

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de
Combretum leprosum do bioma Caatinga**

Suikinai Nobre Santos

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de Concentração:
Microbiologia Agrícola**

**Piracicaba
2012**

Suikinai Nobre Santos
Bacharel em Ciências Biológicas

Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Combretum leprosum* do bioma Caatinga

Orientador:
Prof. Dr. **ITAMAR SOARES DE MELO**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de Concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Santos, Suikinai Nobre
Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Combretum leprosum* do bioma Caatinga / Suikinai Nobre Santos. - - Piracicaba, 2012.
182 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. *Aspergillus oryzae* 2. Atividade antitumoral 3. Bioprospecção 4. Caatinga
5. *Combretum leprosum* 6. Metabólitos secundários 7. Micro-organismos endofíticos
I. Título

CDD 589.2
S237b

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

Aos meus pais, Albérico e Neudes, que me deram força e sempre me apoiaram nas minhas escolhas, acreditando em meus sonhos, investindo em minha educação sem olhar para dificuldades.

Vivendo sempre na fé.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais essa benção concedida, pelo seu inexplicável amor, chave e motivação para a luta por um mundo melhor, pela relação harmônica entre os homens e dos homens com a natureza;

Aos meus pais, Albérico e Neudes, pelo amor, dedicação, empenho e inexplicável esforço concedidos para a realização de meus objetivos e sonhos; ao meu irmão, Thalisson e a toda minha família pelas orações, apoio, cuidado e dedicação em especial;

Ao meu orientador prof. Dr. Itamar Soares de Melo pela oportunidade, sugestões, confiança, por me proporcionar tamanha experiência, e empenho para realização dos meus objetivos acadêmicos;

A Embrapa Meio Ambiente pela infraestrutura para realização dos trabalhos e coletas;

A Universidade de São Paulo e ao CNPq pelo apoio financeiro;

A todos os colegas, funcionários e amigos que me auxiliaram na concretização deste trabalho, que não deixa de ser o resultado de nosso esforço coletivo, em especial:

À Dra. Sonia Queiroz, pelo total apoio, parceria nas elucidações das estruturas em EUA e total suporte e me fazer parte de sua família no período que estive na USA;

À Dra. Rita Moraes pela receptividade, oportunidade e viabilizados a minha estadia, possibilitado meu primeiro contato com o grupo de pesquisa da USDA, além de me permitir fazer parte de sua família neste período;

À Dra. Shirlei Scramin pelo apoio, presença e total apoio durante este período;

Ao Prof. Dr. Fernando Diní Andreote pelo apoio inicial, correções, conversas e paciência no trajeto e construção deste trabalho;

A minha little family em Piracicaba: Armando, Fábio (Díg), Fer, Cris e Danice.

Ao grupo de pesquisa do LMA (Laboratório de Microbiologia Ambiental) e minha família que considero muito mais que amigos em todos esses anos de doutorado: Vanessa, Lu Ávila, Wallace, Leonardo (irmãos de coração), Mirian, Milena, Rafael, Rodrigo e Natalia Taketani, Rodrigo Mendes, Ana, Ale Sereida, Michelli, Zaiane, Regiane, Cassiano, Alexandre tiozinho;

Aos técnicos pela paciência, apoio e longas conversas, Roseli, Marcia, Elke, Tati e João Luiz (parceiro nas coletas);

Ao LPN: em especial ao Rodrigo Castanha (pelas conversas, risadas, apoio, parceria), Lilian Salgado;

Ao Laboratório de Resíduos: Dra. Vera Ferracini, Marcia Assalim, Debora, Marlei, Marica Godoi;

Ao Laboratório de Pesquisa do Timo: Dr. Wilson Savino, pela oportunidade e disponibilidade de uso da infraestrutura inicial da cultura de células, Desio pela paciência e curso de cultura de tecidos, agradeço por iniciar os meus primeiros passos em manipular cultivo celular; aos colegas e amigos Luiz (cunhadinho), Marina, Lulu, Klaísa, Eduardo, Ailin, Flavia, Ariane.;

Ao Laboratório de pesquisa em Química de Produtos Naturais: Dra. Graça Henrique pela oportunidade, apoio, disponibilidade de infraestrutura, fundamentais no desenvolvimento do trabalho, aos meus amigos Fausto Ferraris pela paciência, dedicação, apoio e supervisão, Mateus, Raquel, Fernando, Joana, Xuxu, Daniela, Marta, Tatiana, Giseli;

Ao grupo de pesquisa da USDA: Dr. Steve Duke e Dra Agnes pela oportunidade de estágio, apoio, infraestrutura para concretização da última etapa deste trabalho e pela indescritível experiência de trabalhar e aprender neste centro de pesquisa, além do Dr. Cantrell pelo apoio e sempre disponível para tirar minhas dúvidas. Aos técnicos: Glória que com grande coração sempre me auxiliando e supervisionado, Solomon, Amber e Limin, sem os quais não conseguiria;

Embrapa Semiárido, Parque Nacional da Capivara, Parque Nacional Vale dos Dinosaurios, Estação Ecológica do Seridó; pela colaboração apoio e autorização para coletas das espécies nesta áreas preservadas;

Aos amigos companheiros de risadas, fastfoods e boas conversas, responsáveis por momentos de descontração: Guta, Livia, Leandro Tomio (por martelar minhas primeiras amostras), Adriana;

Ao casal Deborah Leite e Luiz Ricardo Berbet pelas inúmeras vezes que me acolherem, pelo cuidado, apoio, momentos indescritíveis braço forte, abrigo seguro, que Deus os abençoe abundantemente, o meu muito obrigado;

Aos meus amigos que mesmo longe pela distância sempre estiveram torcendo por mim: Patrícia, Deb, Paulo Ricardo, Loise, Carol, Gege, Marcel, Aline, Rose, Maira, Prof. Aurea e Porf Eloí, Ana Caroline, Sandra, Prys, Elinalva, Alice, Fredi, Iraildes;

A meus amigos e Homemate nos Estados Unidos: Daniela, Mateus, Luiz Henrique, Rafaele, Irma Bartolo, Cristina, Não, Michi, Noame, Yechalda;

Enfim a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, meu MUITO OBRIGADO por me mostrarem que “Eu suportaria perder todos os meus amores, mas morreria se perdesse todos os meus amigos.”

Vinicius de Moraes.

“Jovens, cientistas do futuro, não se deixem esmorecer pela barreira do ceticismo, nem desanimar pela tristeza de certos momentos que caem sobre uma nação. Não se enraiveçam com seus oponentes, porque nenhuma teoria científica foi aceita sem oposição. Habitem a paz serena das bibliotecas e laboratórios. Digam para si mesmos, primeiro: - O que fiz por minha instrução?’ E à medida que avançarem: ‘- O que estou realizando?’ Até chegar o momento em que possam sentir a imensa felicidade de pensar que contribuíram, de alguma forma, para o progresso e bem-estar da Humanidade. “ Louis Pasteur

“O profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos! Porque quem compreendeu a mente do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro? Ou quem lhe deu primeiro a ele, para que lhe seja recompensado? Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas, a Ele eternamente” Romanos 11.33-34

SUMÁRIO

RESUMO.....	17
ABSTRACT	19
LISTA DE FIGURAS	21
LISTA DE TABELAS	25
1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos Principais	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
3.1 Semiárido: Bioma Caatinga.....	31
3.2 Metabolismo secundário, produtos naturais, bioprospecção.....	36
3.3 Família Combretaceae	38
3.3.1 <i>Combretum leprosum</i>	40
3.4 Estilbenos: fontes de biomoléculas de interesse.....	42
3.5 Diversidade funcional e química dos metabólitos secundários microbiano.....	45
3.6 Micro-organismos endofíticos.....	47
3.6.1 Diversidade de micro-organismo endofíticos.....	50
3.6.2 Importâncias do estudo de micro-organismos endofíticos.....	51
3.7 Técnicas para obtenção de metabólitos microbianos e para seleção de substâncias bioativas	54
3.8 Identificação do composto alvo	56
Referências	57
4 <i>Combretum leprosum</i> : DETERMINAÇÃO DA POSSÍVEL PRODUÇÃO DE COMBRETASTATIN CA4 E AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO POTENCIAL DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS	69
Resumo.....	69
Abstract.....	70
4.1 Introdução	70
4.2 Material e Métodos.....	71
4.2.1 Área de coleta	71

4.2.2. Estudo químico e biológico de metabólitos secundários vegetais do <i>Combretum leprosum</i> do semiárido brasileiro	72
4.2.3. Avaliação da atividade antitumoral dos extratos vegetais.....	74
4.2.4 Avaliação do potencial antimicrobiana.....	75
4.2.4.1 Os micro-organismos testes:	75
4.2.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos vegetais de <i>C. leprosum</i>	75
4.3 Resultados e Discussão	76
4.3.1 Estudo fitoquímico dos metabólitos de <i>C. leprosum</i> quanto a presença da Combretastatin A4.....	76
4.3.2 Atividade antitumoral dos metabólitos vegetais de <i>C. leprosum</i>	78
4.3.3 Atividade antimicrobiana dos metabólitos vegetais de <i>C. leprosum</i>	80
Referências.....	83
5 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFITICOS DE <i>Combretum leprosum</i> E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	87
Resumo	87
Abstract.....	87
5.1 Introdução.....	88
5.2 Material e Métodos	90
5.2.1 Área de coleta.....	90
5.2.2 Isolamento e preservação dos micro-organismos endofíticos	90
5.2.3 Frequência de isolamento.....	91
5.2.4 Seleção dos micro-organismos com biomoléculas ativas.....	92
5.2.4.1 Avaliação da atividade contra linhagens fitopatogênicas.....	92
5.2.4.2 Obtenção dos metabolitos secundários: cultivo, filtração e obtenção dos extratos brutos das linhagens selecionadas	93
5.2.4.3 Avaliação do potencial antimicrobiana.....	94
5.2.4.3.1 Os micro-organismos testes:	94
5.2.4.3.2 Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos.....	94
5.3 Resultados e Discussão	95
5.3.1 Taxa de colonização	95
5.3.2 Triagem para seleção de fungos endofíticos produtores de metabólitos.....	98
5.3.2.1 Avaliação da atividade contra linhagens fitopatogênicas.....	98

5.3.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos fúngicos.....	99
5.3.4 Detecção da presença de Combretastatin A4 (CA4) nos extratos fúngicos ...	105
Referências	106
6 ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA, ATIMICOBACTERINA E ANTIOXIDANTE DOS METABÓLITOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE <i>Combretum leprosum</i>	111
Resumo.....	111
Abstract.....	112
6.1 Introdução	112
6.2 Material e Métodos.....	114
6.2.1 Obtenção dos metabolitos secundários: cultivo, filtração e obtenção dos extratos brutos das linhagens selecionadas.....	115
6.2.2 Avaliação da atividade biológica dos extratos orgânicos.....	116
6.2.2.1 Atividade antimicobacteriana <i>in vitro</i>	116
6.2.2.2 Determinação da Atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH.....	117
6.2.2.3 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais <i>in vitro</i>	119
6.3 Resultados e Discussão.....	121
6.3.1 Atividade antimicobacteriana.....	122
6.3.2 Atividade antioxidante	123
6.3.3 Atividade antitumoral.....	127
Referências	132
7 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS PELO FUNGO ENDOFÍTICO <i>Aspergillus oryzae</i> (CFE108).....	137
Resumo.....	137
Abstract.....	137
7.1 Introdução	138
7.2 Material e Métodos.....	140
7.2.1 Obtenção dos metabolitos secundários: cultivo, filtração e obtenção dos extratos brutos da linhagem CFE108.....	140
7.2.2 Biomonitoramento do extrato em potencial para produção de biomoléculas antitumorais.....	141

