

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SANDRA BARBOSA NEDER AGOSTINI

**PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO PRODUTO
DE FERMENTAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE *Handroanthus impetiginosus***

ALFENAS/MG

2016

SANDRA BARBOSA NEDER AGOSTINI

PROSPECÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO PRODUTO

DE FERMENTAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS

ISOLADOS DE *Handroanthus impetiginosus*

Trabalho apresentado como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jaine Honorata Hortolan Luiz

ALFENAS/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Agostini, Sandra Barbosa Neder.

Prospecção de compostos bioativos no produto de fermentação de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus impetiginosus* / Sandra Barbosa Neder Agostini. -- Alfenas/MG, 2016.
69 f.

Orientadora: Jaine Honorata Hortolan Luiz.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

Bibliografia.

1. Fungos. 2. Endófitos. 3. Tabebuia. 4. Fermentação. 5 *Alternaria alternata*. I. Luiz, Jaine Honorata Hortolan. II. Título.

CDD-547

Sandra Barbosa Neder Agostini

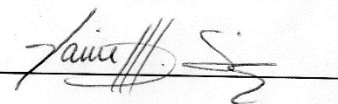
**“Prospecção de compostos bioativos no produto de
fermentação de fungos endofíticos isolados de
Handroanthus impetiginosus”**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 26/02/2016

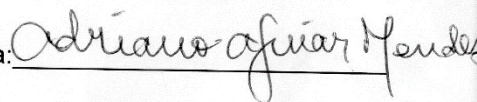
Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:



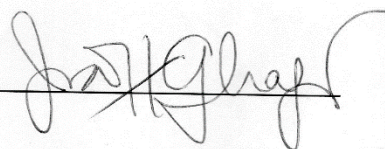
Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:



Prof. Dr. João Henrique Ghilard Lago
Instituição: UNIFESP

Assinatura:



A Deus, Amor Supremo e Absoluto, que tudo sabe, cria e governa,
a meu marido, Mauro Júnior, que com companheirismo,
compreensão e sensatez imensuráveis, abre meus olhos, me auxilia
incomparavelmente e me incentiva a aprender sempre,
a meus filhos, Sofia e Nicolás, que trouxeram um significado real
para minha existência e a tornaram muito mais feliz,
e a meus pais, Pedro e Helena, a quem devo a base de cada conquista,
dedico este tabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade concedida.

À Profa. Dra. Jaine H. H. Luiz, pela orientação, pelos ensinamentos, por ter me aceitado como aluna mesmo após estar afastada do meio acadêmico por tantos anos e por ter permitido que participasse de um projeto que me encantou desde o primeiro momento.

À doutoranda Patrícia Lunardelli Negreiros Carvalho, pelo valioso auxílio e orientação no isolamento dos fungos endofíticos e na condução dos ensaios de atividade antimicrobiana.

À farmacêutica Barbara Akemi, que com muita atenção e disponibilidade me introduziu às atividades práticas do Laboratório de Bioprocessos.

À Profa. Dra. Marisa Ionta, do Instituto de Ciências Biomédicas da Unifal, pela realização dos testes de avaliação de atividade sobre a viabilidade de células tumorais, e por todos os ensinamentos a eles referentes.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), em especial à Dra. Derlene Attili de Angelis, pela identificação dos fungos.

À Profa. Dra. Lúcia G. Lohmann, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela identificação da espécie vegetal.

À doutoranda Kris Simone Tranches Dias, ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira e a Luciana Vizotto pelas análises por ressonância magnética nuclear.

À Dra. Patrícia Penido Maia de Alvarenga, à Dra. Mariane Gonçalves Santos e ao Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco pelo auxílio para a secagem de amostras.

Aos professores Dr. Adriano Aguiar Mendes e Dra. Eliane de Oliveira Silva pelo criterioso trabalho de correção e pelas valiosas sugestões ao trabalho apresentado para exame de qualificação.

A todos os professores e aos colegas do Laboratório de Bioprocessos, pela oportunidade, pelo convívio e cordialidade, em especial à Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata, pela preciosa dica para reativação de um fungo.

Às professoras Dra. Marisi Gomes Soares, Dra. Danielle Ferreira Dias, Dra. Daniela Chagas de Paula e a todos os colegas do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM), pela acolhida, pelos ensinamentos, pelas sugestões, pelos exemplos, pelo convívio amistoso e em especial à Profa. Daniela, ao doutorando Welton Rosa e ao acadêmico Victor Hugo Catricala Fernandes, pelo auxílio na utilização do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.

Ao doutorando Gustavo Silveira e à auxiliar do laboratório de Bioprocessos, Daniela Aparecida de Paulo Pinto, pelo profissionalismo admirável, pelos inúmeros auxílios, pela solicitude constante e pela amizade.

À Profa. Dra. Magali Benjamim de Araújo, por ter propiciado minha iniciação científica, pela confiança, pelo respeito, pelo estímulo, pelos sábios conselhos, pelo profissionalismo, pela inspiração e pelo carinho.

À Profa. Dra. Lúcia Helena Ávila Terra pela solicitude, pelo incentivo, pelo apoio, pela atenção, pelas oportunidades e pela amizade.

A todos os professores que contribuíram para minha formação.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior , CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado.

RESUMO

Os fungos endofíticos têm sido cada vez mais pesquisados como fonte de moléculas bioativas. Neste trabalho, foram isolados fungos endofíticos de uma árvore produtora de compostos medicinais, *Handroanthus impetiginosus*, com o objetivo de verificar se produziam metabólitos com atividade biológica e de identificar as espécies fornecedoras de princípios bioativos. Todas as 148 cepas isoladas foram triadas segundo a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Escherichia coli* ATCC 25922 pelo método do ágar em bloco. Dentre essas, cinco fungos foram submetidos a fermentação em pequena escala, em caldo Czapek, durante 15 dias, a 28°C, tanto sob agitação quanto em modo estático. Ao final desse período, as culturas foram filtradas e submetidas a extração líquido-líquido. Os extratos obtidos foram avaliados quanto à capacidade de inibir o crescimento dos micro-organismos patogênicos citados anteriormente, por teste de difusão em ágar e determinação da concentração inibitória mínima (CIM). As menores faixas de CIM observadas foram 125-250 µg.mL⁻¹, de *Alternaria alternata*, e 250-500 µg.mL⁻¹, de *Lasiodiplodia* sp. Também avaliou-se o efeito sobre a viabilidade de linhagens celulares derivadas de câncer humano de mama (MCF-7), fígado (HepG2) e pulmão (A549). Os extratos de *A. alternata* e de *Lasiodiplodia* sp. reduziram a menos que 10% a viabilidade das células tumorais MCF-7 e HepG2. O primeiro também reduziu a menos que 5% a viabilidade de células A549. Por isso, tais fungos endofíticos foram submetidos a fermentação submersa em maior escala. O extrato de *Alternaria alternata* e algumas de suas frações reduziram expressivamente a viabilidade das três linhagens celulares testadas. Dentre tais frações, a F3 se destacou por apresentar menores valores de IC₅₀ para MCF-7 e HepG2 (10,28±5,22 e 9,75±1,31 µg.mL⁻¹, respectivamente) do que o fármaco cisplatina (21,12±1,56 e 27,15±1,73 µg.mL⁻¹, respectivamente). O fracionamento dos extratos por cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência permitiram o isolamento de dois compostos, provenientes de *A. alternata*, e de um produzido por *Lasiodiplodia* sp. Tais amostras foram analisadas por ressonância magnética nuclear, e foi identificado o composto 4-hidróxi-benzaldeído no extrato de *A. alternata*. Ficou comprovado que os extratos de fermentação de fungos endofíticos isolados de *H. impetiginosus* exerceram importante atividade biológica, reduzindo a viabilidade de células derivadas de câncer de mama, fígado e pulmão.

Palavras-chave: Fungo endofítico. *Tabebuia* sp. *Handroanthus impetiginosus*. Fermentação.

Alternaria alternata. *Lasiodiplodia* sp.

ABSTRACT

Endophytic fungi have been prospected as source of active metabolites. In this work, endophytic fungi had been isolated from a tree that produces medicinal compounds, *Handroanthus impetiginosus*, in order to check if they produce biological active metabolites and to identify the biologically active species. All the 148 strains isolated were screened by agar piece method to investigate their antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Escherichia coli* ATCC 25922 . Among them, five endophytic fungi were fermented on small scale. The fermentation was performed in a Czapek broth, for 15 days, 28°C, under either stirring or static conditions. After this period, the cultures were filtered and subjected to liquid-liquid extraction. The obtained extracts were tested against the microorganisms mentioned above and the cancer cells MCF-7, HepG2 and A549. The lowest minimum inhibitory concentrations (MIC) exhibited were 125-250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (from *Alternaria alternata*) and 250-500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (from *Lasiodiplodia* sp.) both against *S. aureus* . Two extracts appreciably reduced tumor cells viability and, therefore, these endophytic fungi were fermented on large scale. The extract from *A. alternata* significantly reduced the viability of all three cell lines tested to less than 10% and its chemical study was biomonitoring. One of its fractions, F3, exhibited lower IC_{50} against MCF-7 and HepG2 (10.28 \pm 5.22 and 9.75 \pm 1.31 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively) than cisplatin, a pharmaceutical compound commercially available (21.12 \pm 1.56 and 27.15 \pm 1.73 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively). The extract from *Lasiodiplodia* sp. diminished the viability of MCF-7 and HepG2 cells to less than 10%. The partitioning of the extracts by column chromatography and high performance liquid chromatography provided two isolated compounds from *A. alternata* and one from *Lasiodiplodia* sp. The samples were analyzed by nuclear magnetic resonance technique and the compound 4-hydroxybenzaldehyde was identified for *A. alternata* extract. The fermentation extracts of endophytic fungi from *H. impetiginosus* exhibited relevant biologic activity reducing the viability of cells derived from breast, liver and lung cancer.

Key words: Endophytic fungi. *Tabebuia* sp. *Handroanthus impetiginosus*. Fermentation. *Alternaria alternata*. *Lasiodiplodia* sp.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Representação esquemática do estresse oxidativo induzido por quinonas..... | 21 |
| Figura 2 - Alguns compostos isolados de <i>H. impetiginosus</i> e um derivado sintético (4) | 24 |
| Figura 3 - Fluxograma de fracionamento do extrato C13.3.a agitado..... | 30 |
| Figura 4 - Fluxograma de obtenção e fracionamento do extrato C18.1.a estático | 31 |
| Figura 5 - Sequência parcial do <i>operon</i> ribossomal proveniente da cepa C13.3.a..... | 41 |
| Figura 6 - Árvore filogenética demonstrando as relações filogenéticas entre a sequência parcial das regiões do <i>operon</i> ribossomal ITS1-5.8S-ITS2 da cepa C13.3.a e sequência de linhagens de micro-organismos presentes nas bases de dados CBS e GenBank | 41 |
| Figura 7 - Sequência parcial do <i>operon</i> ribossomal proveniente da cepa C18.1.a..... | 42 |
| Figura 8 - Árvore filogenética demonstrando as relações filogenéticas entre a sequência parcial das regiões do <i>operon</i> ribossomal ITS1-5.8S-ITS2 da cepa C18.1.a e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e GenBank..... | 42 |
| Figura 9 - Avaliação da atividade dos extratos fúngicos C7.3.a, <i>A. alternata</i> agitado (1 ^a fermentação), <i>Lasiodiplodia</i> sp. estático e <i>Lasiodiplodia</i> sp. estático H ⁺ , todos a 40 µg.mL ⁻¹ , sobre a viabilidade de células MCF-7, HepG2 e A549 | 48 |
| Figura 10 – Efeito exercido pelo extrato de <i>A. alternata</i> (2 ^a fermentação) e suas frações, F3, F5 e F7, todos a 40 µg.mL ⁻¹ , sobre a viabilidade de células MCF-7, HepG2 e A549 | 49 |
| Figura 11 – Cromatograma referente à purificação da subfração F3A do extrato de <i>A. alternata</i> por CLAE semi-preparativa..... | 51 |
| Figura 12 – Espectro de RMN de ¹ H (300MHz, CDCl ₃) do composto isolado da subfração F3A do extrato de <i>A. alternata</i> | 53 |

| | |
|---|----|
| Figura 13 – Espectro DEPT-135 (75MHz, CDCl ₃) do composto isolado da subfração F3A do extrato de <i>A. alternata</i> | 53 |
| Figura 14 – Espectro HSQC (300, 75MHz, CDCl ₃) do composto isolado da subfração F3A do extrato de <i>A. alternata</i> | 54 |
| Figura 15 – Cromatograma da subfração F5B do extrato de <i>A. alternata</i> analisada por CLAE..... | 54 |
| Figura 16 – Espectro de RMN de ¹ H (400MHz, MeOD) da subfração F5B do extrato de <i>A. alternata</i> | 55 |
| Figura 17 – Espectro de ¹³ C (100MHz, MeOD) da subfração F5B do extrato de <i>A. alternata</i> | 56 |
| Figura 18 – Espectro COSY (400, 400MHz, MeOD) da subfração F5B do extrato de <i>A. alternata</i> | 56 |
| Figura 19 – Espectro HSQC (400, 100MHz, MeOD) da subfração F5B do extrato de <i>A. alternata</i> | 57 |
| Figura 20 – Espectro HMBC (400, 100MHz, MeOD) da subfração F5B do extrato de <i>A. alternata</i> | 57 |
| Figura 21 – Espectro de RMN de ¹ H (300MHz, MeOD) do composto isolado da fração P7 do extrato de <i>Lasiodiplodia</i> sp. | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Condições de análise e amostras submetidas a cromatografia em coluna | 37 |
| Tabela 2 - Condições de análise e amostras submetidas a CLAE | 38 |
| Tabela 3 - Frequência de isolamento dos fungos endofíticos | 40 |
| Tabela 4 - Extratos secos obtidos pela fermentação em menor escala e respectivos rendimentos | 44 |
| Tabela 5 - Resultado do teste de atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos pelo método de difusão em ágar | 46 |
| Tabela 6 - Determinação da concentração inibitória mínima de extratos fúngicos frente a <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> | 47 |
| Tabela 7 - IC ₅₀ do extrato <i>A. alternata</i> agitado e de suas frações, F3 e F5, frente a linhagens de células tumorais | 50 |
| Tabela 8 - Deslocamentos químicos presentes na subfração F3A do extrato de <i>A. alternata</i> | 52 |
| Tabela 9 - Estrutura molecular do composto 4-hidróxi-benzaldeído e sua equivalência com os dados espectrais de RMN da subfração F5B do extrato de <i>A. alternata</i> | 58 |
| Tabela 10- Comparação entre os deslocamentos químicos da subfração F5B do extrato de <i>A. alternata</i> com os publicados por Lee et al.(2010)..... | 59 |

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| A549 - | linhagem celular de carcinoma de pulmão humano |
| ACN - | acetonitrila |
| AcOEt - | acetato de etila |
| AIDS - | <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> |
| AMP - | monofosfato de adenosina |
| ATCC - | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BHI - | <i>Brain Heart Infusion</i> |
| BOD - | <i>Biochemical Oxygen Demand</i> |
| CAT - | Catalase |
| CBS - | <i>Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre</i> |
| CCD - | Cromatografia em Camada Delgada |
| CIM - | Concentrao Inibitria Mínima |
| CLAE - | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| COSY - | <i>COrrrelation SpectroscopY</i> |
| DEPT - | <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> |
| DMSO - | dimetilsulfxido |
| DNA - | <i>DeoxyriboNucleic Acid</i> |
| FAD - | Flavina-Adenina Dinucleotídeo |
| G2/M - | intervalo entre a duplicao do DNA e o início da divisão celular |
| HaCat - | linhagem de queratinócitos humanos imortalizados |
| HEp-2 - | linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano |

HepG2 - linhagem de células de carcinoma de fígado

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

HMBC - *Heteronuclear MultipleBond Correlation*

HSQC - *Heteronuclear Simple Quantum Correlation*

IC₅₀ - concentração capaz de inibir 50% do crescimento

IL - interleucina

ITS - Internal Transcribed Spacer

L5178Y - linhagem celular de linfoma

MCF-7 - células de câncer de mama

MeOH - metanol

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólio)

NADPH - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NCI-H292 - linhagem celular de carcinoma de pulmão humano

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RNA - *RiboNucleic Acid*

SFB - soro fetal bovino

SOD - SuperÓxido Dismutase

T-CD4⁺ - linfócitos T auxiliares

THP-1 - linhagem celular de monócitos humanos

TNF- α - fator de necrose tumoral

TST - Teste de Suspensão da Cauda

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

UV - Ultravioleta

VERO - *VERda RenO*

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 2.1 | PESQUISAS FARMACOLÓGICAS COM EXTRATOS DE <i>Handroanthus</i> <i>impetiginosus</i> | 18 |
| 2.2 | COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Handroanthus impetiginosus</i> | 20 |
| 2.3 | FUNGOS ENDOFÍTICOS | 25 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 3.1 | AMOSTRA VEGETAL | 28 |
| 3.2 | SEQUÊNCIA DE EXPERIMENTOS | 28 |
| 3.3 | METODOLOGIA | 32 |
| 3.3.1 | Isolamento dos fungos endofíticos | 32 |
| 3.3.2 | Testes de atividade antimicrobiana | 33 |
| 3.3.2.1 | Preparo das placas de micro-organismos | 33 |
| 3.3.2.2 | Teste do ágar em bloco | 33 |
| 3.3.2.3 | Teste da difusão em ágar | 33 |
| 3.3.2.4 | Determinação da concentração inibitória mínima | 33 |
| 3.3.3 | Avaliação da atividade sobre a viabilidade de células tumorais | 34 |
| 3.3.4 | Obtenção dos extratos secos | 35 |
| 3.3.5 | Técnicas analíticas | 36 |
| 3.3.5.1 | Técnicas cromatográficas | 36 |
| 3.3.5.2 | Ressonância magnética nuclear | 38 |
| 3.3.6 | Identificação dos fungos endofíticos | 39 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 40 |
| 4.1 | ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS | 40 |
| 4.2 | IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS | 40 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 4.2.1 | Cepa C13.3.a | 40 |
| 4.2.2 | Cepa C18.1.a | 42 |
| 4.3 | TESTE DO ÁGAR EM BLOCO | 43 |
| 4.4 | OBTENÇÃO DOS EXTRATOS SECOS | 43 |
| 4.5 | ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS | 45 |
| 4.5.1 | Difusão em ágar | 45 |
| 4.5.2 | Determinação da CIM | 46 |
| 4.6 | ATIVIDADE SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS | 47 |
| 4.6.1 | Dos extratos fúngicos obtidos pela fermentação em menor escala | 47 |
| 4.6.2 | Do extrato agitado de <i>A. alternata</i> (2ª fermentação) e suas frações | 49 |
| 4.7 | ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS | 50 |
| 4.7.1 | De <i>Alternaria alternata</i> | 51 |
| 4.7.2 | De <i>Lasiodiplodia</i> sp. | 59 |
| 5 | CONCLUSÃO | 61 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 62 |

1 INTRODUÇÃO

Apesar de todo o progresso alcançado pela indústria farmacêutica, a descoberta de novos fármacos continua sendo imprescindível. O uso indiscriminado de antibióticos contribuiu para o surgimento de cepas multi-resistentes, para as quais não há terapia eficaz. A grande incidência de AIDS e a ocorrência de outras situações que implicam em debilidade imunológica, como o aumento no número de transplantes efetuados, propiciam a manifestação de novas infecções fúngicas. Algumas doenças parasitárias ainda permanecem carentes de alternativa terapêutica segura.

No intuito de tentar suprir tais necessidades, a pesquisa de produtos naturais persiste como recurso valioso, fornecendo diversas e promissoras moléculas bioativas. Dentre os compostos com potencial terapêutico oriundos da natureza, os metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos têm atraído muita atenção. Por serem representantes das mais diversas classes químicas, são capazes de desempenhar papéis biológicos distintos. É comprovado que os mencionados micro-organismos podem sintetizar tanto substâncias iguais às produzidas por sua planta hospedeira quanto estruturas inéditas. Diante destes fatos, a pesquisa de compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos justifica-se como alternativa promissora.

