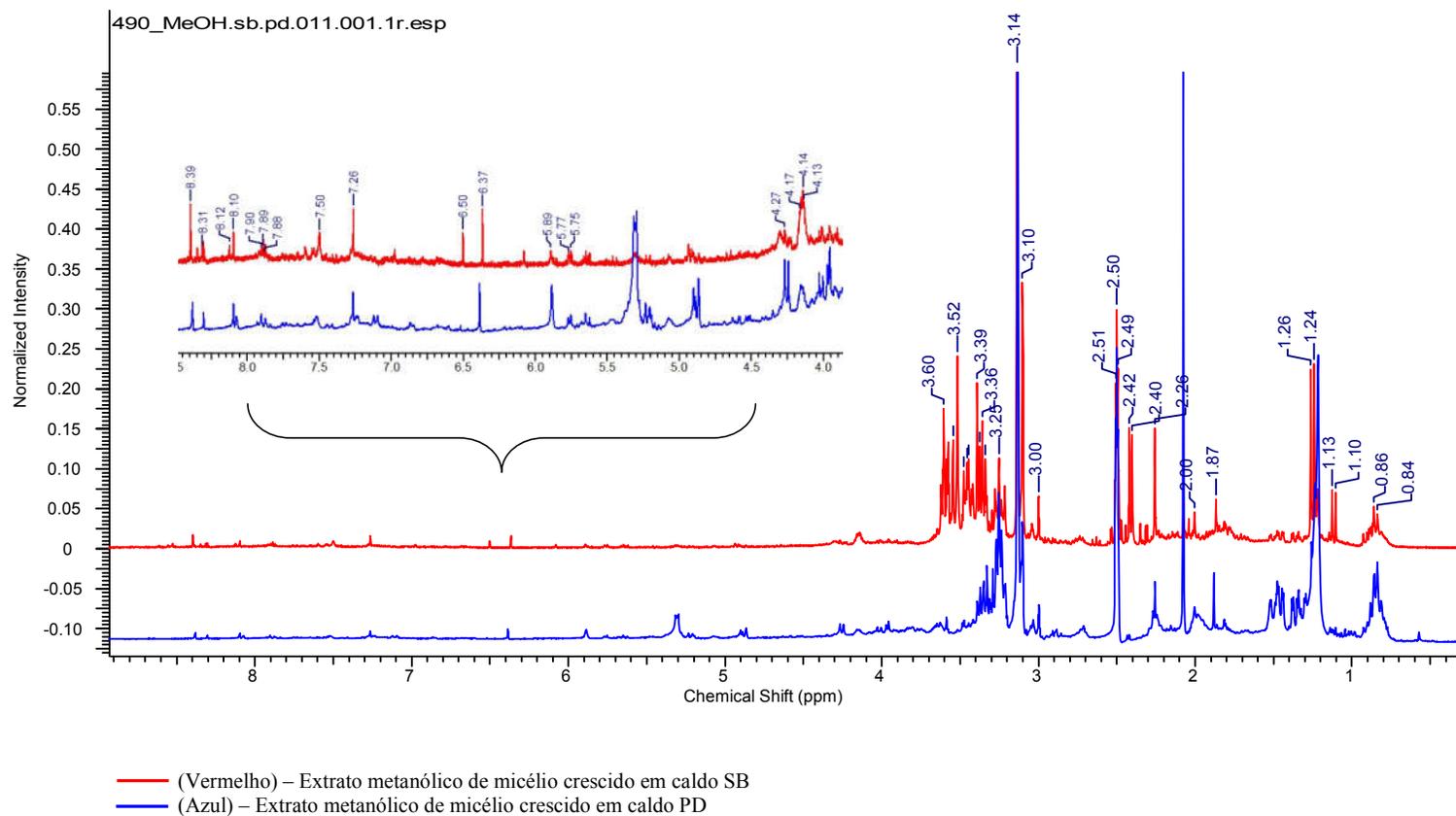


Figura 6 - Espectro de RMN de ^1H dos extratos brutos do fungo *D. hongkongensis* (300 MHz, DMSO_{d6}) A. Extrato metanólico (SB) B. Extrato metanólico (PD)



Quantos aos testes biológicos o resultado do teste de atividade antifúngica evidenciou que somente o extrato DCM (SB) foi capaz de inibir, nas concentrações de 0,8 e 0,4 mg/mL, o crescimento de *C. gattii*. Nenhuma das amostras testadas foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*.