7.2.2.1 Avaliação do efeito de transformação morfológica em células T.END1	143
7.2.3 Isolamento, Purificação e Elucidação química dos compostos presente no extrato bruto responsável pelas atividades biológicas	143
7.2.3.1 Instrumentos	144
7.2.3.1.1 UV; Infravermelho	144
7.2.3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear	144
7.2.3.1.3 LC-MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas	144
7.2.3.1.4 CG-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ..	144
7.2.4 Modificação molecular por reação de metilação do composto isolado	145
7.3 Resultados e Discussão	145
7.3.1 Fracionamento guiado pela bioatividade dos compostos	145
7.3.1.1 Atividade antimicrobiana	146
7.3.1.2 Atividade antioxidante	147
7.3.1.3 Atividade citotóxica em linhagens celulares cancerígenas	148
7.3.1.4 Avaliação da transformação morfológica	149
7.3.2 Isolamento, purificação e elucidação estrutural dos metabólitos fúngicos	151
7.3.3 Identificação e elucidação química do composto SS-XL-32-1	152
7.3.3.1 Avaliação citotóxica do composto SS-XL-32-1 em linhagens cancerígenas HeLa e K562	154
7.3.3.2 Modificação estrutural do composto SS-XL-32-1	156
7.3.4 Isolamento do composto SS-XL-20-1	158
Referências	161
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	167
ANEXOS	169

RESUMO

Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Combretum leprosum* do bioma Caatinga

Os micro-organismos que habitam o interior das plantas (endofíticos ou endófitos) tornaram-se foco de interesse por estarem envolvidos na produção de compostos químicos como enzimas, alcalóides, antibióticos, anticancerígenas e diferentes metabólitos. Os ecossistemas de regiões tropicais tem sido alvo de busca de compostos naturais por causa da riqueza de espécies e nichos ecológicos presentes nestas comunidades. O objetivo deste trabalho o isolamento, identificação e a bioprospecção de fungos endofíticos obtidos de *Combretum leprosum* e a detecção nos extratos de planta e micro-organismos da presença do composto combretastatin (CA4). Folhas, galhos, frutos e raízes de *C. leprosum* foram coletados de cinco estados dentro da zona de semiárido brasileiro: Bahia, Piauí, Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte. Partes das amostras foram triturados e submetidos à maceração primeiramente em diclorometano, seguidos de tetrahydrofurano e acetona de acordo com Pettit et al.(1987) para possível extração da CA4. Além disso, para avaliação *in vitro* da atividade citotóxica e antimicrobiana foram realizadas extrações em acetato de etila, clorofórmio e metanol. Foram detectados a possível presença da CA4 em todos os órgãos das plantas extraídos com tetrahydrofurano e as maiores concentrações foram observadas nas folhas. A atividade antitumoral dos extratos vegetais apresentaram as maiores inibições contra carcinoma (ovário IC₅₀ 10µg/mL⁻¹, rim IC₅₀ 8,7µg/mL⁻¹ e mama IC₅₀ 14,1µg/mL⁻¹) e glioma. IC₅₀ 13,5µg/mL⁻¹. A outra parte das amostras (folhas, caules e raízes) foram desinfetadas, fragmentadas e colocadas em meios de cultivo (Martin, BDA, Agar água) por 60 dias, 28°C. Foram isolados 405 fungos endofíticos e 159 apresentaram atividade contra fitopatogênicos, 72% para *Rhizoctonia solani* e 28% para *Pythium aphanidermatum*. As vinte e três linhagens que apresentaram as melhores atividades antifitopatogênicas foram submetidas a crescimento em Czapek em cultura estacionaria, por 30 dias, a 28°C, os respectivos metabólitos foram obtidos em múltiplo (3.0 e 11.0) e avaliados a atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e fungos. Quatro linhagens foram selecionadas, identificadas pelo sequenciamento da região 18S, CFE177 como *Fusarium oxysporum*, CFE03 como *Hypocrea koningii*, linhagem CFE108 como *Aspegillus oryzae* e CFE391 como *Fusarium solani* e avaliadas *in vitro* pelos testes biológicos: atividade antitumoral, antioxidante e antimicobactéria. Os compostos produzidos por *A. oryzae* CFE108 apresentaram potencial para bioprospecção, e de acordo com as atividade citotóxicas as maiores ações foram contra as linhagens linfoma histiocística (J744), mieloma murino (B16F10) e baixa citotóxicidade para carcinoma de bexiga (ECV304) e leucemia eritroblástica humana (k562) na concentração de 1mg/mL⁻¹. Foram isolados dois compostos: SS-XL-32-01 identificado como bis-(2-etilhexil) ftalato (DEHP) e SS-XL-20-1 identificado como fenol, 2.2 metilenobis[6-(1,1-dimetiletil)-4-etil], ambos com atividade anticâncer para células HeLa com percentual de ate 98% e 71%, de morte, respectivamente. Além disso, a modificação através da reação de metilação do composto SS-XL-32-1 resultou na quebra do anel aromático, formação de 4 subprodutos e perda da atividade, sendo um indicativo do sitio ativo da molécula responsável pela atividade observada. Portanto, fungos endofíticos de

plantas do semiárido brasileiro podem ser considerados fonte de bioprospecção para novas moléculas bioativas com atividade antitumoral.

Palavras-chave: Semiárido; Caatinga; *Combretum leprosum*; Fungos endofíticos; Bioprospecção; *Aspergillus oryzae*; Atividade antitumoral; Metabólito secundário

ABSTRACT

Bioprospection of biomolecule isolated from endophytic fungal of *Combretum leprosum* from Caatinga biome

The micro-organisms that reside in the aerial tissues and roots of plants (endophytic or endophyte) became the focus of interest for being involved in the chemical production such as enzymes, alkaloids, antibiotics, anticancer and different metabolites. The ecosystems of tropical region have been targeted search of natural compounds because of the richness of species and ecological niches present in these communities. The aim of this work was the isolation, identification and bioprospection for endophytic fungi from *Combretum leprosum* and detection in extracts of the plant and micro-organisms for the presence of the combretastatin (CA4). Leaves, stems, fruits and roots of *C. leprosum* were collected from five states within the semi-arid zone of Brazil: Bahia, Piaui, Ceara, Paraiba, Rio Grande do Norte. Part of the samples were crushed and subjected to maceration in dichloromethane, followed by tetrahydrofuran and acetone according to Pettit et al. (1987) for extracting the possible CA4. Moreover, for *in vitro* evaluation of the cytotoxic and antimicrobial activity extractions were carried out in ethyl acetate, chloroform and methanol. Were detected the possible presence of CA4 all plant organs extracted with tetrahydrofuran and the highest concentrations were observed on the leaves. The antitumor activity of plant extracts showed the highest inhibition against carcinoma (ovary IC₅₀ 10µg/mL⁻¹, kidney IC₅₀ 8.7 µg/mL⁻¹ and breast IC₅₀ 14.1 µg/mL⁻¹) glioma IC₅₀ and 13.5 mg-/mL⁻¹. The other part of the samples (leaves, stems and roots) were disinfected, fragmented and placed in culture media (Martin, PDA, water agar) for 60 days, 28°C. 405 Endophytic fungi were isolated and 159 showed activity against phytopathogenic, 72% for *Rhizoctonia solani* and 28% for *Pythium aphanidermatum*. Twenty-three strains that showed good activities antiphytopathogenic, were grow on medium Czapek in static culture, for 30 days at 28°C, the respective metabolites were obtained in multiples pH (3.0 and 11.0) and evaluated the antimicrobial activity against pathogenic bacteria and fungi. Four strains were selected, identified by sequencing the 18S region, CFE177 as *Fusarium oxysporum*, CFE03 as *Hypocrea koningii*, strain CFE108 as *Aspegillus oryzae* and CFE391 *Fusarium solani*, and evaluated by *in vitro* biological tests: antitumor, antioxidant and antimicobactérium activity. The compounds produced by *A. oryzae* CFE108 had biological potential and in accordance with the cytotoxic activity, showed the highest activities against lymphoma lines (J744), murine myeloma (B16F10) and low cytotoxicity for carcinoma of the bladder (ECV304) and leukemia erythroblastic human (K562) in 1mg/mL⁻¹ concentration. Two compounds were isolated: SS-XL-32-01 identified as bis-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), and SS-XL-20-1 as phenol 2.2methylenobis [6-(1,1-dimethylethyl) - 4-ethyl], both with anticancer activity for HeLa cells with a percentage of up to 98% and 71%, of death, respectively. In addition, modified by methylation reaction of the compound SS-XL-32-1 resulted in the breaking of the aromatic ring and result in formation of four product and loss of activity being indicative of the active site of the molecule can be the aromatic ring. Therefore, endophytic fungi in semiarid Brazil plant can be considered a source of bioprospection for new bioactive molecules with anticancer activity.

Keywords: Semiarid; Caatinga; *Combretum leprosum*; Endophytic fungi; Bioprospection; *Aspergillus oryzae*; Antitumor activity; Secondary metabolite

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Localização da zona de semiárido no Brasil. Mapa do nordeste apresentando as ecoregiões do bioma caatinga (SANTOS et al., 2010)	32
Figura 3.2 - Regiões de ambiente de caatinga do semiárido brasileiro no período chuvoso e seca de diferentes ambientes. (Fotografadas por Suikinai Nobre Santos, abril e novembro de 2010)	34
Figura 3.3 - Mapa de áreas prioritárias de conservação e estudo científico para conservação da caatinga, as áreas em vermelhos seis são consideradas áreas de importância biológica extrema e com alto padrão de antropização	36
Figura 3.4 - Representação esquemática dos procedimentos globais para bioprospecção de produtos naturais (Adaptado, BERDY 2005).....	37
Figura 3.5 - Cladograma demonstrando as afinidades entre as subfamílias, tribos e gêneros da família Combretaceae (TAN 2002).	39
Figura 3.6 - <i>Combretum leprosum</i> , (A) época chuvosa, (B) época seca com perda de folhas, (C, D) fruto verde na época chuvosa, (E, F) flor e inflorescência, (G, H e I) fruto época seca. (Fotografias por Suikinai Nobre Santos, 2010).	41
Figura 3.7 - Estruturas químicas das Combretastatins A1-A5 (SRIVASTAVA et al., 2005)	44
Figura 3.8 - Esquema exemplificando possível mecanismo de colonização desenvolvido por fungos simbiótico endófitos biotrófico (a-e) e patógenicos (f-j) (KOGEL et al., 2006).	48
Figura 3.9 - Compostos Naturais isolados de fungos endofíticos e com ação biológica interessante.....	53
Figura 4.1 - Pontos de coletas selecionados para coleta das espécies de <i>C. leprosum</i> , na região de caatinga do semiárido do nordeste brasileiro.	
Google, 2009.....	72