Handroanthus impetiginosus, árvore popularmente conhecida por ipê roxo, tem amplo histórico de uso medicinal empírico e há várias publicações científicas confirmando atividade biológica de seus extratos e de seus compostos isolados. Entretanto, muito pouco se sabe sobre os metabólitos de endófitos provenientes desta espécie de Bignoniaceae.

Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi pesquisar, de forma bioguiada, o potencial de produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico por fungos endofíticos isolados de *Handroanthus impetiginosus* e identificar tanto os compostos ativos produzidos quanto seus micro-organismos produtores. Para tal, o projeto foi delineado visando especificamente:

- a) isolar fungos endofíticos a partir de folhas e pecíolos de *Handroanthus impetiginosus*;
- b) selecionar potenciais cepas produtoras de compostos com atividade biológica;
- c) submeter os fungos selecionados a fermentação em meio líquido, com ou sem agitação, para a obtenção de extratos brutos;

- d) testar a bioatividade dos extratos obtidos;
- e) fracionar os extratos brutos com o objetivo de isolar, purificar e identificar os metabólitos por espectroscopia de RMN e espectrometria de massas;
- f) avaliar o desempenho de frações e de compostos isolados em testes de atividade biológica;
- g) identificar as cepas produtoras de compostos de interesse por recursos de biologia molecular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattos é a nomenclatura atualmente aceita para a árvore popularmente conhecida por ipê roxo. *Gelsemium avellanadae* (Lorentz ex Griseb.) Kuntze, *Handroanthus avellanadae* (Lorentz ex Griseb.) Mattos, *Tabebuia avellanadae* Lorentz ex Griseb., *Tabebuia dugandii* Standl., *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl., *Tabebuia ipe* var. *integra* (Sprague) Sandwith, *Tabebuia nicaraguenses* S. F. Blake, *Tabebuia palmeri* Rose; *Tabebuia schunkevigoi* D. R. Simpson, *Tecoma adenophylla* Bureau & K. Schum., *Tecoma avellanadae* (Lorentz ex Griseb.) Speg., *Tecoma avellanadae* var. *alba* Lillo, *Tecoma impetiginosa* Mart. ex DC., *Tecoma integra* (Sprague) Hassl., *Tecoma ipe* var. *integra* Sprague, *Tecoma ipe* var. *integrifolia* Hassl. e *Tecoma ipe* f. *leucotricha* Hassl. são todos sinônimos dessa mesma espécie pertencente à família Bignoniaceae (ROYAL BOTANIC GARDENS. KEW AND MISSOURI BOTANICAL GARDEN, 2016).

Em 1873, as propriedades terapêuticas do ipê roxo foram descritas como: redutor de febre, antiulceroso, empregado para doenças reumáticas e venéreas e especialmente útil para distúrbios da pele, como eczema e herpes (CASTELLANOS; PRIETO; HEINRICH, 2009). Os ipês são tradicionalmente usados na medicina popular, sob uma grande variedade de formas farmacêuticas, como infusões e tinturas, com finalidade analgésica, antitumoral e contra úlceras pépticas e diabetes (GRAZZIOTIN et al., 1992).

Em 1967, tal espécie vegetal foi destacada na imprensa por uma reportagem da revista *O Cruzeiro* relatando a cura do câncer em pacientes do Hospital das Clínicas de São Paulo e do Hospital Municipal de Santo André (DE MONTMORENCY, 1981 apud CASTELLANOS; PRIETO; HEINRICH, 2009). Desde então, pesquisadores do mundo todo voltaram suas atenções para o estudo do gênero *Handroanthus* na tentativa de isolar e identificar seus componentes bem como avaliar as atividades biológicas ou tóxicas tanto dos extratos quanto dos compostos isolados.

2.1 PESQUISAS FARMACOLÓGICAS COM EXTRATOS DE *Handroanthus impetiginosus*

Em teste de atividade antibacteriana, o extrato metanólico de *H. impetiginosus* exibiu atividade fraca a moderada contra *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*; atividade moderada contra *Escherichia coli* e forte atividade contra *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium perfringens* e *Helicobacter pylori* (PARK et al., 2005). Pesquisando a atividade antiparasitária de fitoterápicos, Teixeira et al. (2014)

constataram que o extrato hidroalcoólico de *H. impetiginosus* reduziu a 20% a viabilidade celular de formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, quando empregado na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹.

O extrato etanólico da casca de *H. impetiginosus*, quando administrado a ratos com úlcera gástrica crônica induzida, reduziu significativamente a mencionada lesão. A avaliação histopatológica evidenciou uma redução do tamanho da úlcera gástrica, o espessamento da camada de muco e o aumento da proliferação celular (PEREIRA et al., 2013). Em ratos portadores de obesidade induzida, a administração de extrato etanólico de *H. impetiginosus* reduziu o ganho de massa corporal, o acúmulo de gordura no fígado e a hipertrofia de adipócitos. Houve redução dos níveis séricos de triglicérides, insulina e leptina. Também foi detectada uma diminuição na expressão de RNA mensageiro e proteínas relacionadas à lipogênese (CHOI et al., 2014).

Pesquisando efeitos farmacológicos de espécies vegetais nativas do cerrado brasileiro, De Melo et al. (2010) encontraram que o extrato metanólico de *H. impetiginosus* exerceu atividade antiproliferativa contra linhagem celular de câncer de pulmão NCI-H292, com IC₅₀ de 41,8±0,47 µg.mL⁻¹ e contra HEP-2 (câncer de laringe), com IC₅₀ de 45,73±2,19 µg.mL⁻¹.

Foi conduzido um estudo para se investigar a possibilidade de ação antidepressiva do extrato de *H. impetiginosus*. Para isso, realizou-se bulbectomia olfatória em ratos, originando um modelo de depressão. Foi feita administração, via oral, do extrato etanólico da casca da planta, em doses de 10 e 30 mg/kg, durante 14 dias. Observou-se a redução do tempo de mobilidade no teste de suspensão da cauda (TST) sem alteração da atividade locomotora, um indicativo de efeito antidepressivo (FREITAS et al., 2013).

Nos estudos realizados por Böhler et al. (2008), o extrato aquoso de *H. impetiginosus* inibiu a proliferação e ativação de linfócitos T, sem alterar a produção de citocinas pró-inflamatórias, interleucina-2 (IL-2) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α). A mesma atividade não foi observada com o emprego do extrato etanólico da mesma espécie pesquisada. Posteriormente, outros pesquisadores observaram que compostos isolados do extrato aquoso de *H. impetiginosus* inibiram significativamente a produção de TNF-α e IL-1β, em cultura de monócitos THP-1 ativados com lipopolissacarídeos (SUO et al., 2012).

Verificou-se que a aplicação de uma pomada contendo 10% (v/m) de extrato aquoso da casca de *H. impetiginosus* em feridas cutâneas de ratos aumentou significativamente a produção

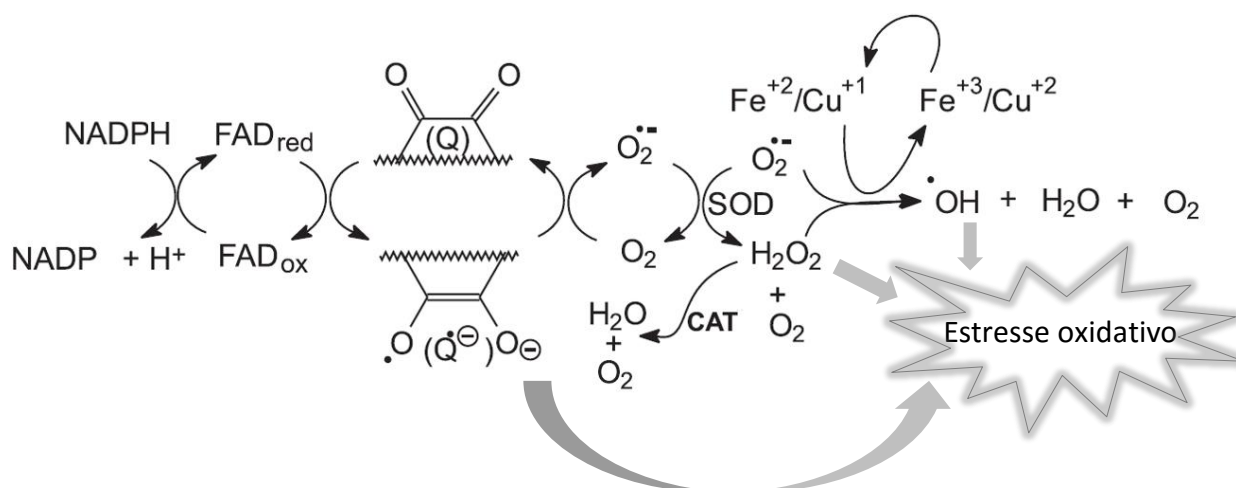
de fibroblastos e colágeno em relação ao grupo controle, favorecendo, portanto a regeneração cutânea (COELHO et al., 2010).

2.2 COMPOSTOS ISOLADOS DE *Handroanthus impetiginosus*

Várias classes químicas foram encontradas no extrato metanólico da casca de *H. impetiginosus*, tais como, flavonoides, derivados de ácido benzoico e de benzaldeído, naftoquinonas e antraquinonas, sendo as duas últimas classes as mais relevantes (CASTELLANOS; PRIETO; HEINRICH, 2009). O estudo das naftoquinonas isoladas de *Handroanthus* sp. foi iniciado pelo grupo do Prof. Dr. Benjamin Gilbert, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, na década de 70, quando foi demonstrada sua atividade contra *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi* (DE MOURA et al., 2001).

O principal mecanismo de ação citotóxica das quinonas é a indução do estresse oxidativo pela formação intracelular de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxila ($HO\cdot$) (FIGURA 1). Sob ação das enzimas flavinas NADPH citocromo B5 redutase ou NADPH ubiquinona oxidorreductase, um substrato quinoídico é reduzido com um elétron para formar o ânion semiquinona ($Q^{\cdot-}$). O potencial de redução da quinona influencia a cinética de tal redução. A espécie semiquinona reduz o oxigênio molecular ao ânion-radical superóxido, por catálise com metais de transição ou por reação com peróxido de hidrogênio, que gera o radical hidroxila. Tal espécie radicalar pode danificar o genoma, por alterar o sinal da transcrição de genes, e/ou ativar fatores responsáveis pela indução de apoptose. Embora o peróxido de hidrogênio não seja um radical livre, é bastante reativo e, assim como o ânion-radical superóxido, pode oxidar algumas biomoléculas, como os lipídeos constituintes da membrana celular. Normalmente, as células dispõem de mecanismos antioxidantes, mas, havendo um desequilíbrio entre geração e eliminação de radicais livres, ocorre o dano celular. O mecanismo de ação por indução da formação de espécies radicalares é importante porque alguns micro-organismos patogênicos são mais sensíveis ao estresse oxidativo do que seus hospedeiros (DA SILVA et al., 2003).

Figura 1 – Representação esquemática do estresse oxidativo induzido por quinonas



Legenda: CAT = enzima catalase; SOD = enzima superóxido dismutase; FAD = enzima flavina; NAPH = coenzima fosfato dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

Fonte: adaptado de DA SILVA et al., 2003

O lapachol **(1)** (FIGURA 2) ou 4-hidróxi-3-(3-metilbut-2-enil)naftaleno-1,2-diona, C₁₅H₁₄O₃, presente em *H. impetiginosus*, é o composto quinônico mais abundante na família Bignoniaceae. Foi também encontrado nas famílias Leguminosae, Sapotaceae, Scrophulariaceae, Verbenaceae, Malvaceae e Proteaceae (CARDOSO et al., 2013). A esse composto foram atribuídas propriedades antitumoral, anti-inflamatória e antiulcerogênica (GRAZZIOTIN et al., 1992). Há outras atividades também descritas, como a tripanocida, antimalárica, antituberculose, leishmanicida e contra *Biomphalaria glabrata* (envolvido na transmissão de esquistossomose). Atovaquona e buparvaquona são análogos do lapachol utilizados no tratamento de pneumonia pneumocística, toxoplasmose e malária (CARDOSO, et al., 2013).

A β-lapachona **(2)** ou 2,2-dimetil-3,4-dihidro-2H-benzo[h]cromeno-5,6-diona, C₁₅H₁₄O₃, assim como α-lapachona **(3)** ou 2,2-dimetil-3,4-dihidrobenc[g]cromeno-5,10-diona, é um isômero do lapachol, obtido primeiramente por tratamento ácido do mesmo, mas, posteriormente também isolado de *Handroanthus* sp. (CASTELLANOS; PRIETO; HEINRICH, 2009). Atividades antibacteriana, antifúngica, antirretroviral e anti-inflamatória também foram reportadas para β-lapachona (CARDOSO et al., 2013).

A β-lapachona mostrou-se ativa contra várias linhagens de células tumorais, incluindo mama, leucemia e próstata. Seu mecanismo de ação não está elucidado, mas, além da indução de estresse oxidativo, seu efeito tem sido associado à inibição de topoisomerase I e II, enzimas

envolvidas nos processos de replicação, transcrição e mitose (DE MOURA et al., 2001; CARDOSO et al., 2013). Contudo, a hipótese de inibição da topoisomerase I é questionável porque a dose de β -lapachona necessária para induzir a apoptose é menor que a requerida para tal inibição enzimática. A capacidade desse composto de induzir apoptose sem interagir com ácido desoxirribonucleico (DNA) reforça seu potencial quimioterápico por demonstrar seletividade e preservação de células sadias (CASTELLANOS; PRIETO; HEINRICH, 2009). A nor- β -lapachona (**4**), ou 2,2-dimetil-3H-benzo[g][1]benzofurano-4,5-diona, (derivado sintético) apresentou baixa toxicidade contra células normais, demonstrando certa seletividade para células tumorais. Sua citotoxicidade está relacionada a uma diminuição do nível intracelular da enzima glutationa S-transferase, o que favorece a oxidação celular (CARDOSO et al., 2013). Associada ao paclitaxel, a β -lapachona é altamente efetiva contra câncer de próstata e ovário (BRANDÃO et al., 2010). Tal naftoquinona também exerce efeito sinérgico à radioterapia. À concentração de 4 μ M, a β -lapachona aumenta em 92% a eficiência da radiação sobre células-rádio-resistentes de melanoma humano (UI-Mel) (DA SILVA et al., 2003).

β -lapachona inibiu seletivamente a expressão de IL-12 e IL-23 por células dendríticas e microglia e, em virtude desse último efeito, reduziu a produção de células T-CD4⁺. A ocorrência desses eventos foi a causa atribuída à supressão de encefalomielite autoimune experimental constatada por ação da lapachona. Esse estudo sugere que essa naftoquinona possa ser efetiva para tratar doenças inflamatórias, como a esclerose múltipla (XU et al., 2013). Recentemente, constatou-se que β -lapachona reduziu a melanogênese em cultura de tecido epidérmico humano, diminuiu a atividade da tirosinase e o conteúdo de melanina e inibiu fortemente a pigmentação corporal de *Danio rerio*. Esses resultados sugerem que o composto possa ser avaliado para o tratamento de discromias (KIM et al., 2015). Entre várias naftoquinonas isoladas de *Handroanthus* sp., a β -lapachona foi a mais ativa contra *Trypanossoma cruzi*, essa quinona induz a produção de H₂O₂ e a inibição da produção de ácidos nucleicos e proteínas na forma epimastigota do parasita. Com base nas naftoquinonas de ocorrência natural foram sintetizados novos compostos com maior atividade contra *Trypanossoma cruzi* (DE MOURA, 2001). Além disso, β -lapachona e a 2-acetil-8-hidróxi-benzo[f][1]benzofurano-4,9-diona (**5**) apresentaram atividade comparável à do fármaco antralina contra a proliferação da linhagem celular de queratinócito humano HaCat, sugerindo uma possibilidade de emprego para controle de psoríase. Também se mostraram ativos, nessa mesma avaliação, lapachol, dehidro- α -lapachona ou 2,2-dimetilbenzo[g]cromeno-5,10-diona (**6**) e α -lapachona (MÜLLER et al., 1999).

O lapachol e a β -lapachona podem ser metabolizados em nosso organismo por redutases, como outras naftoquinonas exógenas, entre as quais a mais importante para a fisiologia humana é a vitamina K. O principal efeito tóxico de *H. impetiginosus* tem sido associado com interferência no ciclo biológico da vitamina K, que resulta em alteração da coagulação sanguínea ou inibição das propriedades de tal vitamina. Contraditoriamente, há relatos de que o chá da mencionada espécie vegetal não apresenta efeito tóxico ao ciclo fisiológico da vitamina K, embora tal toxicidade seja observada com lapachol. O lapachol, que chegou a ser comercializado no Brasil pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEP) como adjuvante no tratamento do câncer, teve seus testes clínicos encerrados em 1970 devido à constatação de que níveis sanguíneos satisfatórios não eram obtidos após administração oral (DE MOURA et al., 2001; CASTELLANOS; PRIETO; HEINRICH, 2009; GROTHAUS et al., 2010). Além disso, observou-se que a administração de lapachol agravou o quadro clínico de pacientes com câncer devido à ocorrência de anemia, aumento do tempo de coagulação e problemas gastrintestinais (DA SILVA et al., 2003).

5-hidróxi-2-[(1S)-hidróxi-etil]-nafto[2,3]furano-4,9-diona (**7**) é um metabólito secundário presente na casca interna de *H. impetiginosus* que exibiu potente efeito antiproliferativo contra linhagens de células tumorais (próstata, mama e pulmão) e pouco efeito sobre células humanas normais (menos que a mitomicina). Foi muito mais ativo que seu isômero 8-hidróxi-2-[(1S)-hidróxi-etil]-nafto[2,3]furano-4,9-diona (**8**), indicando que a posição da hidroxila no C5 do anel aromático é crucial para a atividade antiproliferativa (YAMASHITA et al., 2009). Observou-se que o composto **7** e **9** (FIGURA 2) interromperam o ciclo celular e promoveram apoptose na fase G2/M de células A549, o que foi atribuído a um aumento acentuado nos níveis de ciclina A e ciclina B (ZHANG et al., 2015).

Outras substâncias isoladas de *H. impetiginosus* exibiram atividade anti-inflamatória. Os compostos **10**, **11** e **12** reduziram significativamente a produção das citocinas interleucina IL-1 β e fator α de necrose tumoral (TNF- α), *in vitro*, por monócitos (células THP-1) nos quais a secreção dos mediadores da inflamação havia sido estimulada por lipopolissacarídeos (SUO et al., 2012). Em outro estudo, no qual foi avaliada a capacidade de suprimir a produção de óxido nítrico por células semelhantes a macrófagos (linhagem J774.1), também estimuladas por lipopolissacarídeos, os compostos **13**, **14**, **15**, **16** e **17** exibiram IC₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de 17,4, 22,0, 15,1, 13,8, e 26,1, respectivamente. Todos apresentaram desempenho superior ao do controle positivo utilizado, N^G-monometil-L-arginina, para o qual determinou-se IC₅₀ igual a 27, 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (AWALE et al., 2005).