Zanardi et al. (2012) também verificaram a atividade antifúngica de *Phomopsis cassiae* (endofítico de *Cassia spectabilis*) frente aos fungos patogênicos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. Os sesquiterpenos isolados deste fungo inibiram o crescimento dos patógenos na concentração de 0,05 mg/mL. Igualmente Krohn et al. (2011), obtiveram resultados significativos de atividade antifúngica frente ao *Microbotryum violaceum* da substância phomosina A isolada de *Phomopsis* sp (endofítico de *Ligustrum vulgare*). Deste modo, os fungos associados a espécies vegetais são promissoras fontes na busca por novos metabólitos secundários com atividade antifúngica.

O extrato e fase acetato (SB) apresentaram um percentual de mortalidade de 93% e 86%, respectivamente frente ao teste tóxico sobre *A. salina*. No entanto, em concentrações inferiores (500 e 100 µg/mL) os extratos não foram mais tóxicos.

Os resultados do teste de atividade antimicrobiana estão descritos na tabela 1. O extrato 10 na maior concentração inibiu 100% do crescimento de *P. aeruginosa* enquanto que o extrato 8 inibiu 87,3 %. Já o extrato 2 teve uma porcentagem de inibição de 69%. Essas mesmas amostras quando testadas em uma concentração menor (500 µg/mL), tiveram uma redução significativa quanto à inibição.

Diferente do que foi encontrado neste trabalho, Rao e Satish (2015) ao estudar o extrato acetato de *Phomopsis liquidambaris* (endofítico de *Cryptolepis buchanani*) verificou uma forte atividade antibacteriana frente à *E. coli* (25 µg/ml) seguido por *Bacillus subtilis* (50 µg/ml) e *P. aeruginosa* (100 µg/ml). Também obtiveram atividade antifúngica frente à *C. albicans* (100 µg/ml). Os pesquisadores atribuíram a atividade à molécula denominada de oblongolídeo Y.

De igual modo, Tong et al. (2014) analisando o extrato acetato de *Phomopsis* sp. verificou amplo espectro de ação do mesmo obtendo atividade inibitória tanto de bactérias quanto de fungos, com concentrações de 31.25 a 250 µg/mL. Análises espectroscópicas mostraram que a composição química da amostra contemplava constituintes como o ácido benzoico, lomustina e o ácido penicílico.

Huang et al. (2015) isolaram 17 compostos de *Phomopsis* sp. (endofítico de *Aconitum carmichaelii*) dentre os quais a hidroxivertixantona apresentou significativa atividade

antimicrobiana frente à *E. coli*, *B. subtilis*, *Pyricularia oryzae*, e *C. albicans* com valores de CIM de 256, 256, 128, e 64 µg/mL.

A capacidade dos fungos endofíticos de produzir substâncias que inibem fungos e bactérias é ecologicamente viável para seus hospedeiros, pois resulta em uma proteção mais completa de micro-organismos fitopatógenos (Rao e Satish, 2015).

É perceptível também a variabilidade de classes químicas isoladas do gênero *Phomopsis*. A manipulação das condições de cultivo tem sido demonstrada como um fator de impactos substanciais sobre a quantidade e diversidade na produção de metabólitos secundários (Molen et al., 2013).

O meio de cultura PD (ágar e/ou caldo) tem sido utilizado em várias pesquisas de prospecção de substâncias bioativas proveniente de fungos (Mandavi et al. 2015; Adein et al. 2011; Yashavanta et al. 2015; Rao e Satish, 2015; Huang et al. 2015). Além dele, outros meios têm sido utilizados como o YESB (*yeast extract sucrose broth*) (Tong et al. 2014), BSA (*biomalt solid agar*) (Ahmed et al. 2011; Hussain et al. 2012), Czapek (Wu et al. 2012), Saboraud e aqueles suplementados com arroz (Ronsberg et al. 2013; Li et al. 2015).