Figura 4.2 - Fluxograma do processo de extração de <i>Combretum leprosum</i> com a sequencia de solventes utilizados, em crescente polaridade de acordo com a metodologia da USPatente Combretastatin A4 Pettit et al. 1987.....	73
Figura 4.3 - Cromatograma LC-ESI-MS, 1, Padrão da Combretastatin A4, 2) Extrato bruto de folha extraído com THF.	77
Figura 4.4 - Porcentagem de inibição do crescimento celular de linhagens tumorais de acordo com as concentrações em 48 horas.	80
Figura 5.1 - Esquema com as etapas do isolamento dos micro-organismos endofíticos	91
Figura 5.2 - Esquema representativo da atividade antimicrobiana de extratos brutos das linhagens endofíticas contra patógenos bacterianos fúngicos pela técnica de difusão em disco Kirby-Bauer (1960) adaptada.....	95
Figura 5.3 - Gráfico apresentando o número de isolados de acordo as partes das plantas (folha, caule e raiz).....	97
Figura 5.4 - Gráfico apresenta atividade antifúngico dos extratos brutos dos fungos isolados contra fungos fitopatogênicos.....	99
Figura 5.5 - Teste de atividade antifúngica utilizando a técnica de difusão em disco.	99
Figura 6.1 - Esquema representativo do ensaio para atividade antimicobacteriana, método Alamar Blue (COLLINS; FRANZBLAU, 1997) dos extratos diclorometano (pH ácido) das linhagens fúngicas 03a, 108a, 177a e 391a.	117
Figura 6.2 - Esquema representativo do ensaio para atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH* (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) dos extratos diclorometano (pH ácido) das linhagens fúngicas 03a, 108a, 177a e 391a.....	119
Figura 6.3 - Esquema representativo do ensaio para atividade antitumoral pelo método colorimétrico MTT [3-(5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo tetrazolium]	

descrito por Mosman (1983) dos extratos diclorometano(pH ácido) das linhagens fúngicas 03a, 108a, 177a e 391a	121
Figura 6.4 - Representação gráfica da atividade antimicobacteriana dos extratos fúngicos contra <i>M. bovis</i> BCG	122
Figura 6.5 - (A) Efeito da captura dos radicais livre DPPH do extrato bruto de múltiplos pHs de fungos endofíticos de <i>C. leprosum</i> .(B) Determinação da atividade de capturado radical livre pelos padrões Trolox, Quercitina e Rutina	125
Figura 6.6 - Gráficos dos ensaios de citotóxicidade dos extratos brutos fúngicos frente a sete linhagens cancerígenas; construção de dados baseados na viabilidade versus concentrações utilizadas.	129
Figura 7.1 - Esquema da partição do extrato bruto em coluna cromatográfica, utilizando sequencias de solvente em gradiente crescente de polaridade.	142
Figura 7.2 - Gráfico com atividade antioxidante das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto do endofítico <i>A. oryzae</i> CFE108.....	147
Figura 7.3 - Gráficos dos resultados de citotóxicidade das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto da linhagem endofítica <i>Aspergillus oryzae</i> CFE108 e dos fármacos padrões, na concentração de 1mg/mL^{-1} para os extratos e para de $1\mu\text{g/mL}^{-1}$ para as drogas padrão	149
Figura 7.4 - Fotomicroscopia (100 x aumento) do ensaio de transformação morfológica causada pela exposição de células T. End.1 à fração teste, Fr05, a e b controle negativos (meio de cultura com células T.end.1); c) ação da combretastatin CA4; d) ação da pirarrubicina; e, f e g) ação da fração FR05	150
Figura 7.5 - Fluxograma metodológico que expõem os procedimentos utilizados para o isolamento dos compostos SS-XL-32.1 e SS-XI-20-1 a partir do extrato bruto da linhagem endofítica <i>Aspergillus oryzae</i> CFE108 de <i>Combretum leprosum</i>	151
Figura 7.6 - Estrutura do composto isolado da linhagem fúngica <i>Aspergillus oryzae</i> CFE108, bis- (2-ethylhexyl) fthalato.	154

- Figura 7.7 - Gráficos dos resultados de citotóxicidade do composto SS-XL-32-1 obtida da linhagem *Aspergillus oryzae* CFE108 na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ 155
- Figura 7.8 - a) Cromatograma das placas de CCD eluídas pelo sistema de solvente: Hex (23,5%) DCM (75 %) MeOH (0,5%) ácido acético (1%) visualizados através de luz UV (254; 366nm), os “spots” visualizados são as subfrações produto da reação de metilação do composto SS-XL-32-1. b)Espectro de RMN- H^1 dos quatros subprodutos resultantes da reação de metilação utilizando como padrão o espectro de próton do composto original SS-XL-32-1..... 157
- Figura 7.9 - Bioensaio de citotóxicidade dos quatros subprodutos resultantes da reação de metilação utilizando como droga comercial doxorrubicina na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ 158
- Figura 7.10 - Gráficos dos resultados de citotóxicidade do composto SS-XL-20-1 obtida da linhagem *Aspergillus oryzae* CFE108 na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ 159
- Figura 7.11 - Sugestão da estrutura química como composto SS-XL-20-1 fenol, 2,2 methilenobis [6(1,1-dimethylethyl)-4-ethyl 160

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Pontos de coletas do <i>Combretum leprosum</i> na região de caatinga dosemiárido do nordeste brasileiro.	72
Tabela 4.2 - Detecção da presença da Combretastatin A4 nos extratos brutos das partes vegetais de <i>C. leprosum</i> de acordo com os solventes utilizados.	78
Tabela 4.3 - Efeito antitumoral (IC_{50}) dos extratos orgânicos de <i>Combretum leprosum</i> em células neoplásicas em período de incubação de 48 horas.	79
Tabela 4.4 - Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais obtidos de diferentes solvestes extratores de parte aereas de <i>Combretum leprosum</i>	82
Tabela 5.1 - Número total de fungos endofíticos isolados de plantas da espécie <i>Combretum leprosum</i> distribuída na região de caatinga do semiárido do nordeste brasileiro.....	96
Tabela 5.2 - Frequência de fungos endofíticos isolados de folhas, caules e raízes das plantas <i>C. leprosum</i>	97
Tabela 5.3 - Atividade antifúngica de extratos bruto em múltiplos pHs (ácido e básico) de linhagens fúngicas endofíticas isoladas de <i>C. leprosum</i>	101
Tabela 5.4 - Atividade antibacteriana de extratos bruto com múltiplos pHs (ácido e básico) de linhagens fúngicas endofíticas isoladas <i>C. leprosum</i>	103
Tabela 6.1 - Concentração inibitória mínima dos extratos fúngicos contra <i>M. bovis</i> BCG.	122
Tabela 6.2 - Equação da reta usada para calcular EC_{50} da atividade antioxidante de extratos fúngicos endofíticos de <i>C. leprosum</i>	124
Tabela 6.3 - Percentual de redução do DPPH pelos extratos fúngicos utilizados de acordo com as concentrações utilizadas.....	126
Tabela 6.4 - Concentração inibitória IC_{50} dos extratos fúngicos contra linhagens de células cancerígenas.....	128

Tabela 6.5 - Identificação dos fungos endofíticos, segundo o sequenciamento da região 18S rDNA	132
Tabela 7.1 - Reação de metilação para modificação molecular do composto em estudo.....	143
Tabela 7.2 - As frações obtidas da partição do extrato bruto fúngico 108a, com a sequência do sistema de solventes em gradiente crescente de polaridade e as massas moleculares de cada fração obtida.....	146
Tabela 7.3 - Atividade antimicrobiana das frações obtidas do extrato bruto da linhagem endofítica <i>Aspergillus oryzae</i> CFE108.	146
Tabela 7.4 - Atividade antioxidante das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto da linhagem endofítica <i>Aspergillus oryzae</i> CFE108.	147
Tabela 7.5 - ^1H -RMN (CDCl_3) e ^{13}C -NMR dados BRUKER AV400.	153

1 INTRODUÇÃO

Por milhares de anos a diversidade genética tem sido fonte de fármacos, e um número expressivo de drogas modernas (por exemplo, na terapia anticancerígena, antimicrobianas, antiparasitárias) são isoladas de fontes naturais provenientes, principalmente, de países com clima tropical e subtropical como o Brasil. Tendo em vista, a riqueza de espécies e nichos ecológicos existentes nestes ecossistemas, sendo então, amplamente utilizadas como alvo para bioprospecção de novas biomoléculas com aplicabilidade farmacológica, agrícola e industrial.

As plantas e os micro-organismos cultiváveis são as principais fontes de moléculas biológicas ativas e terapeuticamente úteis, como alcalóides, terpenóides aromáticos e glicosídeos. Contudo, observa-se que a maior parte dos estudos de buscas de novos produtos naturais no Brasil, tem sido focado nas espécies vegetais em busca de seus compostos ativos em relação a gama de efeitos biológico tradicionais como antitumoral, antioxidante e hipoglicêmico.

As comunidades biológicas pouco exploradas ou inexploradas, tais como os micro-organismos endofíticos, estão frequentemente associadas à diversidade biológica e diretamente relacionada à descoberta de moléculas químicas com potencial de atividade biológica. Estes organismos habitam os tecidos internos de espécies vegetais e produzem metabólitos que desempenham funções favoráveis a sua relação interespecíficas com o hospedeiro. Uma vez isolado, selecionado e preservado, um microrganismo produtor de biomoléculas de interesse, pode ser submetido à pesquisa e desenvolvimento o que, às vezes, torna-se difícil com plantas raras ou com crescimento lento. Nesse contexto, os microrganismos endofíticos isolados de plantas medicinais do semiárido brasileiro, podem ser considerados fonte promissora para bioprospecção de novos produtos naturais resultantes do metabolismo microbiano, tendo em vista a sua aplicação biotecnológica.

Organismos associados às plantas podem oferecer compostos com elementos terapêuticos, mas do que a própria planta, possibilitando a descoberta de novas substâncias farmacologicamente ativas e com baixo impacto ambiental. A

exemplo disto, tem-se o taxol um diterpenóide extraído da casca de *Taxus brevifolia*, com efeito contra câncer de mama e útero, esta plantas possui o crescimento lento e baixa produção de taxol, contudo Stierle et al. (1993) isolaram do floema desse hospedeiro o fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, que quando cultivado em meio semisintético, produz o taxol em maior quantidade. Tal endofítico constitui-se em fonte alternativa para a produção desse fármaco e também contribui para evitar desequilíbrio ecológico em função da derrubada de *T. brevifolia*. Além disso, segundo Azevedo (1998), este evento sugere a possibilidade de uma transposição de genes entre fungos e plantas, indicando uma engenharia genética *in vivo*.

Espécies do gênero *Combretum*, pertencente a família Combretaceae, são utilizadas na África, Índia e Tailândia como plantas medicinais para o tratamento de hepatite, malária, hanseníase e câncer. Estudos fitoquímicos destas plantas indicam a presença de triterpenóides, flavonóides, fenantrenos, taninos, saponinas, estilbenos, polifenóis responsáveis por tais ações terapêuticas e que desenvolvem funções antimicrobianas contra microrganismos fitopatógenos nas espécies que as possuem. No Brasil, na região do semiárido nordestino, tais gêneros são utilizadas como anti-inflamatório, antitumoral, antidiarréico, entretanto, há poucos relatos fitoquímicos dos compostos responsáveis pelas ações farmacológicas apresentadas, principalmente no que se diz respeito a ação antitumoral. Dentre os principais compostos de importância clínica extraídos desta família em outros países, as combretastatin (estilbenos), com ação antitumoral inibindo a divisão celular, tem sido considerada uma das mais promissoras drogas anticancerígenas por seu excelente mecanismo de ação.