Figura 2 – Alguns compostos isolados de *H. impetiginosus* e um derivado sintético (4)

(continua)

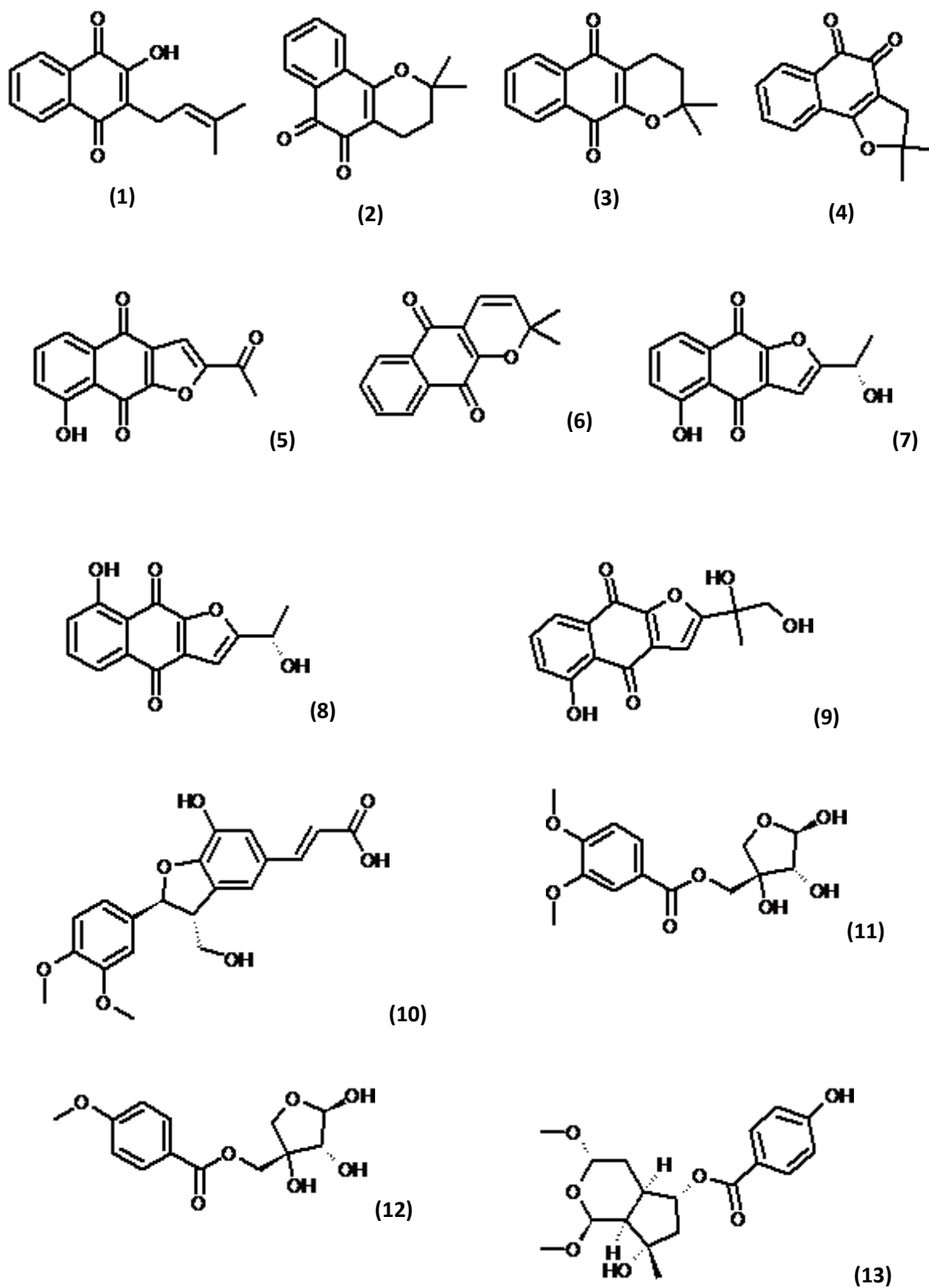
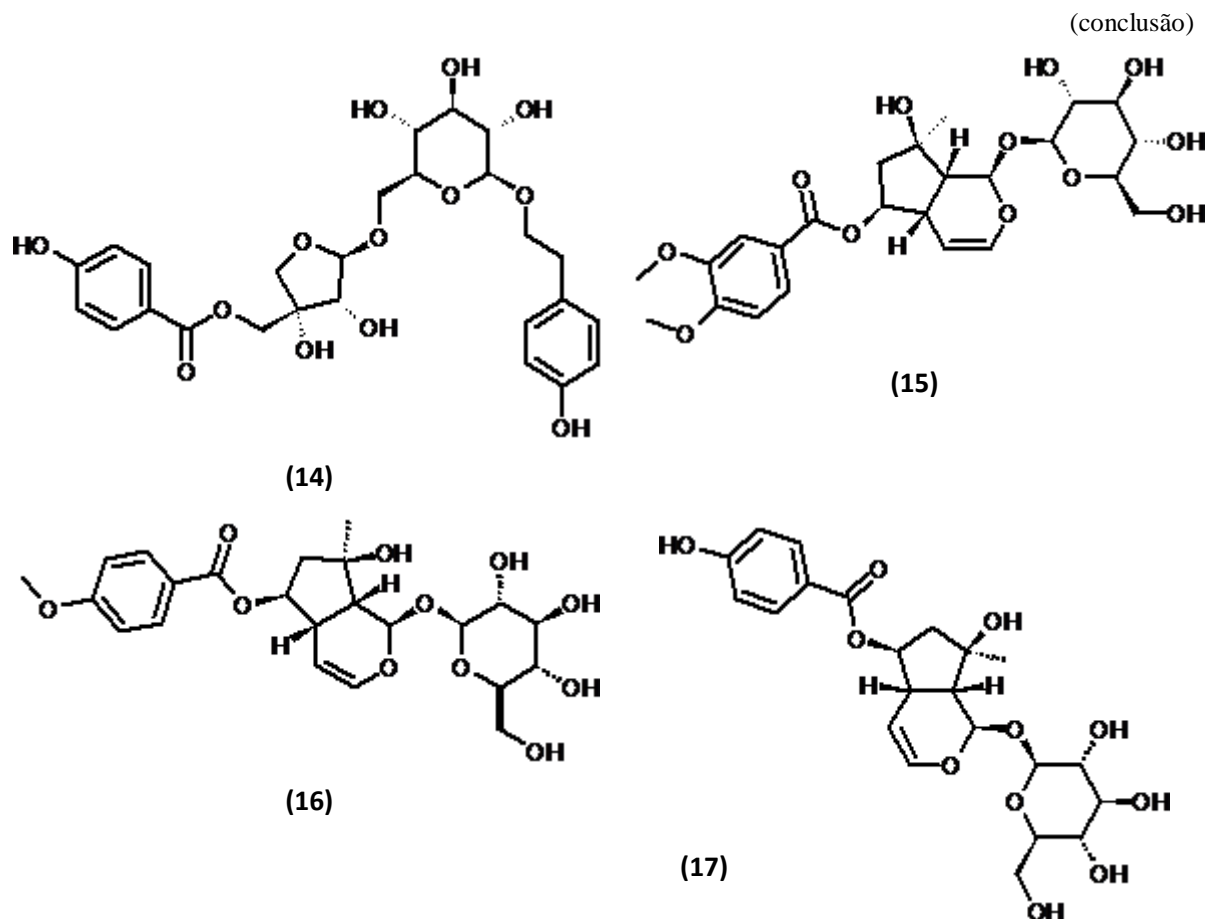


Figura 2 – Alguns compostos isolados de *H. impetiginosus* e um derivado sintético (4)

Fonte: 1 e 2: CASTELLANOS; PRIETO; HEINRICH, 2009. 3, 5 e 6: MÜLLER et al., 1999. 4: CARDOSO et al., 2013. 7 e 8: YAMASHITA et al., 2009. 9: ZHANG et al., 2015. 10, 11 e 12: SUO et al., 2012. 13, 14, 15, 16 e 17: AWALE et al., 2005.

2.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Por definição, micro-organismos endofíticos são fungos ou bactérias que colonizam os tecidos internos de espécies vegetais, sem causar efeitos negativos imediatos. Tais tecidos podem ser de raízes, caule, folhas, frutos e sementes. A maioria dos fungos endofíticos são transmitidos horizontalmente a seus hospedeiros, por esporos aéreos. O processo de transmissão também pode ser vertical, quando são disseminados por sementes. Uma vez instalados no interior da planta, os fungos endofíticos tendem a permanecer em estado de latência até quase toda a vida útil da planta, ou pelo menos, por um longo período até que algum fator desfavoreça a condição de simbiose (ALY et al., 2011).

O fungo endofítico estabelece relações com seu hospedeiro que são dependentes de vários fatores. Por exemplo, do modo de transmissão: os fungos recebidos pela semente tendem a estabelecer relação mutualística, enquanto fungos provenientes de transmissão horizontal

tendem a se comportar como antagonistas. A quantidade e a diversidade da comunidade endofítica de determinada planta influenciam a relação endófito-hospedeiro. A idade da planta também é relevante para tal relação. Quando a espécie vegetal atinge a senescência, o micro-organismo endofítico pode se tornar patogênico. O estilo de vida parasitário ou mutualístico do endófito também depende do genótipo do hospedeiro e das condições climáticas (ALY et al., 2011).

Ao exercer uma relação mutualística, o fungo endofítico funciona como um gatilho biológico que estimula o sistema de defesa da planta, tornando-a mais resistente a espécies patogênicas. O vegetal adquire também maior tolerância a fatores de estresse abiótico, pois passa a produzir mais compostos antioxidantes que o defendem de radicais livres produzidos pelo fungo. Além disso, o próprio micro-organismo também produz substâncias antioxidantes e quelantes. A presença do endófito também estimula a produção de hormônios de crescimento, que favorecem o desenvolvimento e a germinação da espécie hospedeira. Em troca, a planta oferece proteção física, facilita a disseminação da espécie fúngica e fornece nutrientes fundamentais ao fungo (WEYENS et al., 2009; WHITE; TORRES, 2010).

Embora o mecanismo ainda não esteja bem compreendido, afirma-se que exista transferência de material genético entre o fungo endofítico e seu hospedeiro. Foi observado que endófitos em um dado hospedeiro possuem em muitos casos uma uniformidade filogenética. Tal semelhança genética sugere uma co-evolução (HERRE et al., 1999). Outros sinais de co-evolução são a falta de reação de defesa da planta contra a presença de micro-organismos endofíticos (CHRISTENSEN et al., 2002), bem como a capacidade de alguns fungos de produzir os mesmos metabólitos ativos que seus hospedeiros (STIERLE et al., 1993). Acredita-se que os endófitos se adaptam ao microambiente incorporando parte do DNA do hospedeiro em seu próprio genoma (GERMAINE et al., 2004).

O interesse científico pelos endófitos tomou grande impulso a partir de 1993, quando Stierle e colaboradores publicaram que o taxol, importante fármaco antitumoral, também era produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado de *Taxus brevifolia*. O isolamento do taxol a partir dessa espécie é inviável comercialmente devido ao rendimento muito baixo, além disso, o tempo de desenvolvimento dessa espécie vegetal é muito longo. Posteriormente, outros compostos com atividade antitumoral, dentre eles, alcaloides da vinca, camptotecina e podofilotoxina também foram obtidos por fermentação de fungos endofíticos (GREVE et al., 2010; GROTHAUS et al., 2010). Constatou-se também que um determinado

princípio ativo pode ser obtido por micro-organismos distintos, isolados de plantas diversas (STROBEL, 2003).

Além de serem capazes de sintetizar compostos idênticos aos encontrados em suas plantas hospedeiras, os fungos endofíticos também são fontes de moléculas inéditas, como os exemplos a seguir. Um entre quatro metabólitos de *Pestalotiopsis theae* inibiu a replicação do vírus HIV *in vitro*, com IC₅₀ de 16,1 µmol.L⁻¹, sendo que o controle positivo sulfato de indinavir apresentou IC₅₀ de 8,18 µmol.L⁻¹ (LI et al., 2008). Os compostos alternariol 5-*O*-metil éter-4'-*O*-sulfato e desmetilaltensina, produzidos por *Alternaria* sp., foram citotóxicos para células de linfoma L5178Y, com desempenho ligeiramente melhor que o controle positivo, kahalalida (ALY et al., 2008). Guignasulfida, isolada do meio de fermentação de *Guignardia* sp., apresentou IC₅₀ 5,2±0,4 µmol.L⁻¹ contra células HepG2, quando o controle positivo 5-fluorouracil exibiu IC₅₀ 19,2±0,1 µmol.L⁻¹ (WANG et al., 2010). Os metabólitos de *Edenia* sp., palmarumicina CP17 e palmarumicina CP18 testados contra formas amastigotas de *Leishmania donovani* apresentaram IC₅₀ 1,34 e 0,62 µmol.L⁻¹, respectivamente. As mesmas moléculas frente a células normais VERO apresentaram IC₅₀ de 174 e 152 µmol.L⁻¹, sugerindo uma janela terapêutica interessante (MARTINEZ-LUIS et al., 2008). A partir da cultura de *Aspergillus terreus*, foi isolado o composto 16α-hidróxi-5*N*-acetilardeemina, o qual possui atividade anticolinesterásica (GE et al., 2010).

Não há contestação para o fato de que fungos endofíticos representem uma fonte importante de moléculas bioativas, a qual deve continuar sendo explorada cientificamente. Por outro lado, a obtenção de tais compostos por fermentação, em escala comercial, ainda não é uma realidade. Há desafios a serem superados, como o baixo rendimento, a diminuição da capacidade produtiva do micro-organismo quando mantido em laboratório e a possível inibição de seu crescimento em presença de altas concentrações de metabólitos (ALY et al., 2011). Visando contornar tais dificuldades, a otimização das condições de cultivo mostra-se imprescindível (GARYALI et al., 2014). Uma outra estratégia que tem sido estudada é a realização de culturas mistas, onde a interação entre espécies diferentes altera o perfil metabólico (CHAGAS et al., 2013). A melhor compreensão dos eventos desencadeados pela relação entre endófito e hospedeiro e o aprimoramento das técnicas de biotecnologia certamente irão contribuir para se melhorar a obtenção de metabólitos fúngicos (ALY et al., 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste texto, após a descrição do material vegetal do qual foram isolados os fungos endofíticos, será apresentada a sequência cronológica de realização dos experimentos, antes da explicação da metodologia em si.

3.1 AMOSTRA VEGETAL

Foram coletadas folhas maduras de *Handroanthus impetiginosus* (Mart ex DC.) Mattos, depois de iniciada a floração, no final de maio. A identificação da planta foi efetuada pela Profa. Dra. Lúcia G. Lohmann, do Departamento de Botânica, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Coletou-se material de um exemplar localizado na área urbana (S21°25'16.95'', W45°57'05.15'') e um, na zona rural (S21°18'49.15'', W45°57'28.53''), ambos no município de Alfenas–MG. Foram depositadas exsicatas de cada uma das árvores, no herbário da Universidade Federal de Alfenas, sob os números de registro 2536 e 2650 respectivamente. Procurou-se selecionar folhas aparentemente saudáveis e sem estarem danificadas por insetos.

3.2 SEQUÊNCIA DE EXPERIMENTOS

Isolaram-se os fungos endofíticos. Cada colônia foi identificada por um código, cuja composição indica a árvore de origem, a placa inicial onde o fragmento foi inoculado, o número do fragmento na placa e a ordem de repique a partir do referido fragmento. Por exemplo, o fungo C13.3.a, foi o primeiro a ser repicado a partir do fragmento nº 3, da placa nº 13, a qual recebeu fragmentos oriundos da árvore da zona rural (Fazenda Capetinga), analogamente, o fungo A26.1.a foi o primeiro a ser repicado a partir do fragmento nº 1, da placa nº 26, na qual foram inoculados fragmentos provenientes da árvore urbana (praça da APAE).

Como triagem, todos os fungos isolados foram submetidos ao teste do ágar em bloco. O fungo que mostrou atividade antimicrobiana nesse teste (C13.3.a), e mais quatro, selecionados pela intensidade de coloração e quantidade de pigmento produzido (C1.2.b, C7.3.a, C18.1.a e A26.1.a), foram fermentados em pequena escala.

Os extratos dos caldos de fermentação foram novamente submetidos a teste de atividade antimicrobiana, através do método de difusão em ágar e tiveram sua concentração inibitória mínima determinada, quando possível. Os extratos com massa suficiente, C7.3.a, C13.3.a agitado (agitado significa que a fermentação foi conduzida sob agitação), C18.1.a estático

(estático indica que foi fermentado estaticamente) e C18.1.a estático H⁺ (H⁺ significa que o caldo de fermentação foi acidificado antes de se proceder a extração líquido-líquido), foram encaminhados para avaliação de atividade sobre a viabilidade de células tumorais.

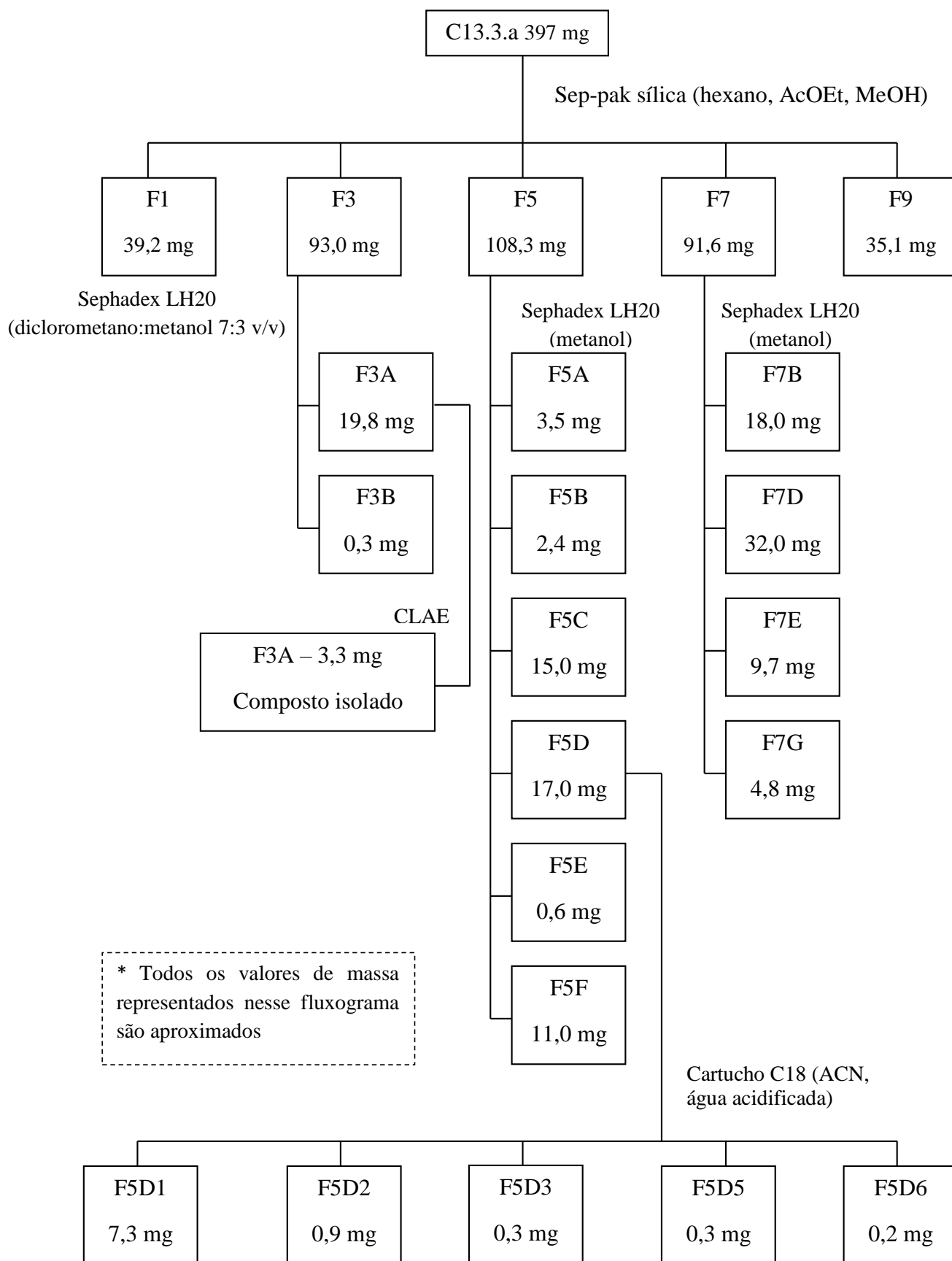
Com base nos resultados de atividade biológica, o fungo C13.3.a foi fermentado em maior escala, sob agitação. O extrato dessa fermentação foi fracionado, em cartucho de sílica, originando as frações F1, F3, F5, F7 e F9, agrupadas de acordo com o perfil apresentado por cromatografia em camada delgada (CCD). As frações F3, F5 e F7, assim como o extrato bruto proveniente da segunda fermentação foram encaminhadas para avaliação de atividade sobre a viabilidade de células tumorais. Foram calculados os valores de IC₅₀ para tais amostras, exceto para F7.