Neste trabalho foram utilizados os dois meios de cultura, porém, como visualizado no espectro as substâncias produzidas em ambos indicam ter as mesmas características químicas. Isso sugere que este fungo, mesmo em meios quimicamente diferentes, pode produzir substâncias da mesma classe química.

Tabela 1 - Concentração mínima inibitória das amostras testadas frente a 4 bactérias patogênicas humanas

| | % de inibição | | | |
|-----------|---------------|-----|------|------|
| | 1000 µg/mL | | | |
| | EC | SA | PA | KP |
| 2 | 69,0 | --- | --- | --- |
| 4 | 35,5 | --- | --- | 18,8 |
| 8 | --- | --- | 87,3 | --- |
| 10 | 53,1 | --- | 100 | --- |
| 12 | --- | --- | --- | --- |
| 16 | --- | --- | 68,5 | --- |

EC – *E. coli*, SA – *S. aureus*, KP – *K. pneumoniae*, PA – *P. aeruginosa*. Amostras: 2 – extrato diclorometânico (SB), 4 – extrato diclorometânico (PD), 8 – fase diclorometânica (PD), 10 – extrato acetato (SB), 12 – extrato acetato (PD), 16 – fase acetato (PD)

4 CONCLUSÃO

O extrato DCM de *D. hongkongensis* (*Phomopsis*) foi capaz de inibir o crescimento de *C. gattii* nas maiores concentrações o que nos direciona para estudos mais aprofundados para descobrir a (s) substância (s) ativa (s) responsável (eis) pela atividade. Este trabalho demonstra o potencial dos fungos endofíticos de plantas tropicais na produção de substâncias com atividade biológica.

5 REFERÊNCIAS

ADELIN, E.; SERVY, C.; CORTIAL, S.; LÉVAIQUE, H.; MARTIN, M.; RETAILLEAU, P.; LE GOFF, G.; BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; OUAZZANI, J. Isolation, structure elucidation and biological activity of metabolites from Sch-642305-producing endophytic fungus *Phomopsis* sp. CMU-LMA. **Phytochemistry**, v.72, p.2406–2412, 2011.

AHMED, I.; HUSSAIN, H.; SCHULZ, B.; DRAEGER, S.; PADULA, D.; PESCIPELLI, G.; VAN REE, T.; KROHN, K. Three new antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. **Eur. J. Org. Chem.**, p.2867–2873, 2011.

DISSANAYAKE, A.J.; LIU, M.; ZHANG, W.; CHEN, Z.; UDAYANGA, D.; CHUKEATIROTE, E.; LI, X.; YAN, J.Y.; HYDE, K.D. Morphological and molecular characterisation of *Diaporthe* species associated with grapevine trunk disease in China. **Fungal Biology**, v.119, p.283-294, 2015.

FISHER, P.J.; PETRINI, O.; PETRINI, L.E.; SUTTON, B.C. Fungal endophytes from the leaves, and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca, and Switzerland. **New Phytol.**, v.127, p.133–137, 1994.

GOMES, R.R. **Filogenia e taxonomia do gênero *Diaporthe* e a sua aplicação no controle biológico da mancha preta dos citros**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, 2012. 86p.

HUANG, R.; MA, K.; XIE, X.; WANG, T.; WU, S. Secondary metabolites of an endophytic fungus *Phomopsis* sp. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n.2, p.392-394, 2015.

HUSSAIN, H.; KROHN, L.; AHMED, I.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; DI PIETRO, S.; PESCIPELLI, G. Phomopsinones A–D: four new pyrenocines from endophytic fungus *Phomopsis* sp. **Eur. J. Org. Chem.**, p.1783–1789, 2012.

KORNSAKULKARN, J.; SOMYONG, W.; SUPOTHINA, S.; BOONYUEN, N.; THONGPANCHANG, N. Bioactive oxygen-bridged cyclooctadienes from endophytic fungus *Phomopsis* sp. BCC 45011. **Tetrahedron**, v.71, p.9112-9116, 2015.