Desta forma, este projeto tem como objetivo a bioprospecção de biomoléculas obtidas de microrganismos endofíticos de plantas *Combretum leprosum* do semiárido brasileiro e a detecção de compostos estilbenos em extrato desta planta e dos micro-organismos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Principais

- Determinar a produção de compostos químicos do tipo estilbeno (Combretastatin A4) por *Combretum leprosum*, planta pertencente à família Combretaceae com ocorrência no semiárido do nordeste brasileiro;
- Bioprospecção de biomoléculas obtidas de linhagens fúngicas endofíticas de *C. leprosum* para a obtenção de compostos com potenciais atividades biológicas;

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar a espécie e coletar partes da planta (raízes, caules e folhas) da família Combretaceae;
- Avaliar a produção pela espécie vegetal de compostos do grupo estilbeno CA4;
- Isolar micro-organismos endofíticos dos órgãos das plantas coletadas;
- Extrair metabólitos secundários dos isolados fúngicos em diferentes meio de cultura;
- Verificar a presença compostos com atividades biológicas (antimicrobiana, antioxidante e antitumoral), além do grupo estilbeno (Combretastatin A4) nos extratos dos endofíticos isoladas;
- Isolar, purificar e elucidar quimicamente os compostos em potencias para as atividades biológicas testadas;
- Identificar taxonomicamente, por meio de técnicas moleculares, os endofíticos produtores dos compostos de interesse;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Semiárido: Bioma Caatinga

No Brasil, a região semiárida é caracterizada por ambiente com condições singulares de clima, solo e um bioma heterogêneo. Esta zona está localizada quase que exclusivamente na região Nordeste do país, a qual é uma das cinco regiões geopolíticas que o país está dividido e engloba 9 estados, apenas oito, ao menos em partes, estão incluídos na região semiárida: Alagoas, Bahia, Ceará, Piauí, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe) além do norte de Minas Gerais (região Sudeste), figura 3.1. Este área se estende entre 03- 17°S e 35-45° W e ocupa cerca de 900.000 Km², cobrindo 8% do território internacional (GIULIETTI et al., 2006).

O clima do Nordeste é um dos mais complexos do país, devido a grande área, com diferentes fisionomias de relevo, e especialmente a associação de dois sistemas climáticos formados pelos alísios do Nordeste e Sudeste, o que propicia chuvas em diversos períodos do ano e em diferentes quantidades criando uma diversidade e instabilidade nos padrões de precipitação anual. Estas condições físicas e climáticas contribui para a formação de uma grande diversidade vegetal a qual caracteriza a região semiárido. A precipitação na região varia de super-úmido, com uma precipitação anual de até cerca de 2.000 mm/ano ao longo da costa, a até 300 mm/ano na zona semiárida, no qual as chuvas ficam restritas a alguns poucos meses do ano, como por exemplo no interior da Paraíba - Cariri e Rio Grande do Norte - Seridó. Desta forma, a disponibilidade de água é fator mais determinante para bioma caatinga (vegetação e fauna), como também para a exploração humana dos recursos naturais de toda a região (GIULIETTI et al., 2006).

A paisagem deste ambiente apresentam faixas de domínio vegetal específico de cada local, essa passagem do litoral para o interior, com variação de relevo e chuva, está associado a mudança de paisagem, movendo-se da costa a cerca de 100-200 km do litoral nordestino para o oeste observa-se primeiramente uma paisagem dominada Floresta Atlântica, exuberante e perenifolia (sempre-verde). Continuando para o interior, com a diminuição de chuvas, a floresta tornan-se semi-perenifolias (algumas espécies perdem as folhas durante o período de seca) a totalmente caducifolia (todas as espécies perdem as folhas durante o período de seca).

Os dois últimos tipos de florestas delimitam fitofisionomicamente a região do Semiárido do Brasil e constituem o Bioma Caatinga. O tipo de vegetação predominante no bioma é constituído por diferentes padrões de caatinga (do tupi: caa = mata; tinga = branca). Essas variam desde a estrutura de uma floresta muitas vezes espinhosa, 6-10 m de altura, de semi a caducifólias e ervas anual, onde predominam especialmente as leguminosas, até caatinga semi-arbustivas com predominância de cactáceas, euforbiáceas e bromélias (Figura 3.1).

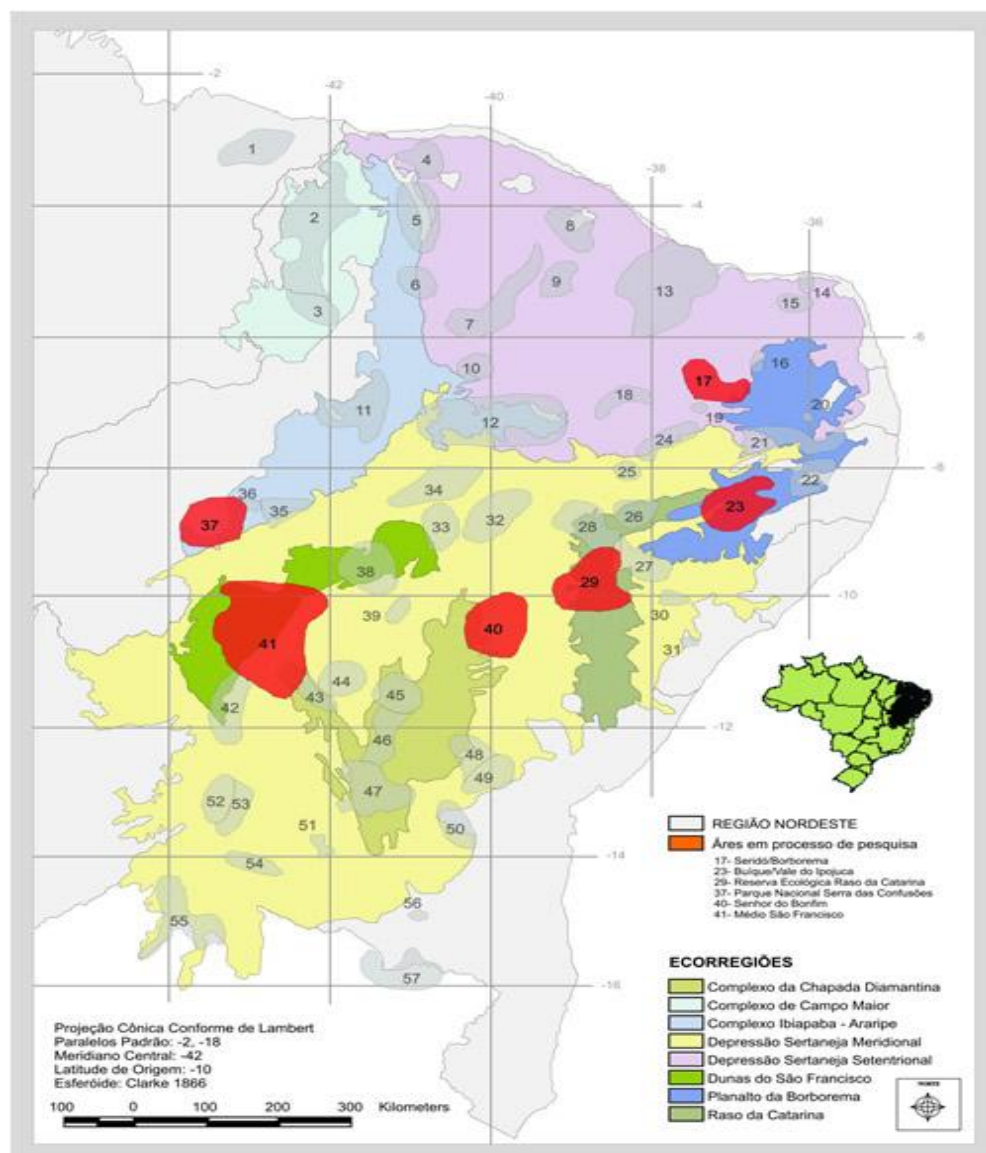


Figura 3.1 - Localização da zona de semiárido no Brasil. Mapa do nordeste apresentando as ecoregiões do bioma caatinga (SANTOS et al., 2010)

Tais espécies são capazes de sobreviverem a restrições hídricas, grandes oscilações diárias de temperatura, alta insolação, ventos fortes e em solos rasos e/ou arenosos. Em alguns ambientes rochosos, são encontradas algumas das características mais marcantes das plantas de campos rupestres, como sistemas radiculares eficientes para fixação da planta (Orchidaceae, Bromeliaceae), mesmo que sobre a rocha e sob ação de ventos fortes; crescimento aéreo reduzido, com a maioria das espécies até 1 m de altura; folhas pequenas e densamente arranjadas (espécies de *Lychnophora* e *Cuphea*), de maneira a diminuir a superfície de incidência luminosa e de evaporação; tolerância à dessecação (espécies de *Vellozia*, *Barbacenia* e *Trilepis lhotzkiana*), viabilizando a ocupação de locais sob baixíssima disponibilidade hídrica; mecanismo fotossintético tipo CAM (espécies de *Clusia*, Orchidaceae, Bromeliaceae e Cactaceae), possibilitando acumulação de CO₂ nas folhas espessas durante a noite, o que diminui a perda de água durante as trocas gasosas; sistemas subterrâneos que possibilitam a persistência das espécies após fogo ou seca intensa (espécies de *Hippeastrum* e *Mandevilla*); e rosetas que acumulam água entre as folhas (tipicamente nas Bromeliaceae). (BRZEZIECKI et al., 1993, GIULIETTI et al., 2006; GOMES et al., 2006; SANTANA; SOUTO, 2006; TROVÃO et al., 2007).

Na figura 3.2 podem-se visualizar as características fisionômicas do bioma caatinga nos dois períodos de sazonalidade característico deste ambiente, período em que as primeiras chuvas são acompanhadas pela transformação de árvores e arbustos secos com troncos e ramos desnudos e esbranquiçados, em uma vegetação verde e floração bem diversificada.



Figura 3.2 - Regiões de ambiente de caatinga do semiárido brasileiro no período chuvoso e seca de diferentes ambientes. (Fotografadas por Suikinai Nobre Santos, abril e novembro de 2010)

Recentemente, o governo brasileiro iniciou ações para identificação de área prioritária para a conservação da diversidade biológica, com base nos estudos coordenados pela Conservation International. Isto porque, a Caatinga foi reconhecida como umas das 37 grande regiões naturais do planeta, pois é um ecossistemas que ainda abriga, pelo menos 70% de sua cobertura original, desta forma, são considerados estratégicos no contexto das grandes mudanças globais (AGUIAR, 2002; TABARELLI: SILVA, 2002). De forma mais específica, a conservação da Caatinga é importante para a manutenção dos padrões regionais e globais do clima, da

disponibilidade de água potável, de solos agricultáveis, e de parte importante da biodiversidade do planeta. Valem ressaltar que o bioma caatinga é o mais degradado do semiárido, principalmente por pressões antrópicas, e possui menos de 1% de sua área protegida em reservas resultando em ameaça real a extinção de diversas espécies. Diante disto, foram mapeadas 82 áreas prioritárias para a conservação, dessas 27 foram classificadas como áreas de extrema importância biológica, como mostra a figura 3.3. As medidas sugeridas para remediação e mudança urgente deste quadro foram: Atualização da lista das espécies ameaçadas em extinção; comércio de lenha e regras de reposição florestal; monitoramento as áreas em processo de desertificação; desenvolvimento e disseminação de tecnologias; fiscalização do cumprimento legal quanto à agricultura e pecuária; bioprospecção e educação ambiental (TABARELLI; SILVA, 2002). Então, com base nesses dados e de distribuição das espécies vegetais (HUEFS) de interesse foram estabelecidos os pontos de coleta das amostras vegetais deste trabalho.