As frações F3, F5 e F7 foram separadas em coluna de Sephadex LH 20, originando as subfrações F3A, F3B, F5A, F5B, F5C, F5D, F5E, F5F, F7B, F7D, F7E e F7G. A subfração F5B foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por ressonância magnética nuclear (RMN). A subfração F5D foi fracionada em cartucho C18, originando F5D1, F5D2, F5D3, F5D5 e F5D6. A subfração F3A foi purificada por CLAE semi-preparativa e analisada por RMN. A Figura 3 descreve o fluxograma de fracionamento do extrato C13.3.a agitado.

Também com base nos resultados de atividade biológica, o fungo C18.1.a foi fermentado em maior escala, estaticamente. O caldo de fermentação foi extraído, primeiro com hexano, o que resultou na fração hexânica, e, posteriormente, com acetato de etila. O extrato proveniente da extração com acetato de etila, foi fracionado por coluna de Sephadex LH 20. Das frações coletadas, as que continham massa suficiente foram analisadas por CLAE e agrupadas em P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10. Parte da fração P7 foi purificada por CLAE semi-preparativa e o composto isolado foi analisado por RMN. A Figura 4 descreve o fluxograma de fracionamento do extrato C18.1.a estático.

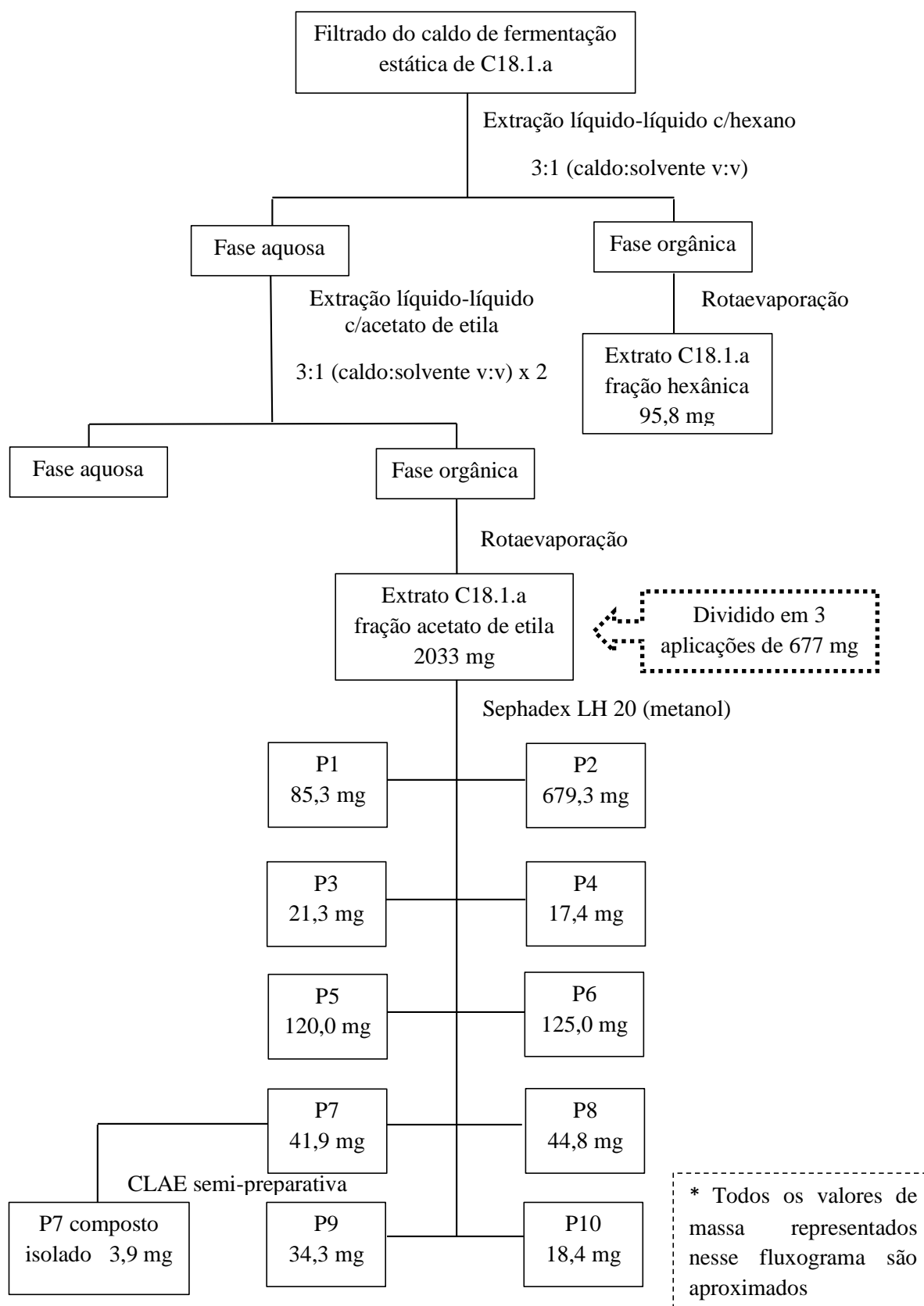
Os fungos C13.3.a e C18.1.a foram encaminhados para identificação por biologia molecular.

Figura 3 – Fluxograma de fracionamento do extrato C13.3.a agitado*



Fonte: DO AUTOR, 2015.

Figura 4 – Fluxograma de obtenção e fracionamento do extrato C18.1.a estático*



Fonte: DO AUTOR, 2015.

3.3 METODOLOGIA

As próximas subseções apresentarão a descrição metodológica, independente da ordem cronológica de realização dos respectivos ensaios.

3.3.1 Isolamento dos fungos endofíticos

Todo o procedimento de desinfecção da amostra e inoculação inicial foi adaptado a partir das preconizações feitas por Araújo et al. (2010).

As folhas e os pecíolos foram bem lavados em água corrente e postos para secar à sombra e temperatura ambiente.

Em ambiente estéril, sob fluxo laminar, procedeu-se a desinfecção do material, com a finalidade de eliminar os micro-organismos epifíticos. As folhas e pecíolos foram mergulhados em solução de etanol a 70% (v/v), durante 1 minuto. Em seguida, foram mergulhadas em solução comercial de hipoclorito de sódio, durante 6 minutos. Na sequência, foram mergulhados em um segundo recipiente contendo solução de etanol a 70% (v/v), por mais 1 minuto. Foram, em seguida, agitados brevemente em 2 recipientes contendo água destilada estéril, para a remoção das soluções de desinfecção. Uma alíquota de 100 μL da última água de lavagem foi inoculada em ágar batata dextrose acrescido de cloranfenicol 0,1 g.L^{-1} (para inibir o crescimento de bactérias endofíticas) e incubada em estufa BOD a 28°C, para servir como controle da eficácia da desinfecção.

Depois do material livre do excesso de água, com auxílio de bisturi estéril, as folhas foram cortadas de forma a serem obtidos fragmentos de 0,5x0,5 cm aproximadamente. Os pecíolos foram cortados transversalmente, resultando em fragmentos circulares de 2-3 mm de espessura. Foram obtidos 140 fragmentos, os quais foram então transferidos para placas de Petri contendo ágar batata dextrose acrescido de cloranfenicol 0,1 g.L^{-1} , onde previamente foi feita a identificação dos pontos que receberiam os fragmentos. As placas foram incubadas em estufa BOD a 28°C.

No 5º dia de incubação, foi feito o primeiro repique das colônias crescidas a partir dos fragmentos. Cada colônia foi repicada para um tubo inclinado contendo ágar batata dextrose e os tubos foram incubados a 28°C. Diariamente os tubos foram observados para verificar se apenas uma colônia havia crescido. Nos tubos em que houve o crescimento de mais de uma colônia, a colônia mais próxima ao local de inóculo foi novamente repicada para tubo inclinado

contendo o mesmo meio, e assim, sucessivamente, até a obtenção de colônias isoladas e purificadas.

3.3.2 Testes de atividade antimicrobiana

Conforme mencionado anteriormente, o teste do ágar em bloco foi o único ensaio antimicrobiano aplicado a todas as colônias purificadas. Os demais foram efetuados com os extratos dos fungos submetidos a fermentação.

3.3.2.1 Preparo das placas de micro-organismos

Utilizaram-se cepas padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (ATCC 10231) disponíveis no banco de cepas do Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG. Cada micro-organismo foi cultivado em caldo BHI, a 35°C, durante 24 h. Tal cultura foi então diluída em solução salina (NaCl 0,85% m/v) estéril ajustando-se a turbidez na escala 0,5 de McFarland (equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Cada suspensão de micro-organismo foi então, uniformemente espalhada, por toda a superfície de placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton.

3.3.2.2 Teste do ágar em bloco

Cada fungo foi inoculado em uma placa de Petri contendo ágar batata dextrose e incubado a 28°C por 15 dias. Foram obtidos fragmentos circulares do ágar contendo a colônia fúngica, os quais foram transferidos para as placas inoculadas com os micro-organismos patogênicos. Tais placas foram, então, colocadas no refrigerador por 20 minutos e, em seguida, incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas (ICHIKAWA et al., 1971).

3.3.2.3 Teste da difusão em ágar

Nas placas de micro-organismos, foram feitas cavidades circulares, as quais foram preenchidas com o extrato fúngico dissolvido em etanol (25 mg.mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37°C, por 24 h (VENTURA et al., 2012). Foram testados como controle negativo, etanol e etanol+dimetilsulfóxido (DMSO), o qual foi empregado como co-solvente quando necessário.

3.3.2.4 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita segundo a metodologia da microdiluição em caldo, preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standard*

Institute (2003), com modificações. Cada extrato foi testado em triplicata e as diluições foram testadas de 1000 até $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As suspensões de cada micro-organismo em solução salina com turbidez correspondente a escala 0,5 McFarland foram diluídas a 1% v/v em meio de cultura apropriado (caldo Muller-Hinton, para *S. aureus* e *E.coli*, e caldo Muller-Hinton + extrato de levedura a 2% m/v, para *C. albicans*).

Todas as cavidades de uma placa de 96 poços foram preenchidas com 50 μL de meio de cultura apropriado. Para cada amostra testada, 50 μL de extrato a 4 mg.mL^{-1} em meio de cultura foram colocados no primeiro poço. Após homogeneização, 50 μL foram removidos e transferidos para o próximo poço e, assim, sucessivamente. Do último poço, 50 μL foram removidos e descartados. Em seguida, cada poço recebeu 50 μL do inóculo de micro-organismo.

As placas de teste foram incubadas a 35°C durante 20 h para *E. coli* e *C. albicans* e, durante 24 h, para *S. aureus*. Os resultados foram evidenciados pelo acréscimo de 50 μL de uma solução aquosa de resazurina 0,01% m/v, em cada poço da placa teste, 2 horas antes da leitura.

Foi feito controle da viabilidade dos micro-organismos, da toxicidade do solvente do extrato, da esterilidade do meio de cultura e da esterilidade do extrato. Amoxicilina e nistatina foram utilizadas como controles positivos.

3.3.3 Avaliação da atividade sobre a viabilidade de células tumorais

Os testes de avaliação da atividade sobre a viabilidade de células tumorais foram executados pela Profa. Dra. Marisa Ionta e seus alunos, do Instituto de Ciências Biomédicas da Unifal-MG.

Linhagens celulares derivadas de tumores humanos (adenocarcinoma mamário, MCF-7; carcinoma hepatocelular, HepG2; carcinoma de pulmão, A549) foram utilizadas para avaliar a atividade antiproliferativa. As células foram mantidas em Meio Mínimo de *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM, Sigma, MO) suplementado com 10% m/v de Soro Fetal Bovino (SFB, Athena, SP, Brasil) em estufa com atmosfera controlada (95% (v/v) de ar e 5% (v/v) de CO_2) e temperatura de 37°C .

As células foram semeadas em placas de 96 poços, cujo inóculo inicial foi ajustado para cada linhagem celular. Após 24 h, as células foram tratadas por 48 h com as amostras em

diferentes concentrações (6,25 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o Kit “*Cell Titer 96TM*” da Promega®. Esse ensaio detecta a quantidade de formazan produzido a partir do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólio, MTS) pelas desidrogenases de células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983; BARLTROP et al., 1991). O formazan produzido é solúvel em meio de cultura e foi detectado em Leitor de Elisa a 490 nm. Os valores de absorbância são diretamente proporcionais ao número de células vivas nas amostras e, portanto, a viabilidade foi determinada comparando-se os valores de absorbância entre culturas tratadas e não tratadas.

Os valores de IC_{50} foram calculados através de regressão não linear usando GraphPad Prism® software (GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA).

3.3.4 Obtenção dos extratos secos

Os fungos foram fermentados em caldo Czapek (glicose 30,0 g, nitrato de sódio 2,0 g, fosfato (mono)ácido de potássio 1,0 g, sulfato de magnésio heptahidratado 0,5 g, cloreto de potássio 0,5 g, sulfato ferroso heptahidratado 0,01g, extrato de levedura 1,0 g e água destilada 1000 mL) (RAPER; FENNELL, 1965).

Fragmentos de ágar batata dextrose, inoculado com o fungo e incubado a 28°C durante 7 dias, foram transferidos para o caldo de fermentação distribuído em erlenmeyers. Para a fermentação em pequena escala, foram utilizados erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de caldo ou erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL de caldo. A fermentação foi feita a 28°C, durante 15 dias em estufa BOD (modo estático) e/ou em incubadora orbital MA420, regulada para 120 rpm.

Concluída a fermentação, os caldos foram filtrados e submetidos a extração líquido-líquido com acetato de etila, na proporção de 1:1 (volume de caldo:volume de solvente). As extrações foram efetuadas em três etapas, cada uma empregando 1/3 do volume total de solvente. Depois disso, a fase aquosa dos filtrados C13.3.a agitado, C18.1.a estático e C18.1.a agitado foi acidificada com ácido clorídrico 10% v/v, a pH 2, e foi novamente extraída com acetato de etila, na proporção 1:1 (v/v), em uma única etapa, os extratos assim obtidos foram identificados por H^+ (exemplo: C13.3.a agitado H^+ refere-se ao extrato seco proveniente de fermentação sob agitação, cujo caldo foi acidificado para se proceder a extração líquido-líquido). Em seguida, as mesmas fases aquosas foram alcalinizadas a pH 10, com NaOH 0,7 mol.L⁻¹. Procedeu-se nova extração com acetato de etila, na proporção 1:1 (v/v), em etapa única,

resultando nos extratos identificados como OH⁻. As fases orgânicas foram então evaporadas, inicialmente em rotaevaporador e, depois, em capela de exaustão.

Para a fermentação em grande escala, foram utilizados 3 L de caldo Czapek igualmente distribuídos em 13 erlenmeyers de 1000 mL. A temperatura e o período de fermentação foram os mesmos descritos anteriormente.

Para o fungo C13.3.a, a fermentação em escala ampliada foi conduzida em shaker e para a obtenção do extrato, foi feita a extração líquido-líquido apenas com acetato de etila na mesma proporção e número de etapas, descritos anteriormente. Não foi realizada a acidificação nem a alcalinização da fase aquosa. A evaporação do solvente das fases orgânicas reunidas deu origem ao extrato C13.3.a agitado.

Para o fungo C18.1.a, a fermentação em larga escala foi conduzida estaticamente. O caldo de fermentação filtrado foi extraído primeiramente com hexano, na proporção 3:1 (volume de caldo:volume de solvente). A evaporação dessa fase orgânica, deu origem à fração hexânica do extrato C18.1.a estático. Em seguida, a fase aquosa foi extraída com acetato de etila, na proporção 3:1, duas vezes. As duas fases orgânicas em acetato de etila foram reunidas e submetidas a rotaevaporação, originando a fração acetato de etila do extrato C18.1.a estático.

3.3.5 Técnicas analíticas

Procedimentos de cromatografia líquida foram empregados para o fracionamento dos extratos brutos e a purificação das frações obtidas, as quais foram reunidas de acordo com o seu perfil cromatográfico em fase sólida. Os compostos isolados foram analisados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

3.3.5.1 Técnicas cromatográficas

Cromatografia em camada delgada (CCD)

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram feitas em cromatoplas DC-Fertigfolien Alugram Xtra Sil G/UV₂₅₄ Macherey-Nagel. Como eluente utilizou-se hexano:acetato de etila 1:1 e acetato de etila:metanol 7:3. As cromatoplas foram reveladas por exposição a radiação UV 254nm e UV 365 nm.

Cromatografia em coluna

A Tabela 1 sumariza os procedimentos de separação em coluna.

Tabela 1 – Condições de análise e amostras submetidas a cromatografia em coluna

| Amostra | Coluna | Eluentes |
|---|---|---|
| extrato C13.3.a agitado | cartucho de sílica Waters Sep-Pak Vac 35cc 10 g | hexano: acetato de etila (7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2;8), acetato de etila puro, acetato de etila:metanol (8:2 e 1:1) e metanol puro |
| F5 e F7 | Sephadex LH 20 (40cm x 2,5cm) | metanol |
| F5D1 | cartucho Strata C18- E Phenomenex | acetonitrila (ACN) (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90% v/v) em água acidificada com ácido acético 0,1% v/v e ACN pura |
| F3 | Sephadex LH 20 (40cm x 2,5cm) | diclorometano:metanol 7:3 |
| extrato C18.1.a estático (fração em acetato de etila) | Sephadex LH 20 (170cm x 2,4cm) | metanol |

Fonte: DO AUTOR, 2015.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE mencionadas nesse texto foram efetuadas em equipamento Shimadzu, modelo Prominence, composto por duas bombas de fase móvel LC-20AD, degaseificador DGU-20 A 3R, auto-injetor SIL-20 A HT, forno para coluna CTO-20 A, detector UV-Vis com arranjo de diodos SPD-20 A, DAD e módulo de comunicação CBM-20 A.

A Tabela 2 descreve os parâmetros cromatográficos de tais análises.

Tabela 2 – Condições de análise e amostras submetidas a CLAE

| Amostra | Coluna | Vol. de injeção (µL) | Fluxo mL.min ⁻¹ | Fase móvel |
|--|---|----------------------|----------------------------|--|
| F5B, F5D1, F3A, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 e P10 | Shim Pack CLC-ODS(M) (25cm, 4,6mm, 5µm) | 10 | 1 | 5 a 100% v/v de ACN em água acidificada com 0,1% v/v de ácido acético, em 30 min.; ACN 100% por 15 min. |
| F3A | Shim Pack PREP-ODS 228-00815-91 (25cm, 20 mm, 15µm) | 100 | 8 | ACN 45% v/v em água acidificada com ácido acético 0,1% v/v por 9 min.; 45 a 100% de ACN, em 2 min.; ACN 100% por 9 min. |
| P7 | Shim Pack PREP-ODS 228-00815-91 (25cm, 20 mm, 15µm) | 100 | 8 | ACN 45% v/v em água acidificada com ácido acético 0,1% v/v por 10 min.; 45 a 100% de ACN, em 2 min.; ACN 100% por 5 min. |

Fonte: DO AUTOR, 2015.

3.3.5.2 Ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN da subfração F5B foram adquiridos em equipamento Bruker Bio Spin GmbH (400 MHz para frequência do hidrogênio e 100 MHz para frequência do carbono) equipado com trocador automático de amostra, cryo-sonda TCI (1H/13C/15N) de 5 mm com ATMA[®] (Automatic Tuning MAtching) e gradiente de campo em z, sonda BBI de 5 mm com ATMA[®], gradiente de campo em z, unidade de temperatura variável, unidade geradora

de gradiente de campo, unidade cryo-fit® e unidade LC-SPE acoplado. Os espectros dos compostos isolados das subfrações F3A e P7 foram adquiridos em equipamento Bruker AC300 operando a 300 MHz para frequência do hidrogênio e 75 MHz para frequência do carbono, equipado com sonda BBO de 5 mm com ATMA®.