KROHNA, K.; FAROOQ, U.; HUSSAINA, H.; AHMEDA, I.; RHEINHEIMER, J.; DRAEGER, S.; SCHULZ, B.; VAN REED, T. Phomosines H–J, novel highly substituted biaryl ethers, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Ligustrum vulgare*. **Natural Product Communications**, v.6, n.12, p.1907-1912, 2011.

LI, G.; KUSARI, S.; KUSARI, P.; KAYSER, O.; SPITELLER, M. Endophytic *Diaporthe* sp. LG23 produces a potent antibacterial tetracyclic triterpenoid. **J. Nat. Prod.**, v.78, p.2128–2132, 2015.

LU, F.T.; MA, D.C.; YAN, W.; GUO, J.; BAI, L.H. Antitumour activity of 3-nitropropionic acid from *Phomopsis* sp. and optimization of fermentation conditions. **Letters in Applied Microbiology**, v.61, p.165–170, 2015.

MANDAVID, H.; RODRIGUES, A.M.S.; ESPINDOLA, L.S.; EPARVIER, V.; STIEN, D. Secondary metabolites isolated from the Amazonian endophytic fungus *Diaporthe* sp. SNB-GSS10. **J. Nat. Prod.** v.78, p.1735–1739, 2015.

MOLEN, K.M.V.; RAJA, H.A.; EL-ELIMAT, T.; OBERLIES, N.H. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, v.3, p.1–7, 2013.

Q. WU, Y. GUO, Z. K. GUO, Y. L. CHU, T. WANG, AND R. X. TAN. Two new cytosporones from the culture of endophytic *Phomopsis* sp. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 48, n.6, p.938–941, 2013.

RAO, H. C. Y.; SANTOSH, P.; RAKSHITH, D.; SATISH, S. Molecular characterization of an endophytic *Phomopsis liquidambaris* CBR-15 from *Cryptolepis buchanani* Roem and impact of culture media on biosynthesis of antimicrobial metabolites. **3 Biotech**, v.5, 165–173, 2015.

RAO, H.C.Y.; SATISH, S. Genomic and chromatographic approach for the discovery of polyketide antimicrobial metabolites from an endophytic *Phomopsis liquidambaris* CBR-18. **Frontiers in Life Science**, 2015.

REHNER, S.A.; UECKER, F.A. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer phylogeny and host diversity in the coelomycete *Phomopsis*. **Can J Bot**, v.72, p.1666–1674, 1994.

RÖNSBERG, D.; DEBBAB, A.; MÁNDI, A.; VASYLYEVA, V.; BÖHLER, P.; STORK, B.; ENGELKE, L.; HAMACHER, A.; SAWADOGO, R.; DIEDERICH, M.; WRAY, V.; LIN, W.H.; KASSACK, M.U.; JANIÁK, C.; SCHEU, S.; WESSELBORG, S.; KURTÁN, T.; ALY, A.H.; PROKSCH, P. Pro-apoptotic and immunostimulatory tetrahydroxanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla*. **J. Org. Chem.** v.78, p.12409–12425, 2013.

ROSSMAN, A.Y.; FARR, D.F.; CASTLEBURY, L.A. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. **Mycoscience**, v.48, p.135–144, 2007.

SHAMOUN, S.F.; SIEBER, T.N. Colonisation of leaves and twigs of *Rubus parviflorus* and *R. spectabilis* by endophytic fungi in a reforestation site in British Columbia. **Mycol Res.**, v.104, p.841–845, 2000.

TONG, W. Y.; ZAADAH, J.N.; NURHAIDA; TAN, W.N.; MELATI, K.; LATIFFAH, Z.; DARAH, I. Antimicrobial activity of *Phomopsis* sp. ED2 residing in medicinal plant *Orthosiphon stamineus* Benth. **Annual Research & Review in Biology**, v.4, n.9, p.1490–1501, 2014.

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

ZHOU, S; YAN, S; LIU, Q; CHEN, S. Diversity of endophytic fungi associated with the foliar tissue of a hemi-parasitic plant *Macrosolen cochinchinensis*. **Curr Microbiol.**, v.70, p.58-66, 2015.