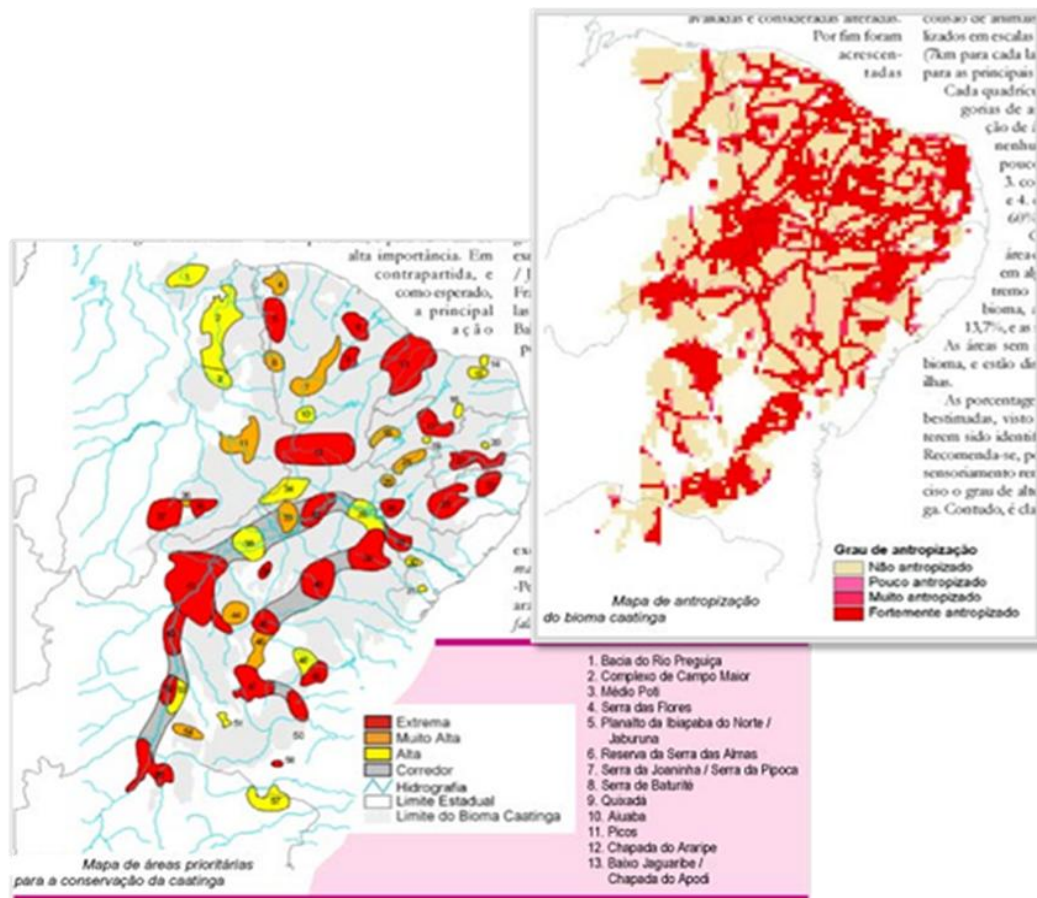


Figura 3.3 - Mapa de áreas prioritárias de conservação e estudo científico para conservação da caatinga, as áreas em vermelhos seis são consideradas áreas de importância biológica extrema e com alto padrão de antropização

3.2 Metabolismo secundário, produtos naturais, bioprospecção

A biodiversidade representa um enorme reservatório para a descoberta de novas moléculas. No início do século 19, foi sugerido que duas classes principais de metabolismo produzidos por plantas e micro-organismos, sendo o metabolismo primário caracterizado como essenciais para a sobrevivência celular e propagação (hidrocarbonetos, proteínas, aminoácidos, lipídios). E a definição atualmente para metabolismo secundário seriam amplamente todos aqueles compostos reguladores, direto ou indiretamente em processos de crescimento, replicação e/ou apresenta algum tipo de resposta (regulação, inibição, estimulante) em células (eucarióticas ou procarióticas) a nível bioquímico e biológico, em concentrações mínimas (BERDY, 2005).

Em geral, as pesquisas em produtos naturais geralmente são norteadas pelas seguintes vertentes:

- ❖ Ao acaso - em que todas as fontes são escolhidas independentemente de conhecimentos anteriores sobre elas;
- ❖ Taxonômicas – baseia-se num conhecimentos prévio de que um dado gênero ou família contém composto supostamente com interesse;
- ❖ Etnofarmacológica – é baseada no conhecimento de plantas utilizadas a fins medicinais pelas populações, e com base nessas informações, a planta é submetida a estudos fitofarmacológicos;
- ❖ Fitoquímica – compreende o estudo de um determinado tipo particular de compostos com interesse biológico, por exemplo, alcaloides. Neste caso, localiza-se uma família, gênero ou espécie de acordo com a bibliografia, e comprova-se a sua existência mediante ensaios químicos em diferentes partes da planta e, se necessário, em plantas com diferentes idades e sazonalidades.

Para a investigação desses metabolitos, o caminho envolve a escolha as fontes a serem utilizadas até aos estudos estruturais e de bioatividade, implica a colaboração interdisciplinar e multidisciplinar entre botânicos, fitoquímicos, químicos orgânicos, farmacologistas, toxicologistas e biólogos ligados à biologia molecular como mostra o esquema da figura 3.4.

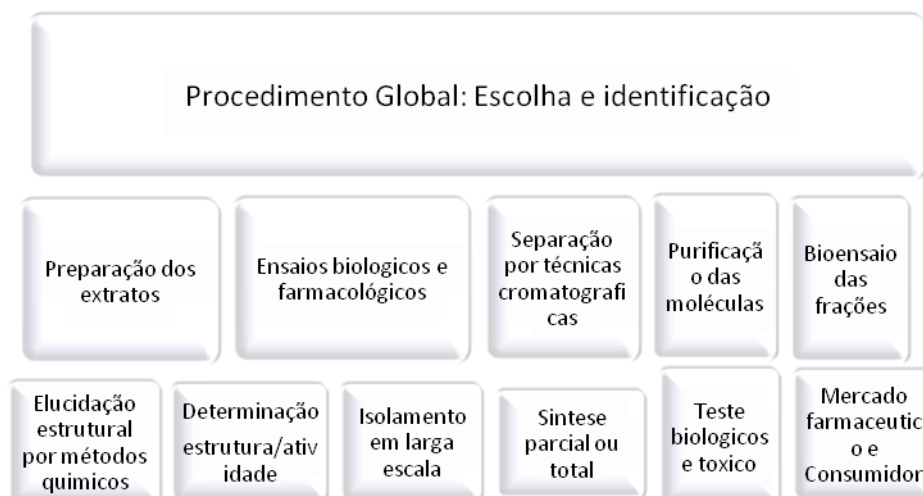


Figura 3.4 - Representação esquemática dos procedimentos globais para bioprospecção de produtos naturais (Adaptado, BERDY 2005)

3.3 Família Combretaceae

A família Combretaceae compreende aproximadamente 600 espécies em 20 gêneros de árvores, arbustos e lianas, com distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, especialmente na África, centro de dispersão da família (TAN et al., 2002; LINSINGEN, 2007; PETTIT et al., 1987). Apresentam muitas espécies nas Florestas Tropicais do sudeste da Ásia e nas Américas, Savanas, Indianas e Brasileiras, Florestas Equatoriais e do Congo, assim como nas zonas costeiras tropicais das Américas, África e Ásia (LINSINGEN, 2007).

Os gêneros mais representativos são *Combretum* Loefl e *Terminalia* L. que em conjunto representam 450 espécies (MARQUETE; VALENTE, 2005). Muitas espécies da família apresentam valor econômico, principalmente na indústria farmacológica, madeira e ornamental, além disso, incluem também quatro espécies de mangue de três gêneros *Lumnitzera* Willd., *Laguncularia* Gaertn., f. e *Conocarpus* L. Esta família foi tradicionalmente posicionada na ordem Myrtales desde Brown (1810), e seus tratados foram suportados por recentes estudos moléculas (CONTY; SYTSMA et al., 1996). Na figura 3.5 está representada o cladograma que demonstra as afinidades e as relações filogenéticas entre as espécies da família Combretaceae (TAN et al., 2002).

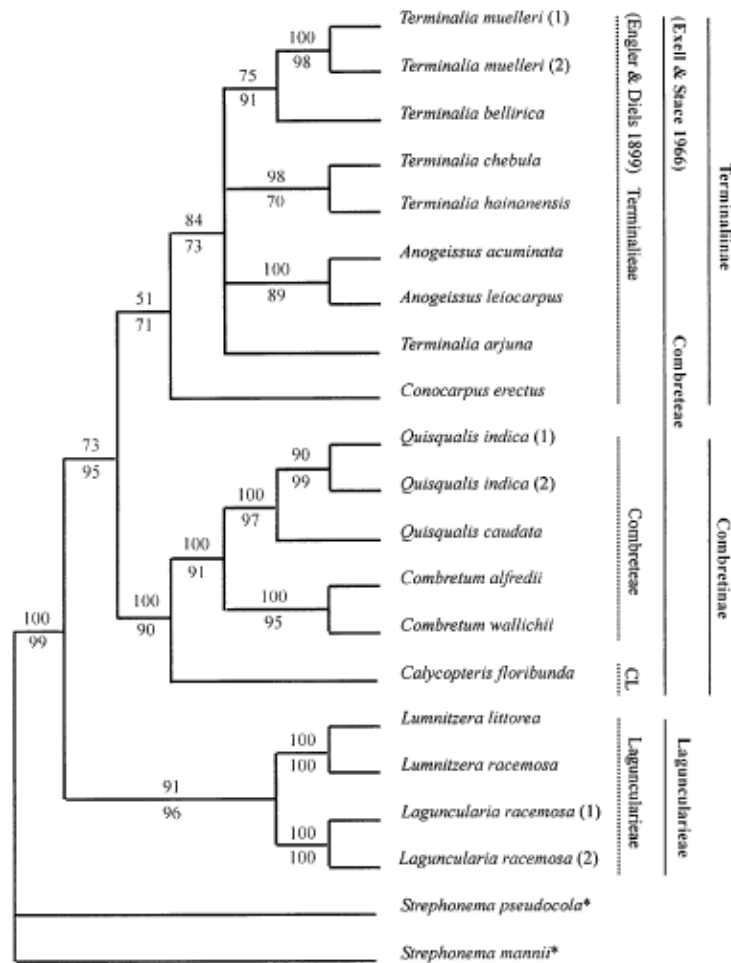


Figura 3.5 - Cladograma demonstrando as afinidades entre as subfamílias, tribos e gêneros da família Combretaceae (TAN 2002)