3.3.6 Identificação dos fungos endofíticos

A identificação dos fungos endofíticos foi realizada pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), vinculado à Universidade Estadual de Campinas.

O DNA genômico dos fungos endofíticos C13.3.a e C18.1.a foi extraído de acordo com o protocolo descrito por Raeder & Broda (1985). A metodologia consistiu na amplificação da região Espaçador Transcrito Interno (ITS) para as amostras pela metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. Os *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizados para PCR foram ITS-1 e ITS-4. Os fragmentos amplificados foram purificados a seguir e submetidos diretamente ao sequenciamento em sequenciador automático ABI3500XL Series (Applied Biosystem). Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram ITS-1 e ITS-4. As sequências parciais da região ITS obtidas com os diferentes *primers* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparada com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e *Centraalbureau voor Schimmelcultures, Fungal Biodiversity Centre* (CBS) (<http://www.cbs.knaw.nl/>). As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1994) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (TAMURA et al., 2007). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas, foi feita pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU e NEI, 1987), com valores de inicialização calculados a partir de 1000 re-amostragens, utilizando o software de rotina incluído no MEGA 4.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste texto, os resultados serão apresentados de forma a facilitar a sua compreensão o que não necessariamente coincide com a ordem cronológica em que foram obtidos.

4.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Foram isoladas 158 colônias fúngicas. Mais colônias emergiram a partir das folhas coletadas em ambiente rural do que do material urbano. Tal observação foi quantificada pela frequência de isolamento, conceituada como a razão entre o número de fragmentos com crescimento fúngico e o número total de fragmentos incubados, cujos resultados estão exibidos na Tabela 3. A constatação de uma maior frequência de isolamento nas amostras provenientes da zona rural do que da zona urbana condiz com o relatado na literatura. No ambiente rural, a maior proximidade entre as espécies vegetais facilita o mecanismo de transmissão horizontal de fungos endofíticos, resultando em comunidades endofíticas mais numerosas e mais variadas (ALY et al., 2011).

Das 158 colônias isoladas, 148 foram purificadas.

Tabela 3 – Frequência de isolamento dos fungos endofíticos.

| Procedência | Nº de fragmentos incubados | Nº de fragmentos com crescimento fúngico | Frequência de isolamento |
|---------------|----------------------------|--|--------------------------|
| árvore rural | 95 | 85 | 0,895 |
| árvore urbana | 50 | 35 | 0,700 |
| Total | 145 | 120 | 0,828 |

Fonte: DO AUTOR, 2015.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

De ambos os fungos submetidos à identificação (cepas C13.3.a e C18.1.a), fragmentos da região ITS foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra. A região ITS1-5.8S-ITS2 não ofereceu resolução suficiente para discriminar a espécie.

4.2.1 Cepa C13.3.a

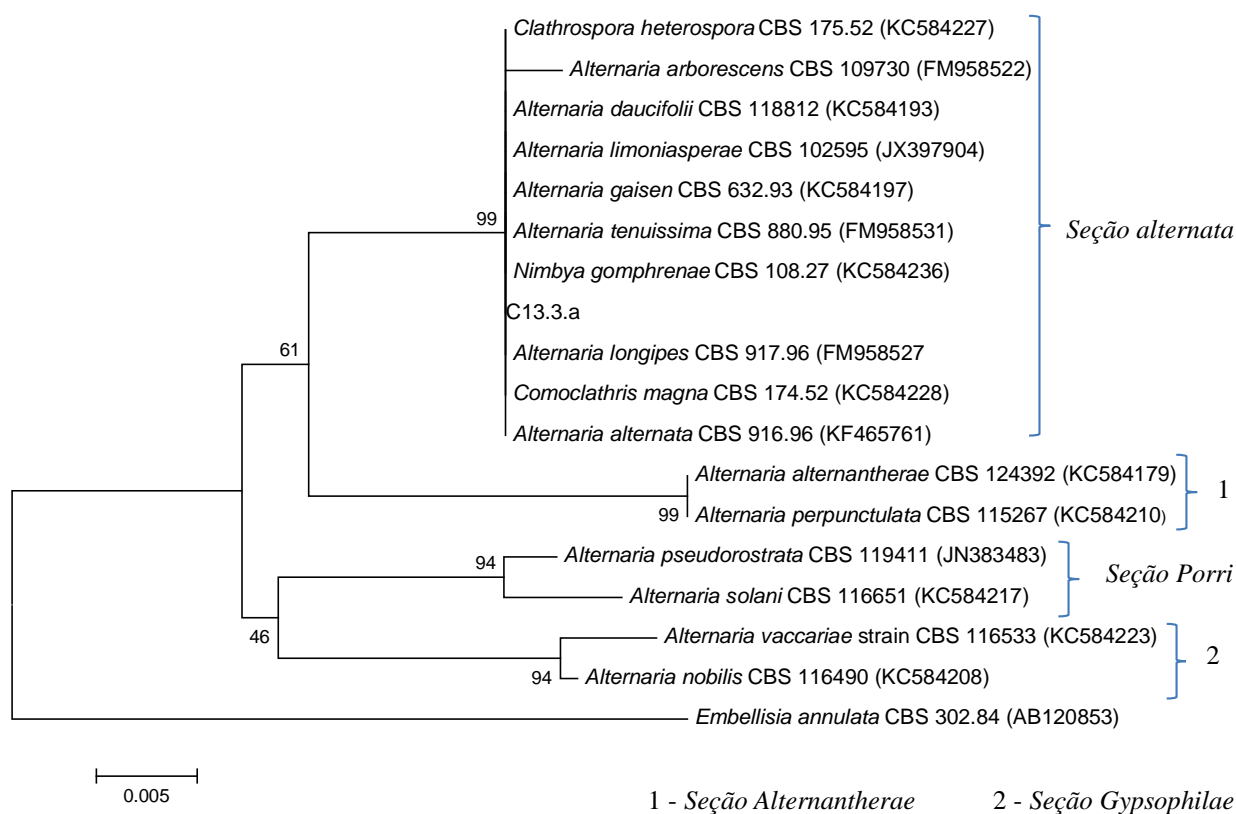
De acordo com a sequência de DNA (FIGURA 5) e a análise filogenética (FIGURA 6), a cepa C13.3.a foi identificada como complexo *Alternaria alternata*.

Figura 5 – Sequência parcial do *operon* ribossomal proveniente da cepa C13.3.a

TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGGTATCCCTACCTGATCCGAGGTCAAAGTTGAAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCTTTG
 CTGATAGAGAGTGC GACTTGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCT
 AGAGACAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGC
 GCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGAT
 GCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTTTATGTT
 TGTCTAGTGGTGGCGAACCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAAGACAAGGGTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCC
 GAGAGGTTCCAGCCCGCTTCATATTTGTGTAATGATCCCTCCGCAGG

Fonte: DE ANGELIS, 2015a.

Figura 6 – Árvore filogenética demonstrando as relações filogenéticas entre a sequência parcial das regiões do *operon* ribossomal ITS1-5.8S-ITS2 da cepa C13.3.a e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e GenBank



Fonte: DE ANGELIS, 2015a.

Recentemente, o fungo endofítico *A. alternata* foi descrito como causador da fitopatogenia conhecida como *black spot* em *H. impetiginosus* (DAL BELLO et al., 2015). Esse mesmo micro-organismo também já foi isolado de *Tabebuia argentea*, uma outra espécie de Bignoniaceae (SADANANDA et al., 2011).

4.2.2 Cepa C18.1.a

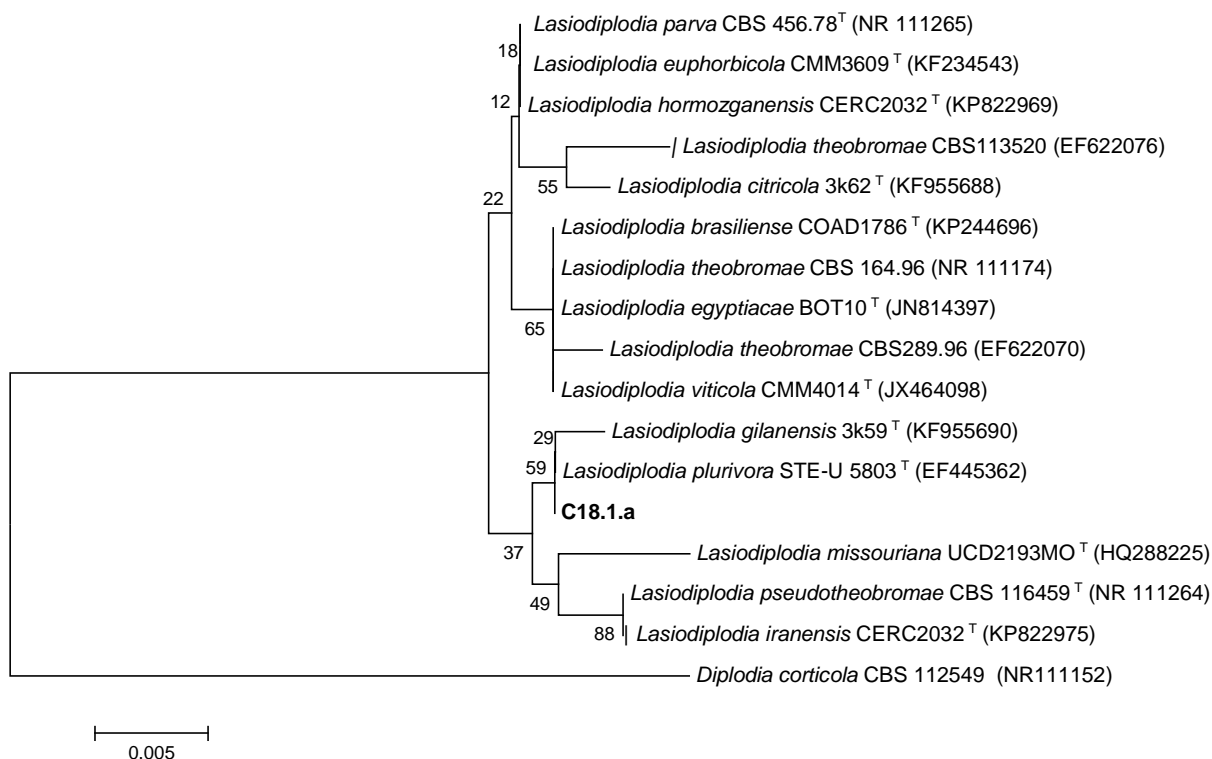
De acordo com a sequência de DNA (FIGURA 7) e a análise filogenética (FIGURA 8), a cepa C18.1.a foi identificada como *Lasiodiplodia* sp.

Figura 7 – Sequência parcial do *operon* ribossomal proveniente da cepa C18.1.a

TGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTCTCGGGCTTCGGCTCGACTCTCCACCCCTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTG
GCGGCTCCGGCCGCAAAGGACCTTCAAACCTCCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAAGTTAATAAACTAAAACCTTC
AACACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCCCTCAAGCTCTG
CTTGGAATTGGGCACCGTCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCTGTTTCAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATA
CACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCGGACGAACCTTCTGAACCTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA
TACCCGCTGAACTTAAGCATA

Fonte: DE ANGELIS, 2015b.

Figura 8 – Árvore filogenética demonstrando as relações filogenéticas entre a sequência parcial das regiões do *operon* ribossomal ITS1-5.8S-ITS2 da cepa C18.1.a e sequências de linhagens de micro-organismos relacionados presentes nas bases de dados CBS e GenBank



Fonte: DE ANGELIS, 2015b.

O fungo endófito *Lasiodiplodia* sp. foi isolado, por outros pesquisadores, de *Acanthus ilicifolius* (CHEN et al., 2015), do coqueiro (MATSUMOTO e NAGO, 1994) e da videira (ANDOLFI et al., 2014) e descrito como agente fitopatogênico. Nesses dois últimos trabalhos

mencionados, as plantas hospedeiras não foram cientificamente especificadas pelos autores. Até o momento não há relatos sobre o isolamento desse micro-organismo a partir de espécies de Bignoniaceae e nem estudos sobre a atividade biológica de seus extratos.

4.3 TESTE DO ÁGAR EM BLOCO

Dos 148 fungos testados, apenas *A. alternata* inibiu o crescimento de *S. aureus*.

No presente trabalho elegeu-se o teste do ágar em bloco como método de triagem para a seleção dos fungos que seriam estudados por ser um teste de baixo custo e fácil execução em relação a outros. Entretanto, é evidente que a ausência de atividade antimicrobiana não descarta a presença de outras atividades importantes como a antitumoral, por exemplo. O ideal seria que fosse possível avaliar outras propriedades bioativas para se eleger o(s) alvo(s) de estudo, porém, não foram encontrados na literatura ensaios que seriam viáveis de serem aplicados a um número tão grande de amostras, dentro dos recursos disponíveis para este projeto.

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS SECOS

Os resultados do processo de fermentação em pequena escala e respectiva extração estão apresentados na Tabela 4. Foram obtidos maiores rendimentos, em massa, pela fermentação estática do que sob agitação, tanto para o fungo *A. alternata* quanto para *Lasiodiplodia* sp., sendo a diferença ainda mais significativa no último caso. Essa constatação sugere que em condições de estresse decorrente de aeração reduzida, o metabolismo fúngico seja estimulado, pelo menos a nível quantitativo. Além da influência da aeração, aqui constatada, outros parâmetros de cultivo interferem na quantidade e qualidade dos extratos produzidos. A otimização de fatores como a temperatura, pH, e composição do meio também permite a obtenção de maior rendimento. É importante ressaltar que nem sempre o aumento no rendimento da biomassa produzida é proporcional ao aumento da produção de metabólitos de interesse (GARYALI et al., 2014). Portanto, é indiscutível a importância da otimização das condições de cultivo e fermentação, entretanto, tal estudo só é possível quando já se conhecem os compostos de interesse produzidos pelo fungo em estudo.

Tabela 4 – Extratos secos obtidos pela fermentação em menor escala e respectivos rendimentos

| Extrato | Volume do caldo de fermentação (mL) | Massa de extrato obtida (mg) | Massa de extrato obtida (mg)/volume do caldo (mL) |
|---|--|-------------------------------------|--|
| C1.2.b | 200 | 17,0 | 0,085 |
| C7.3.a | 400 | 37,0 | 0,093 |
| <i>A. alternata</i> estático | 100 | 17,0 | 0,170 |
| <i>A. alternata</i> agitado | 200 | 20,5 | 0,103 |
| <i>A. alternata</i> agitado H⁺ | 200 | 9,1 | 0,046 |
| <i>A. alternata</i> agitado OH⁻ | 200 | 4,0 | 0,020 |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. estático | 200 | 138,2 | 0,691 |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. estático H⁺ | 200 | 37,6 | 0,188 |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. estático OH⁻ | 200 | 4,0 | 0,020 |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. agitado | 100 | 13,0 | 0,130 |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. agitado H⁺ | 100 | 88,1 | 0,881 |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. agitado OH⁻ | 100 | 4,0 | 0,040 |
| A26.1.a | 200 | 10,5 | 0,053 |

Fonte: DO AUTOR, 2015.

A fermentação em maior escala, conduzida sob agitação (por 15 dias, a 28°C em caldo Czapek), do fungo *A. alternata* resultou em 396,5 mg de extrato seco, sendo que para cada 1 mL de caldo fermentativo obteve-se 0,132 mg de extrato seco. Na fermentação em pequena escala, para cada 1 mL de caldo fermentativo foi obtido 0,103 mg de extrato seco. No caso do fungo *Lasiodiplodia* sp., a segunda fermentação, sob condição estática, possibilitou a obtenção de 2128,8 mg de extrato seco (95,8 mg na fração hexânica e 2033 mg na fração em acetato de etila). Para esse micro-organismo, as relações massa de extrato (g)/mL de caldo de fermentação foram 0,691 e 0,710 para a menor e a maior escala, respectivamente.

A maturidade do inóculo, a temperatura, a composição do meio e o período de duração foram os mesmos tanto na fermentação em pequena escala quanto na fermentação em grande escala. Houve variação na proporção volume de meio/volume do frasco utilizado (0,4 e 0,23, respectivamente). Além disso, não houve adequada uniformidade no tamanho dos fragmentos de inóculo, os quais foram cortados manualmente sem empregar um instrumento padronizado.

Tais variações provavelmente são as responsáveis pela alteração de rendimento observada (GARYALI et al.,2014). No caso da fermentação do fungo *A. alternata*, a aeração também variou, uma vez que a agitação foi promovida por equipamentos diferentes. Houve um incremento de 28% no rendimento do extrato seco obtido comparando a segunda fermentação com a primeira, enquanto que para *Lasiodiplodia* sp., fermentado estaticamente, o aumento observado foi apenas 2,7%.

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FÚNGICOS

Foi observada atividade antimicrobiana para extratos de fungos que não inibiram o crescimento microbiano quando o desempenho de sua colônia de origem foi avaliado. Cabe ressaltar que o controle efetuado com o solvente empregado para dissolução do extrato forneceu resultado negativo e que não foi detectada contaminação do cultivo durante o processo fermentativo.

4.5.1 Difusão em ágar

Alguns extratos inibiram o crescimento dos micro-organismos, o que foi evidenciado pelo surgimento de um halo de inibição nas placas inoculadas, ao redor das cavidades nas quais foram depositados os extratos em análise. A Tabela 5 apresenta os diâmetros dos halos (mm) frente aos três patógenos estudados.

Embora os fungos C1.2.b e *Lasiodiplodia* sp. não tenham apresentado atividade antimicrobiana quando submetidos ao teste do ágar em bloco, frente a *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*, os extratos da fermentação de ambos foram ativos no teste pelo método de difusão em ágar. Isso provavelmente ocorreu devido ao fato dos metabólitos estarem mais concentrados no extrato do que no meio de cultura. Além disso, a presença do solvente pode ter facilitado a difusão de metabólitos menos polares sobre a placa inoculada com os micro-organismos em teste. Entretanto, não se considerou que tais limitações tenham inviabilizado a aplicação do teste do ágar em bloco como ensaio de triagem, pois o único fungo positivo nesse teste foi aquele cujo extrato apresentou a melhor atividade antimicrobiana.

Tabela 5 – Resultado do teste de atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos pelo método de difusão em ágar

| Extrato fúngico | Diâmetro do halo de inibição (mm) | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| | <i>Candida albicans</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| C1.2.b | - | 12 | - |
| C7.3.a | - | - | - |
| <i>A. alternata</i> estático | - | 19 | - |
| <i>A. alternata</i> agitado | 15 | 25 | - |
| <i>A. alternata</i> agitado H ⁺ | 11 | 14 | - |
| <i>A. alternata</i> agitado OH ⁻ | 14 | 15 | - |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. estático | - | 13 | - |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. estático H ⁺ | - | 11 | 14 |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. estático OH ⁻ | 13 | 15 | 16 |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. agitado | - | 10 | - |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. agitado H ⁺ | - | - | - |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. agitado OH ⁻ | - | - | - |
| A26.1.a | - | - | - |

O sinal (-) representa ausência de halo de inibição.

Fonte: DO AUTOR, 2015.

4.5.2 Determinação da CIM

Alguns extratos fúngicos apresentaram faixa de concentração inibitória mínima menor que 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. albicans* e *S. aureus* (TABELA 6). A menor faixa de CIM determinada, 250-125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato *A. alternata* agitado contra *S. aureus*, é coerente com o resultado encontrado no teste de difusão em ágar, no qual o efeito mais intenso de inibição de crescimento desse micro-organismo foi exercido pelo mesmo extrato.