Espécies do gênero *Combretum*, são utilizadas na medicina tradicional por milhares de anos na África, Índia e Tailândia no tratamento de várias doenças, incluindo malária, hepatite, hanseníase, anti-inflamatória e anticancerígena (PETTIT et al., 1987; McGAW et al., 2001). No Brasil ocorrem nove gêneros, sendo seis dos quais ocorrem no nordeste brasileiro com representantes na caatinga, cerrado, campos rupestres, restingas e florestas (GIULIETTE, 2006). No nordeste brasileiro (principalmente na Bahia, Pernambuco e Piauí), são utilizadas terapêuticamente no tratamento de uma gama de doenças como, sífilis, dermatoses, úlcera, resfriado, tosse, diabetes, inflamação, antitumorais (GIULIETTE, 2006; LINSINGEN, 2007). Dentre as principais encontradas estão a *C. jacquim* (casca para tratamento de sífilis e dermatoses), *C. hilarianum*, *C. lanceolatum* (casca para o tratamento de úlcera), *C.*

leprosum (as folhas são usadas para resfriado e tosse), *C. mellifluum*, *C. parviflorum*, *Buchenavia Titraplylla*, *Conocarpos erectus* (casca para sífilis e diabetes), *Laguncularia racemosa* (as folhas são usadas para dor de dente) *T. actinophyllo*, *T. argentea* (casca para bronquite, gastrite, inflamação e a resina para constipação), *T. catappa* (casca e folhas para febre, tosse, cistite, cálculo, antitumoral), *T. fagifolia* (anti-inflamatório, antitumoral), *T. brasiliensis*, *T. australis* (casca para diarreia) (COELHO et al., 2005). Entretanto, apesar dos inúmeros relatos etnofarmacológicos, sobre o uso dessas espécies de plantas na medicina tradicional de comunidades regionais, há poucos estudos fitoquímicos de caracterização e síntese dos compostos responsáveis pelas ações terapêuticas apresentadas, principalmente no que se diz respeito a ação antitumoral.

Contudo, os conhecimentos sobre os compostos relacionados a esta família em outros países, relatam o isolamento de diferentes compostos que podem ser responsáveis pelas atividades terapêuticas, por exemplo, de *C. mellifluum* isolaram triterpenos pentacíclicos, de *C. apiculatum*, *C. molle* e *C. hereroense* isolaram fenantrenos, dihidrofenantrenos e bisbenzenos todos apresentando ação antimicrobiana (LETCHER; NHAMO, 1971; LETCHER et al., 1972; LETCHER; NHAMO, 1973). Assim como Pettite et al. (1987) extraio de *C. caffum* e do *C. kraussio* substâncias do grupo estilbenos (Combretastatins) que apresentaram atividade citotóxica e forte atividade antitumoral em ensaios pré-clínicos. Baba-Moussa et al. (1999) isolou taninos e saponinas de *C. nigricans* e *T. avicennioides*. Das espécies de *C. hereroense*, *C. psidioides*, *C. apiculatum* e *C. caffrum*, foram isolados vários tipos de aminoácidos (PELIZZONI et al., 1994; PETTIT et al., 1987; BRAGA et al., 2007).

3.3.1 *Combretum leprosum*

A espécie *Combretum leprosum* Mart. et Eicher (Figura 3.6) pertence a planta da família Combretaceae, endêmica do Brasil, amplamente distribuída em região de caatinga do semiárido nordestino brasileiro. É popularmente conhecida como mofumbo, mufumbo, carne de vaca ou cipoaba (LOPES et al., 2010). Apresentam características ao clima semiárido, pendendo as folhas e frutos no período de estiagem assemelhando-se arbustos secos, entretanto, nas primeiras chuvas

surgem novos brotos foliares e estruturas reprodutivas (inflorescências e frutos), figura 3.6. Tais características adaptativas possivelmente podem ser resultantes da produção de metabolismo secundários que biorregulam processos na planta auxiliando na sua manutenção nestes ambientes. Estudos etnofarmacológicos mostram o uso medicinal da planta no tratamento de várias doenças como, por exemplo: tumores, febres, inchaços, desconfortos estomacais, antiinflamatório, anticolinesterásica e analgésica, como cicatrizante, na prevenção de irritações cutâneas e na limpeza de feridas, na contenção de hemorragias, antitussígeno e expectorante, contra venenos de cobras (PIETROVSKI et al., 2006, AGRA et al., 2007; LOPES et al., 2010).

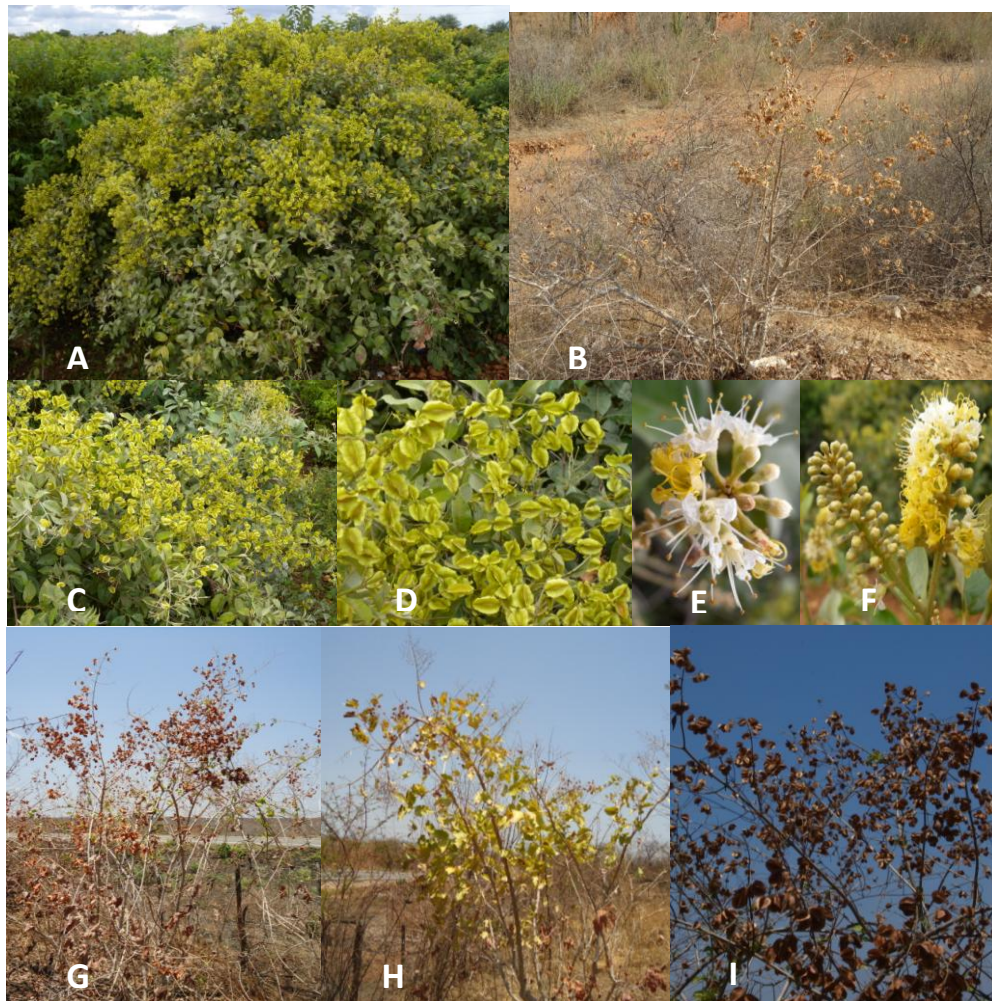


Figura 3.6 - *Combretum leprosum*, (A) época chuvosa, (B) época seca com perda de folhas, (C, D) fruto verde na época chuvosa, (E, F) flor e inflorescência, (G, H e I) fruto época seca. (Fotografias por Suikinai Nobre Santos, 2010)

Quimicamente foram isolados das folhas e raízes de *C. leprosum* ácido arjunólico (apresentou atividade antiinflamatória), ácido málico, ácidos graxos, o triterpeno 3 β ,6 β ,16 β -trihidroxilup- 20(29)-eno (TTHL) (capaz de inibir a nocicepção provocada em diferentes modelos como a hiperalgesia visceral), flavonóides glicosilados, 3-O-metilquercetina e quercetina (atividade antioxidante). Análises do extrato etanólico das folhas demonstraram que os monossacarídeos são os principais componentes (80%), os triterpenos representam 10%, estando entre eles o ácido arjunólico e TTHL que são triterpenos pentacíclicos. O extrato ainda contém 5% de oligossacarídeos e 3% de ácidos graxos. Além disso, a fração hexânica proveniente do extrato etanólico resultou no isolamento e identificação da picatequina, lupeol e da mistura de esteróides estigmasterol e sitosterol (FACUNDO et al., 1993, MENESES et al., 2003; FACUNDO et al., 2005; PIETROVSKI et al., 2006).

Embora não sejam muitos, os estudos envolvendo a investigação das atividades biológicas de *C. leprosum* apontam para ações semelhantes às aquelas observadas em outras espécies do gênero *Combretum* como atividade antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória. Além disso, corroborando com o uso popular, o extrato das frutas de *C. leprosum* demonstrou propriedades antiofídicas ao inibir a atividade proteolítica do veneno de *Bothrops jararacussu* e também a hemorragia causada pelo veneno de *B. jararaca*, o que demonstra a habilidade da espécie em inibir importantes atividades causadas pelo veneno de *Bothrops* (FERNANDES et al., 2007).

Assim, *Combretum leprosum* é uma importante opção na medicina popular para o tratamento de problemas dermatológicos e lesões na pele, e apesar de existirem alguns trabalhos estudando suas atividades biológicas, ainda não existem dados científicos que comprovem sua eficácia torna-se interessante investigar as propriedades biológicas e suas relações metabólicas com micro-organismos hospedeiros (endofíticos), o qual ainda possui poucos dados científicos acerca disto.

3.4 Estilbenos: fontes de biomoléculas de interesse

Plantas elaboram uma ampla quantidade de produtos naturais, os quais estão envolvidos em vantagens seletivas contra estresses ambientais. Entre eles, os

fenilpropanoides são as maiores famílias de metabolitos secundários envolvendo a respostas da planta para vários estresses bióticos e abióticos. Muitos feilpropanoides são compostos antimicrobianos sintetizados em respostas ao patógeno ou a ataques herbívoros e classificados como fitoalexinas. Contudo, outras vias têm sido descritas como indutores de produção de fenilpropanoides, tais como, sinalizadores em resposta a defesa, proteção contra danos causados pela radiação UV e aumento da biodisponibilidade de nutrientes recalcitrantes (DONNEZ et al., 2009; SHEN et al., 2009).

Estilbenos são uma classe de polifenóis com registro de produção até então pelas plantas, ativos biologicamente, apresentam em sua estrutura química dois anéis aromáticos ligados por dois carbonos, com baixo peso molecular, são derivados do metabolismo secundário de plantas e sintetizados como resposta a vários tipos de estresses (CAO et al., 2008; HEYNEKAMP et al., 2006; MARK et al., 2008; KING et al., 2008). Ultimamente têm atraído grande interesse devido a sua intrincada estrutura biológica e apresentam atividades diversificada com potencial em aplicações terapêuticas ou preventiva. Estudos sobre as atividades biológicas revelam importância de bioprospecção dos compostos naturais derivados deste grupo, pois apresentam atividade xenobióticas em células animais, neuroproteção, modulação imunológica, contudo, atualmente em ensaio pré-clínicos revelam potentes inibidores de crescimento de várias células cancerígenas (INGHAM, 1976; INAMORI et al., 1987; MANILA et al., 1993, PATTICHIS et al., 1993). No entanto, estilbenos não têm uma ampla distribuição no reino, têm sido principalmente encontrado em espécies de vinte e três famílias, tais como Ciperaceae, Dipterocarpaceae, Gnetaceae, Iridaceae, Leguminosae (Fabaceae), Moraceae, Orchidaceae e Poligonaceae (SHEN et al., 2009). Entre estas famílias, a Leguminosae apresenta o maior número de novo estilbenos monoméricas, enquanto o Dipterocarpaceae é a mais rica fonte de novos estilbenos oligoméricos. Combretastatins, uma série de estilbenos bioativos (combretastatin série A), bisbenzil (série B), fenantrenos (série C), e lactonas macrocíclicas (série D), têm sido obtido a partir de uma espécie arbustiva da África *Combretum cafferum* (Combretaceae), e foi a partir desta espécie que foi realizado o primeiro isolamento de Combretastatin-1 em 1982 (PETTIT et al., 1987). Dentre os quais, o resverastrol

e as combrestatins são os mais destacados como protótipos para novas drogas antitumorais, antioxidantes e contra doenças coronarianas (PETTIT; GREALISH, 2003; CHUNG et al., 1992; GOLDBERG, 1996; PACE-ASCIAM et al., 1995).

As Combretastatins inclui A-1 a A-5 (Figura 3.7), e têm apresentado ação anticancerígenas agindo como inibidores da polimerização dos microtúbulos *in vitro*, impedindo a divisão celular e por conseguinte inibindo o crescimento tumoral, estudos focado no mecanismos de ação antitumoral sugerem efeito anti-mitótico por ligação na tubulina (PETTIT et al., 1987; SRIVASTAVA et al., 2005; MILITÃO, 2007; PELIZZONI et al., 1994). A pró-droga combretastatin A-4 fosfato (CA4-P), provou ser o mais potente dos candidatos das Combretastatins, com um IG_{50} de 3,20 nM em um projeto de screening antitumoral de acordo com NCI60 e outros análogos estão atualmente a ser investigados em várias fases de ensaios clínicos e suas estruturas foram estabelecidas por espectros de RMN e ainda confirmada por síntese (SRIVASTAVA et al., 2005).

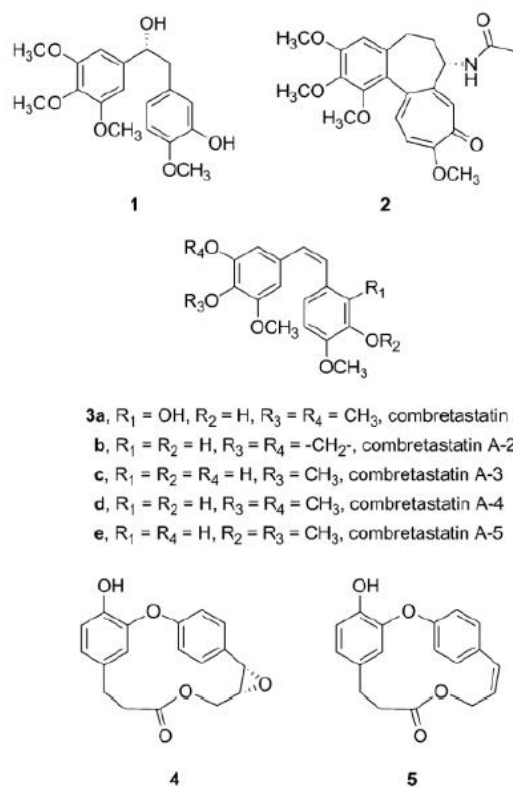


Figura 3.7 - Estruturas químicas das Combretastatins A1-A5 (SRIVASTAVA et al., 2005)

Outro exemplo de estilbeno de interesse é o resveratrol, considerado ativamente um dos produtos naturais mais estudados. Foi inicialmente isolado por Takoaka em 1940, a partir da raiz heléboro branco. Apresentam importância farmacológica nos estudos indicam ser um agente quimiopreventivo do câncer, baseado na ação do efeito inibitório da iniciação, promoção e progressão do tumor (JEANDET et al., 1991; MANILA et al., 1993; JANG et al., 1997; UENOBE, 1997). Centenas de estudos têm relatado que o resveratrol pode impedir ou retardar a progressão de uma grande variedade de doenças, cardiovasculares, bem como estender a expectativa de vida de vários organismos. É uma fitoalexina sintetizada em quantidades consideráveis na casca de uvas, framboesas, amendoins, e por espécies de plantas comestíveis e medicinais em resposta a condições de estresses (ROCHA-GONZÁLEZ et al., 2008). No entanto, evidências *in vivo*, bem como em seres humanos estão ainda em falta. Assim, novas investigações sobre os efeitos farmacológicos do resveratrol *in vivo* são necessárias antes de qualquer conclusão sobre seus efeitos sobre doenças neurodegenerativas podem ser obtidas.

3.5 Diversidade funcional e química dos metabólitos secundários microbianos

A maioria das importantes biomoléculas usadas no tratamento quimioterápico é desenvolvida a partir de produtos naturais químicos e fitoquímicos obtidos principalmente de micro-organismos e plantas (DEMAIN, 1999). Entre os agentes derivados de linhagens bacterianas incluem como membros as antraciclinas, bleomicinas, actinomicinas, mitomicina C, que foram extraídas de *Streptomyces* spp. e agem inibindo a transcrição bloqueando o crescimento de algumas células (CRAGG et al., 1997). Exemplos de derivados dessas drogas que já foram aprovadas para o uso clínico são: daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, e estreptozocina. As antraciclinas são os agentes antitumorais mais utilizados dentre os quimioterápicos antitumorais agindo na inibição da topoisomerase II (ROCHA et al., 2001; BINASCHI et al., 2000; DEMAIN, 1999).

O Paclitaxel e alguns de seus derivados representam o primeiro grande grupo de agentes anticancerígenos produzidos por endofíticos. Inicialmente foi isolado da espécie vegetal *Taxus brevifolia*, na década de sessenta como um agente citotóxico,

sendo descoberto depois que atuava como estabilizador de microtúbulos impedindo a divisão celular (WALL; WANI, 1995; KINGSTON, 1996). Posteriormente, o isolamento do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* a partir da casca de *T. brevifolia* abriu nova etapa para a produção do taxol permitindo a sua produção por fermentação (50ng/L), comprovando a importância dos endofíticos na produção de metabólitos bioativos (TAN; ZOU, 2001; STIERLE et al., 1993; STROBEL; DAISY, 2003; PINTO 2003). Li et al. (1996) isolaram *Pestalotiopsis microspora* de plantas do Nepal, *T. wallichiana*, e observaram que este fungo endofítico produz taxol em nível próximo a sua utilização comercial, especialmente quando inibidores de síntese de esteróis são adicionados ao meio de fermentação, mudando o fluxo do carbono do ergosterol para o taxol.

Wagenaar e Clardy (2000), obtiveram um novo alcalóide denominado de citochalasinina, produzido pelo fungo endofítico *Rhinochadiella* sp. isolado de *Tripterygium wilfordii*, nativa da Eurásia. Este composto apresenta elevada atividade antitumoral e foi identificado como 22-oxo-12 citochalasinina (PINTO, 2003).

Diversos micro-organismos endofíticos produzem comumente vários produtos naturais mais do que diversas plantas superiores, além disso, esta produção não é confinada simplesmente a única espécie, isto por que, a diversidade genética e bioquímica destas comunidades e seus hospedeiros são enormes (STROBEL; DAISY, 2003).

Dentre os fungos microscópicos, os Ascomycotas e vários outros filamentosos endofíticos são os mais significativos e frequentemente produtores de compostos com cerca de um total 6400 produzidos, principalmente de espécies como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* 950, 900, 350 respectivamente. Além deles vários outras espécies filamentosas e endofíticas (*Trichoderma*, *Phoma*, *Alternaria*, *Acremonium* e *Stachybotrys*), são também bons produtores, com várias centenas de compostos bioativos identificados a partir deles. Os basidiomicotas (macrofungos) exemplificados pelas espécies *Ganoderma*, *Lactarius* ou *Aureobasidium*, apresentam cerca de 2000 compostos ativos, enquanto as leveduras e os ficomicotas, são as que produzem em menor quantidade, apenas 140 espécies bioativas e com 60 metabólitos isolados. O total de bioativos provenientes de linhagens fúngicas são aproximadamente de 8600, representando 38% de todos os produtos microbianos (BERDY, 2005).

Os compostos quimicamente fungicos são relativamente simples, mais exibem diversas atividades biológicas com efeitos fitotóxicos e principalmente atividades farmacológicas. A exemplo disto temos, as beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas), as estatinas de ciclosporina, e outros (mevinolina, compactina, lovastatina, pravastatina, atrovastatin) (GRABLEY, SATTLER, 2003; MITCHELL et al., 2008; STADLER, KELLER, 2008). Recentemente, é inquestionável que o interesse de todos os tipos de espécies de fungos, mas principalmente os endofítica e os chamados fungos marinhos como possíveis maiores fontes de novos bioativos compostos. Isto porque, a expansão de amplos métodos de ensaios rápidos, conduzidos pelo aumento de do número de fungos "não identificado" como bioativo produtores de metabólitos (mais de 250 novos metabólitos nos últimos dois anos), tem sido visualizados principalmente pelo numero de patentes (SURYANARAYANAN et al., 2009). A contínua necessidade de disponibilização de novos produtos farmacêuticos requer pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias para o tratamento de tumores (CRAGG; NEWMAN, 2005).

3.6 Micro-organismos endofíticos

São considerados micro-organismos endofíticos, principalmente fungos e bactérias, que habitam no interior das plantas, podendo estabelecer relações simbiônticas, neutra ou antagonista com os hospedeiros (PETRINI; FISHER, 1988; CARROLL, 1988). Os micro-organismos endofíticos podem colonizar o interior das plantas em alguma fase do seu ciclo de vida, sendo encontrados em diversos órgãos e tecidos vegetais como folhas, ramos e raízes aparentemente sem causar dano à planta hospedeira. Azevedo (1998) relata que, os endofíticos são distintos dos fitopatógenos, que causam doenças em plantas e também diferem dos epifíticos, que habitam na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Estas distinções são apenas didáticas, uma vez que, pode ocorrer sobreposição entre estes grupos microbianos dificultando sua separação.

Outros grupos microbianos, como fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio também vivem associados aos seus hospedeiros e podem ser considerados endofíticos. Entretanto, os fungos micorrízicos são diferentes de outros endofíticos da raiz porque possuem estruturas externas, como hifas. Igualmente,

bactérias fixadoras de nitrogênio como *Rhizobium*, também apresentam estruturas externas, os nódulos, sendo possível distingui-los de outras bactérias endofíticas da raiz. Estes dois grupos microbianos são muito estudados e sua associação com as plantas são bem conhecidas (AZEVEDO et al., 2000; PINTO, 2003).