Tabela 6 – Determinação da concentração inibitória mínima de extratos fúngicos frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

| Extrato fúngico | Faixa de concentração inibitória mínima ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) | | |
|--|---|------------------|----------------|
| | <i>C. albicans</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> |
| C1.2.b | - | * | - |
| <i>A. alternata</i> estático | - | * | - |
| <i>A. alternata</i> agitado | 500-1000 | 125-250 | - |
| <i>A. alternata</i> agitado H^+ | 500-1000 | * | - |
| <i>A. alternata</i> agitado OH^- | 500-1000 | * | - |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. estático | - | * | - |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. estático H^+ | - | * | * |
| <i>Lasiodiplodia</i> sp. agitado | - | 250-500 | - |
| amoxicilina | - | < 0,625 | - |
| nistatina | > 16 | - | - |

(*) CIM maior que 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; (-) teste não realizado.

Fonte: DO AUTOR, 2015.

Embora os extratos tanto de *A. alternata* quanto de *Lasiodiplodia* sp. tenham inibido o crescimento de *S. aureus*, as menores faixas de CIM determinadas (125-250 e >1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente) não são valores promissores. A fim de ser considerada interessante, a CIM de extratos deve ser inferior a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (COS et al., 2006). Entretanto, vale ressaltar que a atividade antimicrobiana não significativa dos extratos pesquisados não impede que, talvez, compostos deles isolados sejam eficazes para o controle de micro-organismos.

4.6 ATIVIDADE SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS TUMORAIS

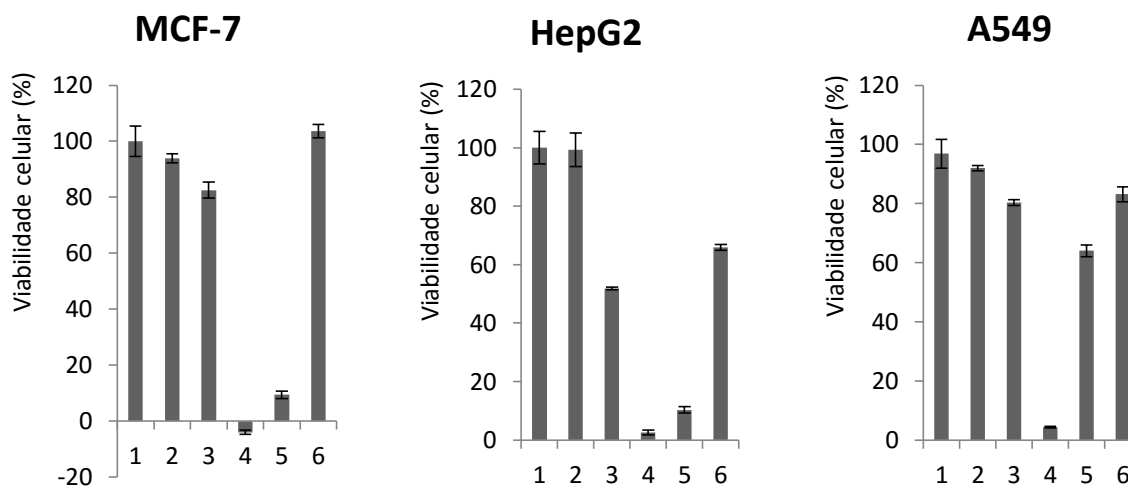
Os resultados da avaliação da atividade sobre a viabilidade de células tumorais apresentados pelos extratos obtidos pela fermentação inicial, em menor escala, os quais serão relatados na próxima subseção, embasaram a seleção dos fungos endofíticos que foram fermentados pela segunda vez, em maior escala.

4.6.1 Dos extratos fúngicos obtidos pela fermentação em menor escala

Os resultados do teste da atividade dos extratos C7.3.a, *A. alternata* agitado, *Lasiodiplodia* sp. estático e *Lasiodiplodia* sp. estático H^+ sobre a viabilidade de células MCF-7, HepG2 e A549 encontram-se representados na Figura 9. Na mesma figura também podem

ser observados os resultados de controle de viabilidade celular (padrão) e controle do co-solvente empregado no teste (DMSO).

Figura 9 – Avaliação da atividade dos extratos fúngicos C7.3.a, *A. alternata* agitado (1ª fermentação), *Lasiodiplodia* sp. estático e *Lasiodiplodia* sp. estático H⁺, todos a 40 µg.mL⁻¹, sobre a viabilidade de células MCF-7, HepG2 e A549



Legenda: 1 – padrão; 2 – DMSO; 3 – C7.3.A; 4 – *A.alternata* agitado; 5 – *Lasiodiplodia* sp. estático; 6 – *Lasiodiplodia* sp. estático H⁺.

Fonte: DO AUTOR, 2015.

Esses testes foram realizados como uma triagem preliminar para selecionar os fungos promissores para cultivo em maior escala. Por seu extrato, fermentado sob agitação, ter apresentado maior eficiência na inibição de viabilidade celular de todas as linhagens estudadas, o fungo endofítico *A. alternata* foi selecionado para ser submetido à fermentação em maior escala, com o intuito de se obter quantidade de extrato suficiente para o estudo químico de sua composição.

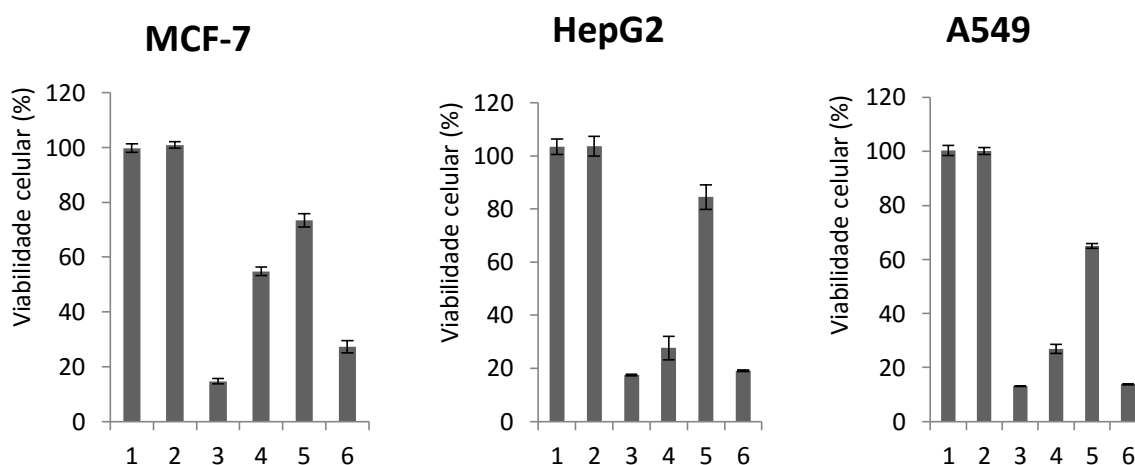
O extrato do fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp., obtido sob condição estática, também reduziu significativamente a viabilidade de células MCF-7 e HepG2. Entretanto, não afetou tão intensamente a viabilidade de células A549. Esses resultados sugerem um tipo de seletividade e, portanto, motivaram a investigação dos componentes de tal extrato. A relevância de tal constatação pode ser ilustrada, por exemplo, pelo composto espiromassaritona encontrado de forma inédita no produto de fermentação do fungo endofítico *Massrison* sp., isolado de *Rehmannia glutinosa*. A espiromassaritona exibiu IC₅₀ 6,8 µg.mL⁻¹, 5,6 µg.mL⁻¹ e 9,8 µg.mL⁻¹ contra células MCF-7, HepG2 e A549, respectivamente. Entretanto, sua IC₅₀ contra células

normais de fígado humano (L-02) foi $7,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, revelando ausência de seletividade entre células saudáveis e células tumorais (SUN et al., 2011).

4.6.2 Do extrato agitado de *A. alternata* (2ª fermentação) e suas frações

Os resultados da avaliação de atividade do extrato de *A. alternata*, proveniente da fermentação em maior escala, e de suas frações F3, F5 e F7 sobre a viabilidade de células MCF-7, HepG2 e A549 estão representados na Figura 10.

Figura 10 - Efeito exercido pelo extrato de *A. alternata* (2ª fermentação) e suas frações, F3, F5 e F7, todos a $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sobre a viabilidade de células MCF-7, HepG2 e A549



Legenda: 1 – padrão; 2 – DMSO; 3 – F3; 4 – F5; 5 – F7; 6 – *A. alternata* agitado

Fonte: DO AUTOR, 2015.

Observou-se que o extrato *A. alternata* agitado proveniente da 2ª fermentação (em maior escala) exerceu menor efeito sobre a viabilidade de células HepG2, A549 e, principalmente, MFC-7 em comparação ao extrato *A. alternata* agitado oriundo da 1ª fermentação (FIGURA 8). A possibilidade de haver redução na atividade biológica em decorrência do armazenamento do fungo em laboratório e de seus sucessivos repiques é relatada na literatura. Uma das explicações seria que embora o estímulo da planta hospedeira sobre o metabolismo do endófito ainda se manifeste nos micro-organismos recém isolados, enfraquece ao longo do tempo e com a renovação das cepas tende a desaparecer (ALY et al., 2011). A importância do fracionamento bioguiado foi realçada pela observação do desempenho superior de F3 e F5 em comparação a F7.

Experimentos onde a concentração do extrato agitado *A. alternata* (2ª fermentação) e de suas frações F3 e F5 variaram de $6,25$ a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ permitiram calcular a IC_{50} dessas amostras

sobre a viabilidade das células tumorais testadas anteriormente. Tais valores encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 – IC₅₀ do extrato *A. alternata* agitado e de suas frações, F3 e F5, frente a linhagens de células tumorais

| amostra | IC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) | | |
|-----------------|---|------------|------------|
| | MCF-7 | HepG2 | A549 |
| F3 | 10,28±5,22 | 9,75±1,31 | 12,89±2,08 |
| F5 | 34,70±2,34 | 34,45±1,80 | 85,86±0,98 |
| C13.3.a agitado | 18,84±1,69 | 18,55±1,67 | 26,90±1,86 |
| cisplatina | 21,12±1,56 | 27,15±1,73 | 7,15±1,56 |

Fonte: DO AUTOR, 2015.

O extrato agitado do fungo endofítico *A. alternata* demonstrou IC₅₀ contra células MCF-7 e HepG2 menores que o fármaco cisplatina, usado como controle positivo. Seu fracionamento químico propiciou o aumento da atividade de redução da viabilidade de células tumorais, evidenciado pelo desempenho superior da subfração F3, na qual, provavelmente o(s) princípio(s) ativo(s) está(ão) mais concentrado(s) e/ou livre(s) de antagonismo por outro constituinte.

Embora os valores de IC₅₀ da fração F3 contra as linhagens celulares ensaiadas sejam indícios de atividade biológica satisfatória, os resultados só poderiam ser considerados promissores se tivesse sido avaliada a atividade citotóxica contra células normais. Os testes de citotoxicidade frente a células normais, pelo menos na UNIFAL, apenas são realizados com compostos isolados. Se fosse possível conhecer o efeito dos extratos brutos ou de suas frações sobre a viabilidade de células sadias, seguramente a bioprospecção de moléculas com potencial farmacológico seria conduzida de forma mais racional.

4.7 ESTUDO QUÍMICO DOS EXTRATOS

Os resultados do estudo químico dos extratos dos fungos endofíticos foram preponderantemente limitados em virtude do baixo rendimento em massa obtido pela fermentação. Muitas frações não foram obtidas em quantidade suficiente para sofrerem novos processos de separação e muito menos para terem sua atividade biológica avaliada, a fim de direcionar a purificação das frações mais ativas. Do extrato do fungo *Alternaria alternata*, foi possível bioguiar o estudo de algumas das primeiras frações. Entretanto, a quantidade de

amostra dispensada para o ensaio biológico dificultou o isolamento de compostos em quantidade suficiente para serem identificados e bioavaliados individualmente. Por esse motivo, do fungo *Lasiodiplodia* sp., optou-se por não efetuar o fracionamento bioguiado, a fim de preservar maior quantidade de amostra para estudos posteriores.

4.7.1 De *Alternaria alternata*

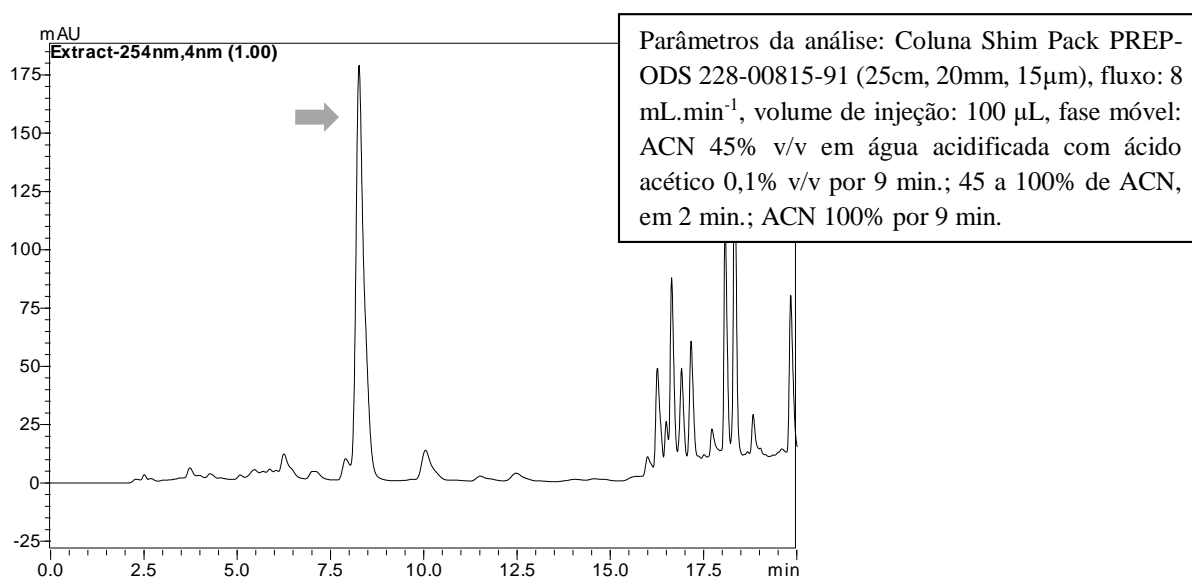
Com base no perfil apresentado na cromatografia de camada delgada, as frações F1 e F9, assim como as subfrações F3B, F5A, F5C, F5D (1, 2, 3, 5 e 6), F5E e F5F requerem operações de separação adicionais para que se possa tentar isolar algum composto, entretanto possuem massa em quantidade inviável para isso.

As subfrações de F7 necessitariam de novos procedimentos de purificação, mas, seu estudo foi suspenso devido ao seu fraco desempenho em reduzir a viabilidade de células tumorais. As frações que exibiram atividade significativa (F3 e F5) receberam prioridade.

F3A

A subfração F3A, submetida a CLAE semi-preparativa, resultou no isolamento do composto com tempo de retenção 8.26 min., cujo pico está assinalado no cromatograma representado pela Figura 11.

Figura 11 – Cromatograma referente à purificação da subfração F3A do extrato de *A. alternata* por CLAE semi-preparativa



Fonte: DO AUTOR, 2015.

Após a eliminação da fase móvel, obteve-se um sólido branco com massa 3,3 mg, o qual foi analisado por RMN. Os espectros de ^1H , DEPT-135 (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) e HSQC (Heteronuclear Simple Quantum Correlation) encontram-se representados nas Figuras 12, 13 e 14, respectivamente. A Tabela 8 representa os deslocamentos químicos para carbono e hidrogênio tal como apareceram correlacionados no HSQC.

Tabela 8 – Deslocamentos químicos presentes na subfração F3A do extrato de *A. alternata*

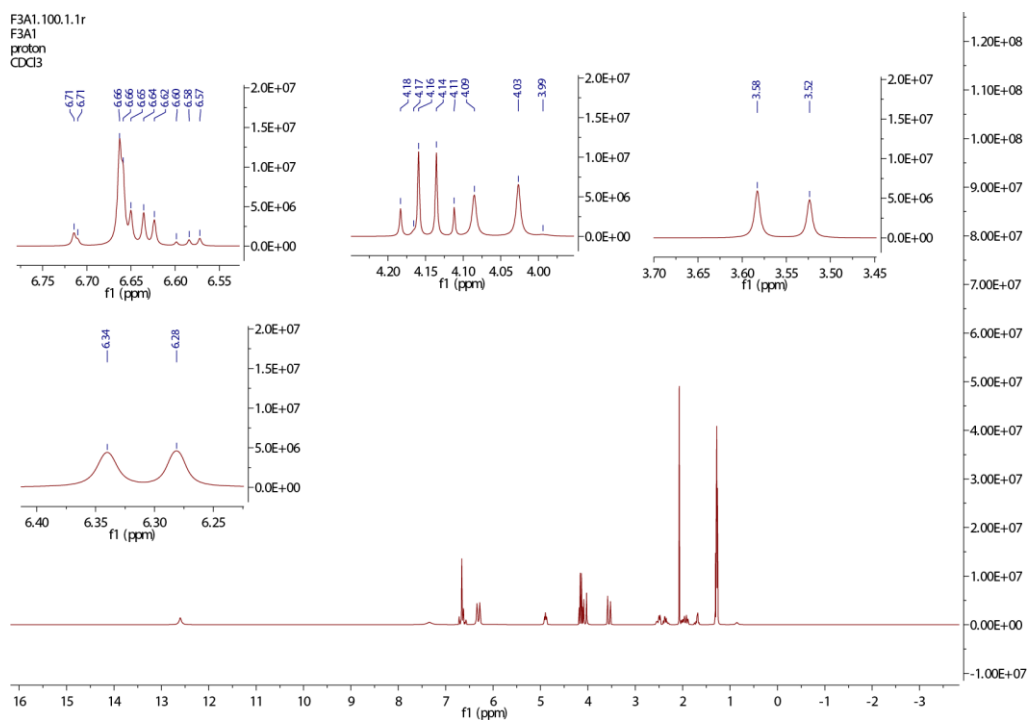
| $\delta^{13}\text{C}$ (75 MHz, CDCl_3) | $\delta^1\text{H}$ (300 MHz, CDCl_3) | $\delta^{13}\text{C}$ (75 MHz, CDCl_3) | $\delta^1\text{H}$ (300 MHz, CDCl_3) |
|---|---|---|---|
| 148 (CH) | 6,65 (m) | 34,1 (CH_2) | 1,97 (m) 1,69 (m) |
| 131 (CH) | 6,65 (m) | 32,6 (CH_2) | 2,37 (m) 2,50 (m) |
| 113 (CH) | 6,28 | 29,7 | 1,28 (m) |
| 103 (CH) | 6,34 | 24,1 (CH_2) | 1,69 (m) 2,07 (s) |
| 72,8 (CH) | 4,90 (m) | 19,9 (CH_3) | 1,28 (m) |
| 60,5 | 4,14 (m) | - | 12,6 (s) |
| 43,9 (CH_2) | 3,55(d, $J=18\text{Hz}$) 4,06 | - | - |

(-) significa ausência de dados

Fonte: DO AUTOR, 2016.

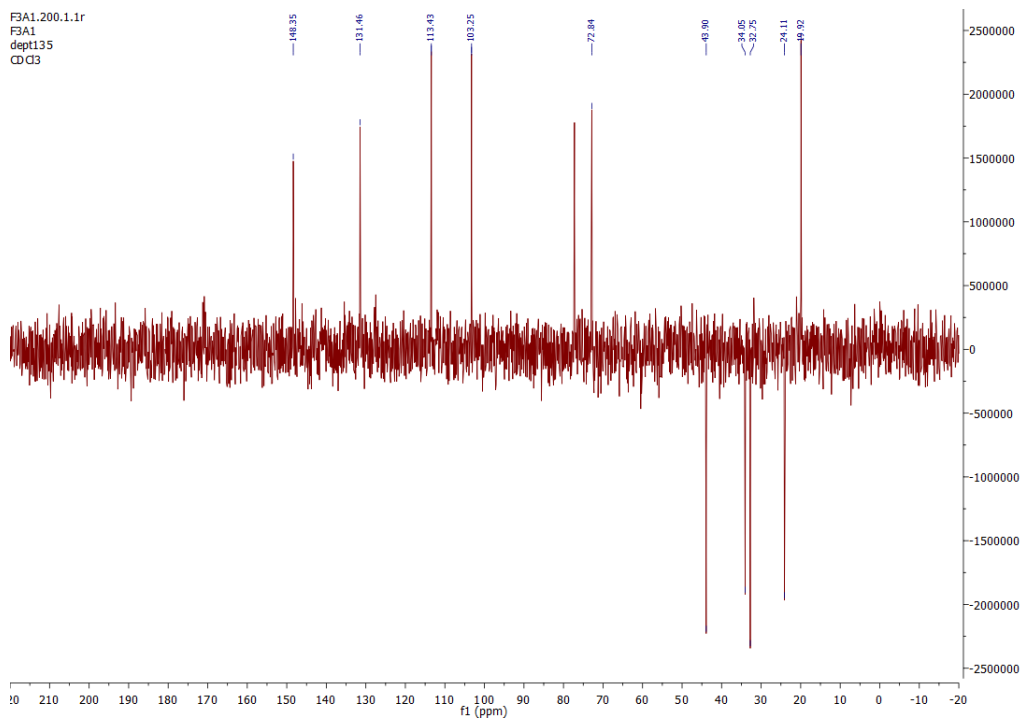
Pela análise dos dados espectrais, são observados carbonos do tipo sp^2 , provavelmente aromáticos, cada qual ligado a um próton, correspondentes aos deslocamentos químicos em 148, 131, 113 e 103 ppm. O deslocamento químico em 72,8 ppm pode ser atribuído a carbono terciário ligado a um átomo eletronegativo como oxigênio ou algum halogênio. Também são observados outros carbonos sp^3 : secundários em 43,9, 34,1, 32,6 e 24,1 ppm e primário em 19,9 ppm. O próton com deslocamento químico em 12,6 ppm evidencia a presença da função ácido carboxílico. Entretanto, os resultados não foram suficientes para identificar a estrutura molecular. Para tal identificação, seria necessário obter o espectro COSY (COReLation SpectroscopY), HMBC (Heteronuclear MultipleBond Correlation) e efetuar a espectrometria de massas.

Figura 12 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do composto isolado da subfração F3A do extrato de *A. alternata*



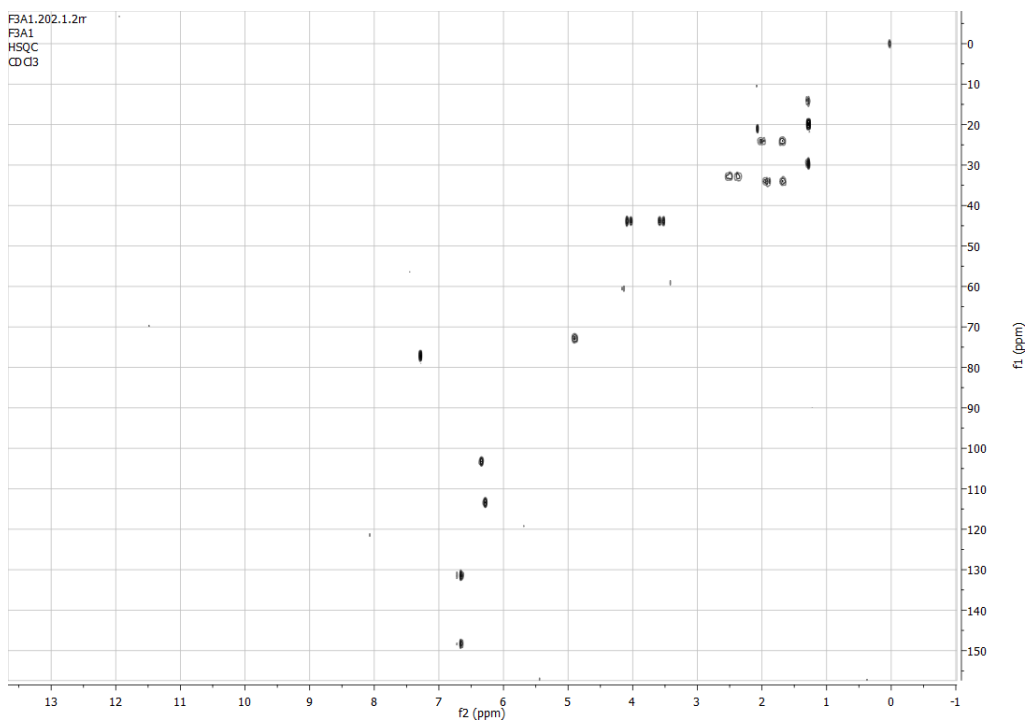
Fonte: DO AUTOR, 2016.

Figura 13 – Espectro de DEPT-135 (75MHz, CDCl_3) do composto isolado da subfração F3A do extrato de *A. alternata*



Fonte: DO AUTOR, 2016.

Figura 14 – Espectro HSQC (300, 75 MHz, CDCl₃) do composto isolado da subfração F3A do extrato de *A. alternata*

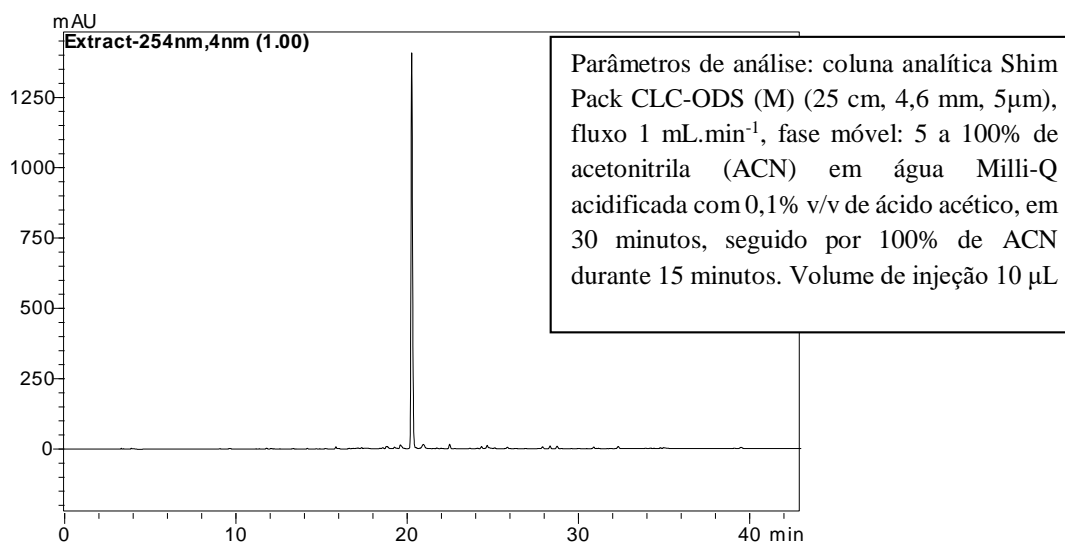


Fonte: DO AUTOR, 2016.

F5B

A análise cromatográfica de F5B, representada na Figura 15, demonstrou a presença de um composto majoritário, aparentemente, com pequeno teor de contaminação.

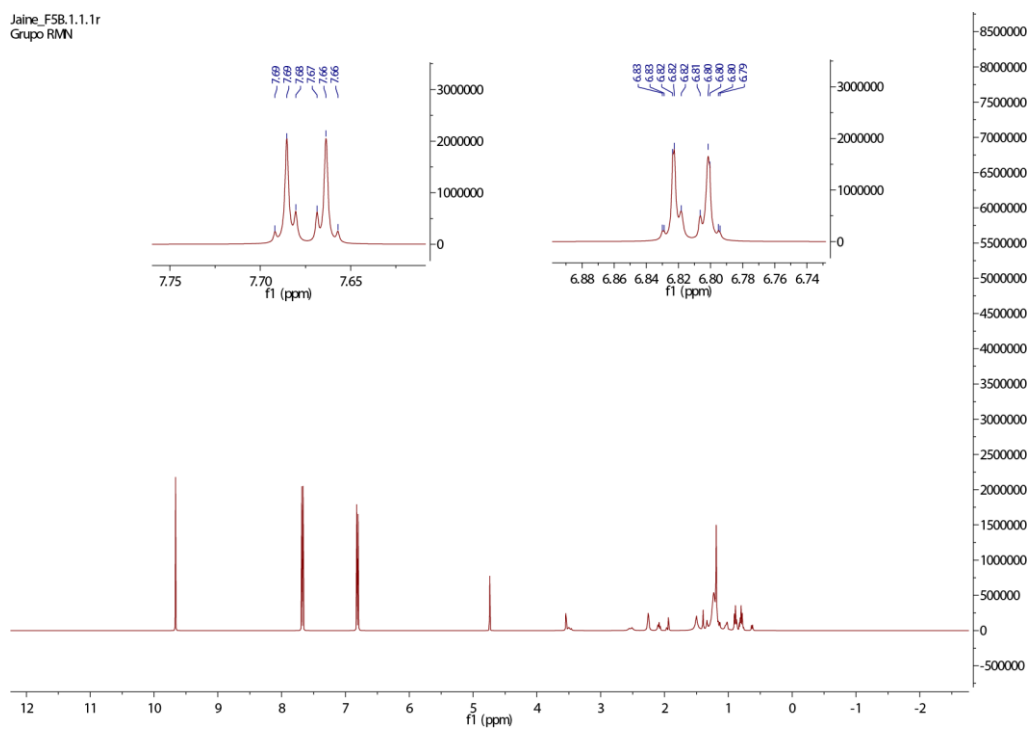
Figura 15 – Cromatograma da subfração F5B do extrato de *A. alternata* analisada por CLAE



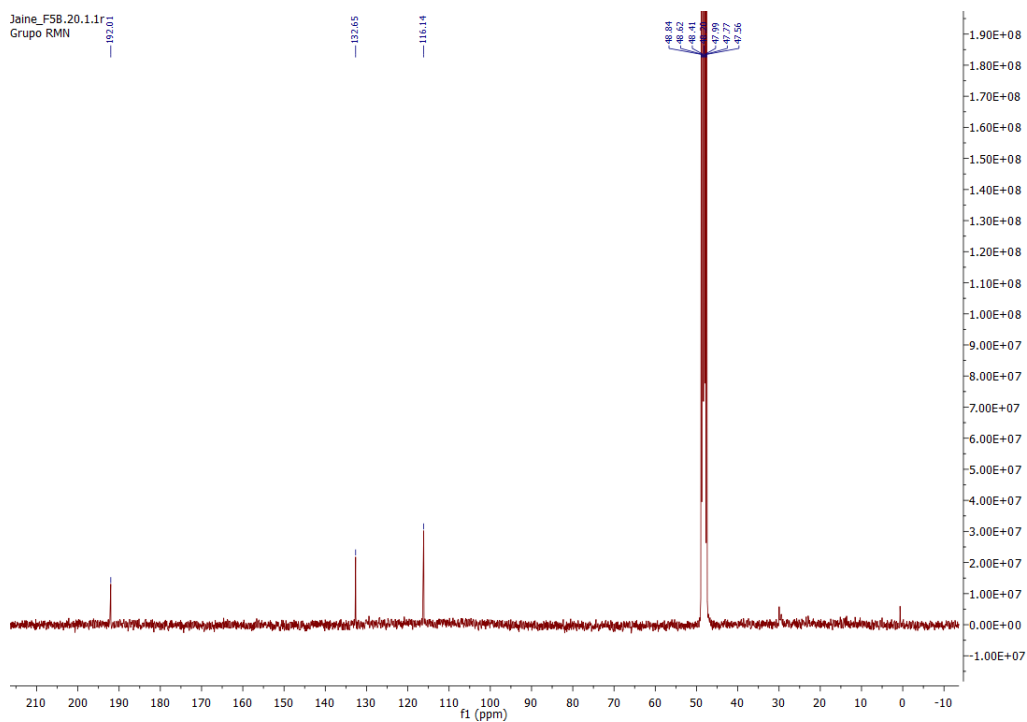
Fonte: DO AUTOR, 2016.

Após a evaporação do solvente da subfração F5B, foi obtido um sólido vítreo (m= 2,4 mg), cujos espectros de RMN de prótons, ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC estão representados nas Figuras 16, 17, 18, 19 e 20 respectivamente.

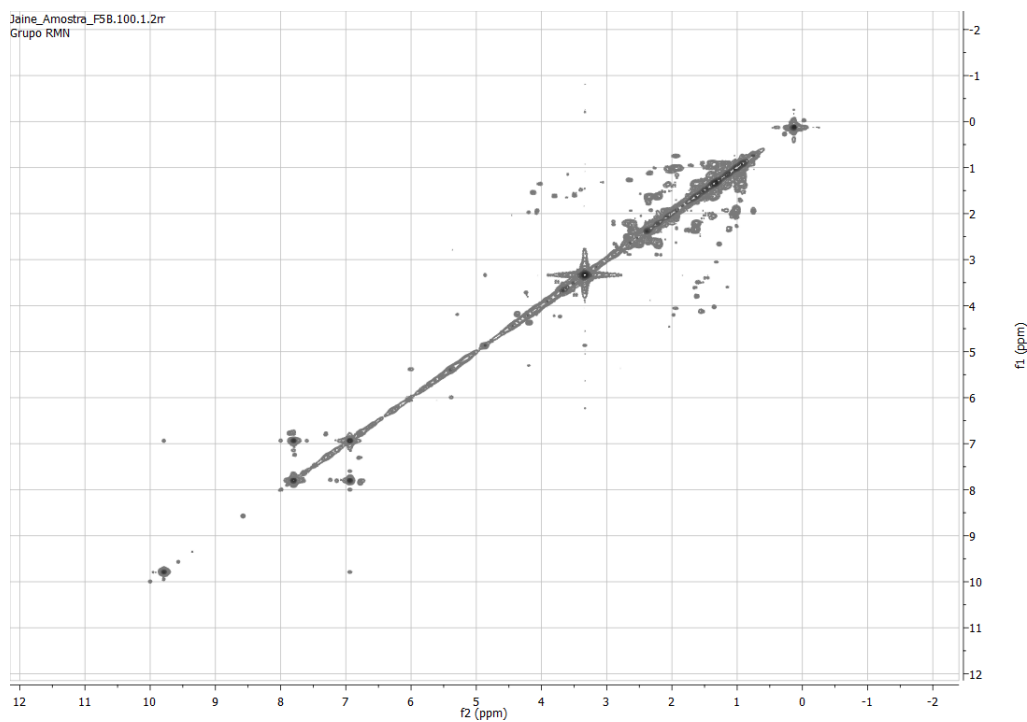
Figura 16 – Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, MeOD) da subfração F5B do extrato de *A. alternata*



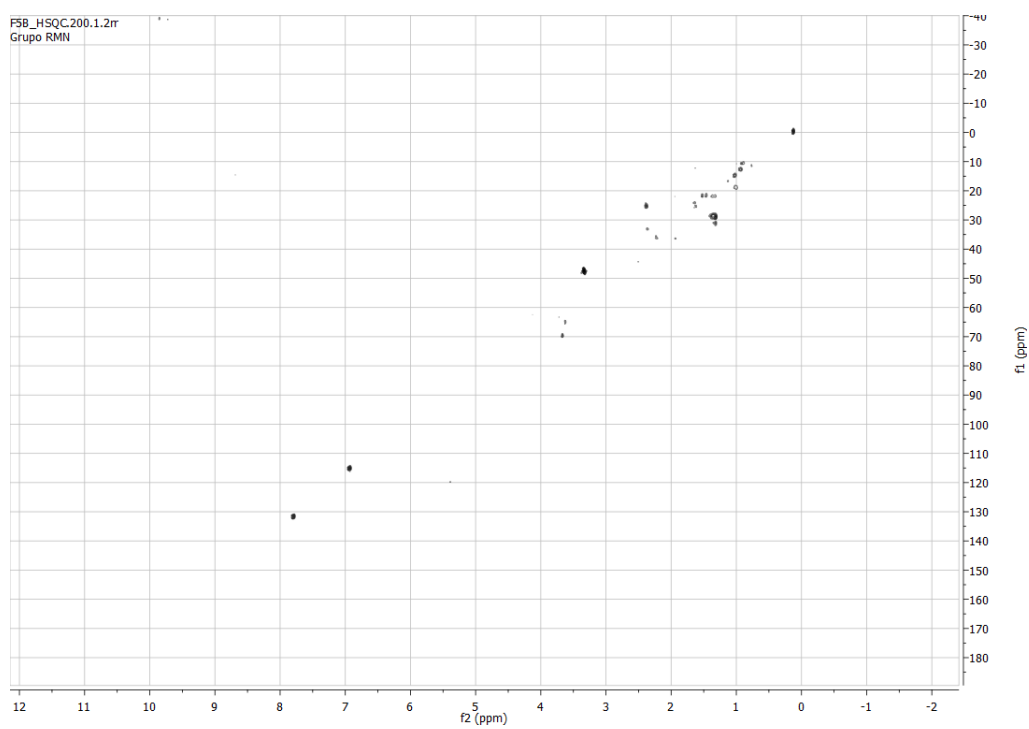
Fonte: DO AUTOR, 2016.

Figura 17 – Espectro de ^{13}C (100 MHz, MeOD) da subfração F5B do extrato de *A. alternata*

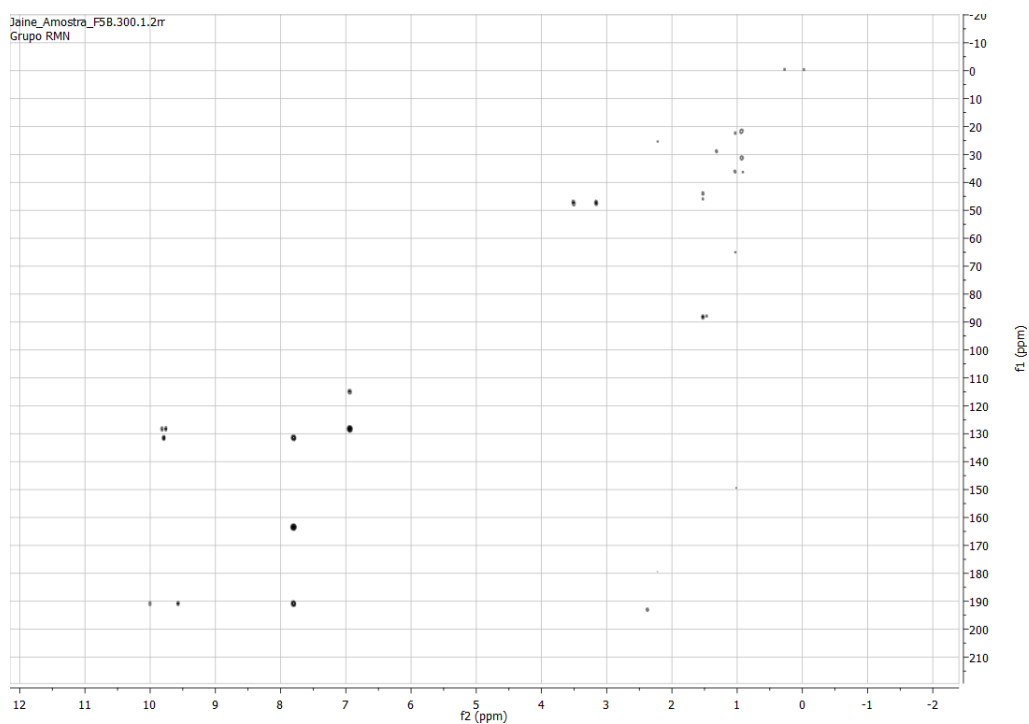
Fonte: DO AUTOR, 2016.

Figura 18 – Espectro COSY (400,400MHz, MeOD) da subfração F5B do extrato de *A. alternata*

Fonte: DO AUTOR, 2016.

Figura 19 – Espectro HSQC (400,100MHz, MeOD) da subfração F5B do extrato de *A. alternata*

Fonte: DO AUTOR, 2016.

Figura 20 – Espectro HMBC (400,100MHz, MeOD) da subfração F5B do extrato de *A. alternata*

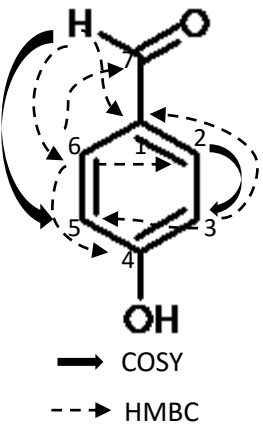
Fonte: DO AUTOR, 2016.

Dentre os resultados de RMN é possível visualizar tanto deslocamentos químicos quanto correlações compatíveis com a estrutura molecular de 4-hidróxi-benzaldeído, como pode ser visto pela Tabela 9. O espectro de RMN- ^1H da subfração F5B apresentou um simpleto em δ 9,66 referente a átomo de hidrogênio de grupo aldeído, dois multipletos em δ 7,68 e δ 6,81, integrando para dois cada um dos sinais, representando quatro átomos de hidrogênios aromáticos.

Observou-se o sistema de spin AA'BB' com constantes de acoplamento J_{AB} e $J_{A'B'}$ iguais e com valor de 8,8 Hz indicando acoplamento vicinal. Esse padrão de acoplamento AA'BB' é facilmente reconhecido devido à sua simetria, o que indica um anel benzênico *p*-dissubstituído.

Pelo espectro COSY (^1H - ^1H) foi possível observar as correlações dos hidrogênios em δ 7,68 e δ 6,81 do anel aromático. No espectro HMBC (^1H - ^{13}C a longa distância), foi possível observar carbonos em 133 e 128 ppm pertencentes ao anel aromático, em 164 ppm característico de carbono aromático funcionalizado com grupo hidroxila e em 192 ppm, correspondente à função aldeído.

Tabela 9 – Estrutura molecular do composto 4-hidróxi-benzaldeído e sua equivalência com os dados espectrais de RMN da subfração F5B do extrato de *A. alternata*

|  | Posição | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H}$ | HMBC | COSY |
|---|---------|----------------------------|--------------------|------------|------|
| | | (100MHz, MeOD) | (400MHz, MeOD) | | |
| 1 | 128 | - | - | - | |
| 2,6 | 133 | 7,68(d, $J=8,8\text{Hz}$) | 133, 164, 192 | 6,81 | |
| 3,5 | 116 | 6,81(d, $J=8,8\text{Hz}$) | 116, 128 | 9,66, 7,68 | |
| 4 | 164 | - | - | - | |
| 7 | 192 | 9,66 (s) | 133, 128 | 6,81 | |

Fonte: DO AUTOR, 2016.

Os deslocamentos químicos encontrados na subfração F5B coincidem com aqueles para 4-hidróxi-benzaldeído já relatados na literatura, como pode ser comparado na Tabela 10.

Tabela 10 – Comparação entre os deslocamentos químicos da subfração F5B do extrato de *A. alternata* com os publicados para 4-hidróxi-benzaldeído por Lee et al. (2010).

| Posição | δ ¹ H em MeOD | | δ ¹³ C em MeOD | |
|--------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| | F5B (400 MHz) | Lee et al. (500 MHz) | F5B (100 MHz) | Lee et al. (125 MHz) |
| 1 | - | - | 128 | 129,1 |
| 2 e 6 | 7,68 (d, <i>J</i> =8,8 Hz) | 7,77 (d, <i>J</i> =8,7 Hz) | 133 | 132,3 |
| 3 e 5 | 6,81 (d, <i>J</i> =8,8 Hz) | 6,93 (d, <i>J</i> =8,7 Hz) | 116 | 115,7 |
| 4 | - | - | 164 | 164,1 |
| 7 | 9,66 (s) | - | 192 | 191,6 |

Fonte: LEE et al., 2010; DO AUTOR, 2016.

O composto 4-hidróxi-benzaldeído já foi isolado como metabólito de *Pestalotiopsis vaccinni* (ZHOU et al., 2014), *Diaporthe gulyae* (ANDOLFI et al., 2015), *Aspergillus similanensis* (PROMPANYA et al., 2014), *Dothideomycete* sp. (HEWAGE et al., 2014) e *Phoma exigua* var. *exigua* (EVIDENTE et al., 2011). Num estudo com metabólitos do fungo não endofítico *Phellinus igniarius*, 4-hidróxi-benzaldeído foi proposto como um precursor metabólico de furo[3,2-*c*]pirano-4-ona, feligrídina C (MO et al., 2004). O mesmo aldeído também foi relatado como precursor de ácido *p*-hidroxibenzoico (SIRCAR e MITRA, 2009).

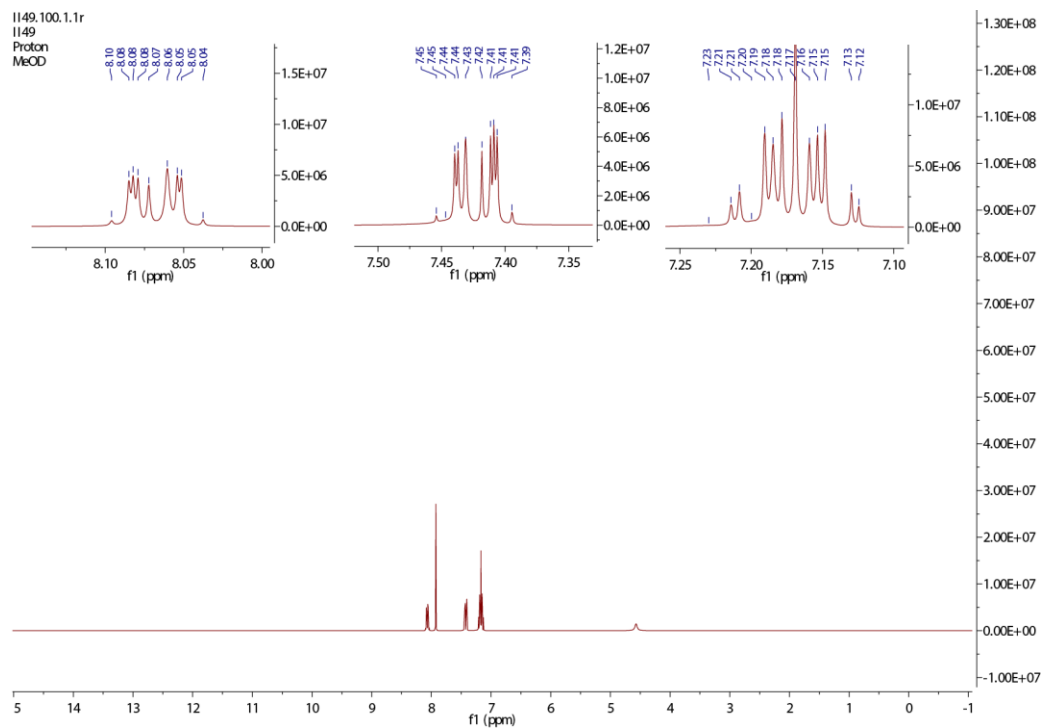
De acordo com relatos na literatura, 4-hidróxi-benzaldeído não inibiu o crescimento de *S. aureus* (XU et al., 2011) e nem a proliferação de células A549 e HepG2 (LI et al., 2015). Esse composto a 50 μ M não inibiu significativamente a viabilidade de células tumorais de ascite de Ehrlich. Mas, exerceu notório efeito sinérgico sobre outros compostos isolados de *Aloe ferox*, os quais, separadamente, também não reduziram apreciavelmente a viabilidade das células mencionadas (KAMETANI et al., 2007). Portanto, pode ser que 4-hidróxi-benzaldeído tenha contribuído para a redução da viabilidade celular observada, entretanto, provavelmente outros compostos estão envolvidos na manifestação dessa bioatividade.

4.7.2 De *Lasiodiplodia* sp.

A purificação de parte da fração P7, por CLAE semi-preparativa, permitiu a obtenção de um sólido branco, com massa igual a 3,9 mg. Desse composto obteve-se o espectro de RMN de hidrogênio, representado na Figura 21. Os deslocamentos químicos indicam tratar-se de um composto aromático. Há presença de substituintes, pois são observados 4 ambientes

magneticamente diferentes de hidrogênios aromáticos. Não há indícios de cadeia alifática. Não foi possível identificar o composto com os dados disponíveis até o momento.

Figura 21 – Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, MeOD) do composto isolado da fração P7 do extrato de *Lasiodiplodia* sp.



Fonte: DO AUTOR, 2016.

5 CONCLUSÃO

Os fungos endofíticos *Alternaria alternata* e *Lasiodiplodia* sp. isolados de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC) Mattos, submetidos a fermentação em meio líquido, produziram metabólitos que, parcialmente associados entre si, exerceram relevante atividade biológica. Os extratos provenientes de tais fermentações reduziram significativamente a viabilidade de linhagens celulares derivadas de câncer humano de mama (MCF-7) e fígado (HepG2), no caso de *Lasiodiplodia* sp., e, além das mencionadas anteriormente, o extrato de *A. alternata* também foi ativo contra as células A549, referentes a carcinoma de pulmão. Os extratos obtidos também exibiram discreta atividade antimicrobiana.

O promissor desempenho dos extratos obtidos estimulam a identificação estrutural de seus componentes e a avaliação dos compostos isolados frente a viabilidade das mencionadas linhagens de células tumorais. Caso as substâncias isoladas também manifestem a atividade biológica, é interessante aprofundar os estudos no sentido de se elucidar o mecanismo de ação. A citotoxicidade de tais compostos também deve ser avaliada frente a células normais para se verificar a viabilidade de se iniciarem estudos *in vivo*.

Uma vez conhecidos os compostos bioativos, desde que sejam estruturas inéditas, surgem duas novas perspectivas. A primeira delas seria o estudo de sua rota biossintética, a fim de se otimizar sua produção pela variação das condições de fermentação dos fungos. A segunda possibilidade seria a modificação estrutural visando o incremento de bioatividade, o aumento de biodisponibilidade e/ou a redução de efeitos adversos.

Cabe ressaltar também, que considerando que apenas três fungos endofíticos foram testados frente a viabilidade das células tumorais e dois exibiram resultados relevantes, as demais 145 cepas isoladas também precisam ser investigadas quanto a esse aspecto.

Conclui-se, portanto, que os resultados encontrados no presente trabalho demonstraram indubitavelmente a importância dos estudos de prospecção de compostos bioativos no produto de fermentação de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus impetiginosus* e abriram frente para a realização de diversas investigações posteriores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALY, A. H. et al. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 6, p. 972-980, 2008.

ALY, A. H.; DEBBAD, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.

ANDOLFI, A. et al. Lasiojasmonates A-C, three jasmonic acid esters produced by *Lasiodiplodia* sp., a grapevine pathogen. **Phytochemistry**, v.103, p.145-153, 2014.

ARAÚJO, W. L. et al. (Coord.). **Guia prático: isolamento e caracterização de micro-organismos endofíticos**. Piracicaba, Calo, 2010.

AWALE, S. et al. Nitric oxide (NO) production inhibitory constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 53, n. 6, p. 710-713, 2005.

BARLTROP, J. A. et al. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, n. 11, p. 611-614, 1991.

BÖHLER, T. et al. *Tabebuia avellanedae* extracts inhibit IL-2-independent T-lymphocyte activation and proliferation. **Transplant Immunology**, v. 18, n. 4, p. 319-323, 2008.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

CARDOSO, M. F. C. et al. A new approach for the synthesis of 3-substituted cytotoxic nor- β -lapachones. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 12-16, 2013.

CASTELLANOS, J. R. G.; PRIETO, J. M.; HEINRICH, M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) – A global ethnopharmacological commodity? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 1-13, 2009.

CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. Disponível em: <<http://www.cbs.knaw.nl/>> . Acesso em: 10 nov. 2015.

CHAGAS, F. O.; DIAS, L. G.; PUPO, M. T. A mixed culture of endophytic fungi increases production of antifungal polyketides. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 10, p. 1335-1342, 2013.

CHEN, S. et al. β -resorcylic acid derivatives with α -glucosidase inhibitory activity from *Lasiodiplodia* sp. ZJ-HQ1, an endophytic fungus in the medicinal plant *Acanthus ilicifolius*. **Phytochemistry Letters**, v. 13, p. 141-146, 2015.

CHOI, W. H. et al. Ethanolic extract of Taheebo attenuates increase in body weight and fatty liver in mice fed a high-fat diet. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16013-16023, 2014.

CHRISTENSEN, M. J.; BENNETT, R. J.; SCHMID, J. Growth of *Epichloë/Neotyphodium*, and p-endophytes in leaves of *Lolium* and *Festuca* grasses. **Mycological Research**, v. 106, n. 1, p. 93-106, 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute. **M7-A6**: metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. 6. ed. Brasília, 2003. 53 p

COELHO, J. M. et al. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

DA SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

DAL BELLO, G. et al. First report of *Alternaria alternata* causing black spot on pink lapacho (*Handroanthus impetiginosus*). **Australasian Plant Disease Notes**, v. 10, n. 1, p. 1-2, 2015.

DE ANGELIS, D. A. Identificação de fungo filamentoso endofítico isolado (CPQBA 1114/15). Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2015a. Relatório Técnico.

DE ANGELIS, D. A. Identificação de fungo filamentoso endofítico isolado (CPQBA 1222/15). Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2015b. Relatório Técnico.

DE MELO, J. G. et al. Antiproliferative activity, antioxidant capacity and tannin content in plants of semi-arid northeastern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8534-8542, 2010.

DE MONTMORENCY, A. **South american cancer cure**. Washington, DC: The Spotlight, 1981 apud CASTELLANOS, J. R. G.; PRIETO, J. M.; HEINRICH, M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*) – A global ethnopharmacological commodity? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 1, p. 1-13, 2009.

DE MOURA, K. C. G. et al. Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 12, n. 3, p. 325-338, 2001.

EVIDENTE, A. et al. Phomachalasin A-D, 26-oxa[16] and [15]cytochalasins produced by *Phoma exigua* var. *exigua*, a potential mycoherbicide for *Cirsium arvense* biocontrol. **Tetrahedron**, v. 67, n. 8, p. 1557-1563, 2011.

FREITAS, A. E. et al. Antidepressant-like action of the bark ethanolic extract from *Tabebuia avellanedae* in the olfactory bulbectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 3, p. 737-745, 2013.

GARYALI, S.; KUMAR, A.; REDDY, S. Enhancement of taxol production from endophytic fungus *Fusarium redolens*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 5, p. 908-915, 2014.

GE, H. M. et al. Bioactive alkaloids from the plant endophytic fungus *Aspergillus terreus*. **Planta Medica**, v. 76, n. 8, p. 822-824, 2010.

GERMAINE, K. et al. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 1, p. 109-118, 2004.

GRAZZIOTIN, J. D. et al. Phytochemical and analgesic investigation of *Tabebuia chrysotricha*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 3, p. 249-251, 1992.

GREVE, H.; PONTIUS, A.; GROSS, H. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 4, p. 537-545, 2010.

GROTHAUS, P. G.; CRAG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plant natural products in anticancer drug discovery. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 16, p. 1781-1791, 2010.

HERRE, E. A. et al. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 2, p. 49-53, 1999.

HEWAGE, R. et al. One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. **Phytochemistry**, v. 108, p. 87-94, 2014.

ICHIKAWA, T. et al. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and protroph method. **Folia Microbiologica**, v. 16, n. 3, p. 218-224, 1971.

KAMETANI, S. et al. Chemical constituents of cape aloe and their synergistic growth-inhibiting effect on Ehrlich Ascites tumor cells. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 5, p. 1220-1229, 2007.

KIM, J. H. et al. Melanogenesis inhibition of β -lapachone, a natural product from *Tabebuia avellanedae*, with effective in vivo lightening potency. **Archives of Dermatological Research**, v. 307, n. 3, p. 229-238, 2015.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

LEE, S. Y. et al. A new phenylpropane glycoside from the rizome of *Sparganium stoloniferum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 4, p. 515-521, 2010.

LI, E. et al. Pestaloths A-D, bioactive metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis theae*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 4, p. 664-668, 2008.

LI, X.-B. et al. Identification and biological evaluation of secondary metabolites from the endolichenic fungus *Aspergillus versicolor*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 12, n. 4, p. 575-592, 2015.

MARTINEZ-LUIS, S. et al. Antileishmanial constituents of the Panamanian endophytic fungus *Edenia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 12, p. 2011-2014, 2008.

MATSUMOTO, M.; NAGO, H. (R)-2-octeno-8-lactone and other volatiles produced by *Lasiodiplodia theobromae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 7, p. 1262-1266, 1994.

MO, S. et al. Phelligradins C-F: cytotoxic pyrano[4,3-c][2]benzopyran-1,6-dione and furo[3,2-c]pyran-4-one derivatives from the fungus *Phellinus igniarius*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 823-828, 2004.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MÜLLER, K. et al. Potential antipsoriatic agents: lapacho compounds as potent inhibitors of HaCat cell growth. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 8, p. 1134-1136, 1999.

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

PARK, B. S. et al. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1152-1157, 2005.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2013.

PEREIRA, I. T. et al. Antiulcer effect of bark extract of *Tabebuia avellanedae*: activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 7, p. 1067-1073, 2013.

PROMPANYA, C. et al. Gulpyrones A and B and phomentrioloxins B and C produced by *Diaporthe gulyae*, a potential mycoherbicide for saffron thistle (*Carthamus lanatus*). **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 4, p. 623-629, 2015.

RAEDER, J.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 17-20, 1985.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: Williams and Wilkin, 1965.

ROYAL BOTANIC GARDENS. KEW AND MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **The Plant List**. Disponível em: <www.theplantlist.org/tlp1.1/record/kew-317146>. Acesso em 08 jan. 2016.

SADANANDA, T. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of anticancer agent (lapachol). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 16, p. 3643-3652, 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SIRCAR, D.; MITRA, A. Accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota* 2: confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n.13, p. 1370-1380, 2009.

STIERLE, A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 6, p. 535-544, 2003.

SUN, Z.-L. et al. Antifungal and cytotoxic activities of the secondary metabolites from endophytic fungus *Massrisson* sp. **Phytomedicine**, v. 18, n. 10, p. 859-862, 2011.

SUO, M. et al. Anti-inflammatory constituents from *Tabebuia avellanedae*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 8, p. 1484-1488, 2012.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TEIXEIRA, T. L. et al. Potential therapeutic use of herbal extracts in trypanosomiasis. **Pathogens and Global Health**, v. 108, n. 1, p. 30-36, 2014.

THOMPSON, J. D. et al. Improving the sensitivity of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

VENTURA, S. P. M. et al. Simple screening method to identify toxic/non toxic ionic liquids: Agar diffusion test adaptation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 83, p. 55-62, 2012.

WAGNER, H. et al. Structure determination of new isomeric naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-diones from *Tabebuia avellanedae* by the selective-INEPT Technique. **Helvetica Chimica Acta**, v. 72, n. 4, p. 659-667, 1989.

WANG, F.-W. et al. Benzophenones from *Guignardia* sp. IFB-E028, an endophyte on *Hopea hainanensis*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 216-220, 2010.

WEYENS, N. et al. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 248-254, 2009.

WHITE, F. J. Jr.; TORRES, M. S. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection? **Physiologia Plantarum**, v. 138, n.4, p. 440-446, 2010.

XU, J. et al. β -lapachona ameliorization of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 254, n. 1-2, p. 46-54, 2013.

XU, J. et al. Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. **Tetrahedron Letters**, v. 52, n. 1, p. 21-25, 2011.

YAMASHITA, M. et al. Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. **Biorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 17, p. 6286-6291, 2009.

ZHANG, L. et al. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia avellanedae* induce cell cycle arrest and apoptosis in the human non-small cell lung cancer cell line A549. **Phytochemistry Letters**, v. 11, p. 9-17, 2015.

ZHOU, X. et al. A new aromatic amine from fungus *Pestalotiopsis vaccinii*. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 35-37, 2014.