Os endofíticos, da mesma forma que os fitopatógenos, apresentam a capacidade de penetrar na planta e se disseminar sistematicamente, habitando de forma ativa o apoplasto do hospedeiro (PINTO, 2003; SALERMO et al., 2000). Estudos como os de Kogel et al. (2006), Akiyama et al. (2005), Bhat et al. (2005), Genre et al. (2005), Opalski et al. (2005), propõem um esquema com possível mecanismo de colonização desenvolvidos por fungos simbiótico endófitos biotrófico e patógenos, figura 3.8.

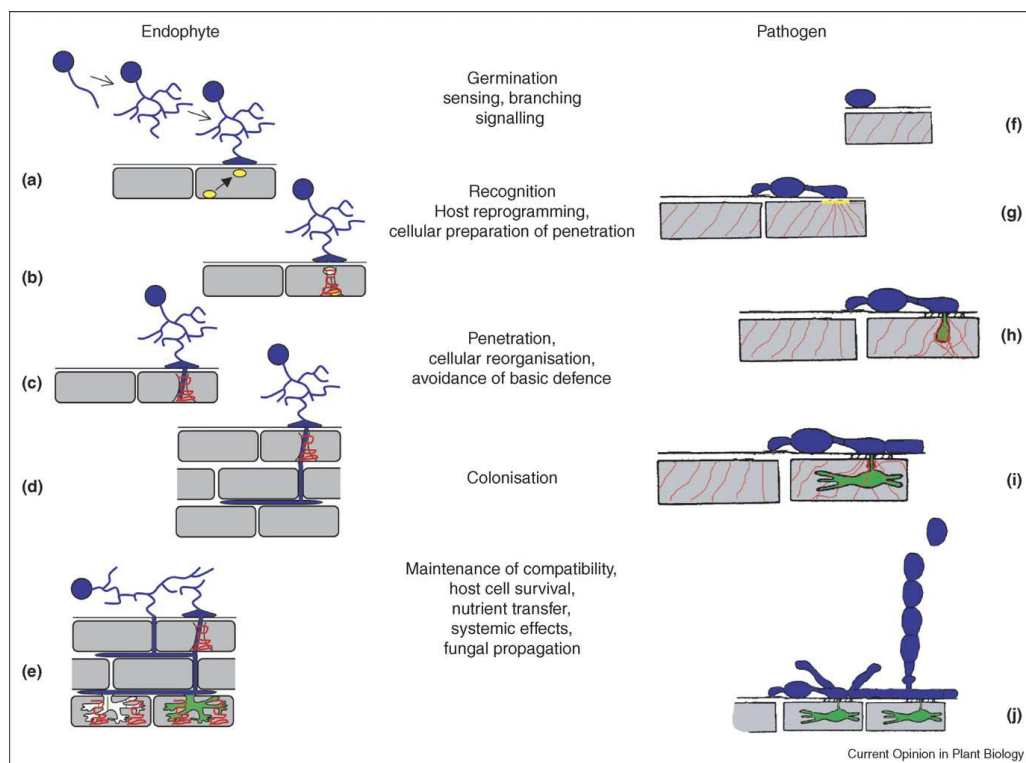


Figura 3.8 - Esquema exemplificando o possível mecanismo de colonização desenvolvidos por fungos simbiótico endófitos biotrófico (a-e) e patogênicos (f-j) (KOGEL et al., 2006)

Desenvolvimento simbiótico de endófitos biotrófico e patogênicos. (A) Uma vez que esporos fungico germinam e o tubo germinativo se aproxima de uma raiz, e a ramificação de hifas é desencadeada por 5-desoxi-estrigol. Em contacto físico, o fungo forma um apressórios, o qual aparentemente induz o movimento do núcleo

planta para o local de contacto. (B) Elementos do citoesqueleto e do retículo endoplasmático formam aparatos para a pre-penetração ao longo do eixo nuclear. (C) A estrutura é introduzido por uma infecção hifa, a partir do qual (d) colonização do cortex da raiz inicia. Infestação inicial é acompanhada por uma indução equilibrada de genes envolvidos no sistema imune das plantas. (E) Quando o fungo finalmente chega ao córtex interno, ele penetra na parede celular e constrói uma estrutura de rede de hifas, o arbusculo. Arbuscules contendo células têm estruturas específicas do citoesqueleto e acumular, espécies reativas de oxigênio. Enquanto arbuscules desenvolvem e morrem, o fungo espalha ainda mais na raiz e também coloniza o solo circundante. Há que leva os nutrientes minerais, que são transportados para a raiz e trocada por carboidratos. (F) Uma vez que o oídio fungico germina, ela forma um apressório para penetração na parede celular do hospedeiro. (G) Apressórios aparecem para induzirem a liberação de sinais para a formação de domínios de membrana (amarelo) em que fatores de susceptibilidade e de defesa do hospedeiro são recrutadas. Em uma interação compatível, o núcleo de acolhimento transientemente migra para o sitio de penetração (não mostrado) e alguns filamentos de actina (Vermelho) polarizam este site. (H) durante a penetração, a membrana da célula hospedeira é formado em torno da estrutura de absorção fúngica (verde), que está intimamente envolto por filamentos de actina e liderada por um anel de actina em torno da ponta crescente. (I) Quando o haustório amadurecem, uma malha de actina cortical é mantido em torno do haustorial, enquanto acontece a polarização da actina. (J) Eventualmente, o parasita estabelece haustórios secundário e cumpre o seu ciclo de vida, produzindo uma nova geração de conídios.

Os processos evolutivos na interação entre planta e endofítico envolvem fatores bióticos e abióticos, que ainda não são completamente compreendidos. Entretanto, algumas contribuições significativas para a viabilidade do vegetal foram atribuídas a estes micro-organismos, que podem atuar como agentes controladores de espécies fitopatogénicas, atuarem no controle de insetos, na proteção da planta contra a herbívora, na produção de fitohormônios e ainda, atuar como otimizadores de crescimento e enraizamento da planta hospedeira, assim como elevar sua resistência e estresses bióticos e abióticos (AZEVEDO et al., 2000; HALLMANN et al., 1997). A comunidade endofítica exerce estes efeitos favoráveis na planta porque

é capaz de produzir compostos químicos como enzimas, alcalóides, antibióticos e diferentes metabólitos, os quais favorecem a adaptação da planta perante condições adversas. A síntese destas substâncias é induzida por condições de estresse da planta hospedeira como: falta de água, presença de substâncias tóxicas ou ataque de patógenos ou insetos, que afetam a interação da planta com o meio ambiente (NASCIMENTO, 2006).

3.6.1 Diversidade de micro-organismo endofíticos

Os micro-organismos geram, somente pela sua utilização em processos biotecnológicos, bilhões de dólares por ano, embora a biodiversidade seja a base genética da biotecnologia para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico e/ou social, a preservação da diversidade microbiana é pouco considerada (BULL et al., 2000; CERIGIOLI, 2005).

A constatação de comunidades microbianas endofíticas em tecidos de plantas saudáveis tem sido relatada para muitas espécies cultivadas, e em diferentes estágios de crescimento. Os grupos de fungos e bactérias são os mais comuns endofíticos isolados, contudo, outros grupos microbianos como micoplasmas e arqueobactérias certamente existem como endofíticos de plantas mas ainda não se tem evidências (STROBEL; DAYSE, 2003). Os gêneros mais comumente isolados incluem: *Ascomycetos*, *Colletotrichum*, *Xylaria*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xantomonas* (RODRIGUES et al., 2000; ZOU et al., 2000; JACOBS et al., 1985; HINTON; BANCON, 1995; McINROY; KLOPPER, 1995).

O número de espécies de bactérias endofíticas isoladas de uma determinada planta está diretamente associado à parte do hospedeiro que é utilizada no isolamento. Diferenças nas flutuações populacionais de bactérias endofíticas têm sido associadas ao genótipo das plantas, às condições ambientais e aos seus locais de origem (CERIGIOLI, 2005).

A evolução das metodologias da biologia molecular aplicadas ao estudo do meio ambiente tem contribuído para um grande avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana. Resultados de estudos dependentes e independentes dos isolamentos e cultivo, baseados em amplificação e seqüenciamento de fragmentos

dos genes de RNA 16S e 18S (rDNA 16S e 18S), demonstram que a diversidade de micro-organismos em amostras ambientais é ampla (HEAD et al., 1998; HUNTER-CEVERA, 1998).

A aplicação destas metodologias no estudo da diversidade de micro-organismos tem permitido a descoberta de um número extenso de novas linhas evolutivas nesse grupo. Métodos independentes de cultivo tendem a completar os métodos baseados em isolamento e cultivo para a realização de levantamento e comparações da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (HUGENHOLTZ; PACE, 1996; HUGENHOLTZ et al., 1998).

Os benefícios científicos esperados a partir de um melhor entendimento sobre a diversidade microbiana são extensos. Entre eles estão à compreensão da funcionabilidade da comunidade nos ambientes terrestres e o conhecimento de suas interações com outros componentes da biodiversidade, como por exemplo, as plantas (CANHOS; MANFIO, 2007). Neste aspecto, várias pesquisas têm explorado a diversidade de micro-organismos associadas às plantas, obtendo-se novas informações para o conhecimento de mecanismos envolvidos na interação micro-organismos-planta.

3.6.2 Importâncias do estudo de micro-organismos endofíticos

O conhecimento atual sobre as potencialidades de uso dos micro-organismos endofíticos como fonte para novos metabólitos secundários, mostra uma fonte rica e confiável de diversidade genética e novas espécies descritas. O que pode levar a crer que, novos micro-organismos certamente estão associados com novos produtos naturais com aplicabilidade biotecnológica.

Pesquisas relatam que, interações entre micro-organismos endofíticos propiciam melhor desempenho nas plantas como aumento da área foliar e maior número de ramificações (LATCH et al., 1984) maior tolerância ao ataque de insetos e à seca (WEST et al., 1990). Quando estas linhagens cultivadas *in vitro* podem produzir antibióticos, tornando alvos de busca desses produtos e de outros metabólitos secundários de interesse farmacológico (FISHER et al., 1994, CALHOUM 1992; STIERLE et al.,1993). Além disso, o potencial das bactérias endofíticas para o desenvolvimento de novos sistemas de hospedeiro e vetor, para

utilização em processos fermentativos ou na introdução de genes heterólogos em plantas tem sido demonstrado por Downing et al. (2000).

Neste contexto, a literatura exemplifica várias substâncias potencialmente úteis isoladas de micro-organismos endofíticos de plantas medicinais, Zou et al. (2000) isolou *Colletotrichum gloeosporioides*, um fungo endofítico de *Artemisia mongolica*, que sintetiza ácido coletótrico que apresenta atividade antimicrobiana. Criptocandina A, um lipopeptídeo antimicótico, produzido pelo fungo endofítico *Cryptosporiopsis* cf. *quercina* isolado da planta medicinal *Tripterigeum weefordii* (Celastraceae) demonstrou excelente atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* e contra fitopatógenos, incluindo *Sclerotinia sclerotiorum* e *Botrytis cinérea* (STROBEL; DAISY, 2003).

O fungo endofítico *Muscudor vitigenus* isolado da *Paullinia paullinoide* na Amazônia, produz naftaleno que atua como um repelente de insetos (DAISY et al., 2002). Na tabela 3.1, estão exemplificados alguns produtos naturais obtidos de fungos endofíticos.

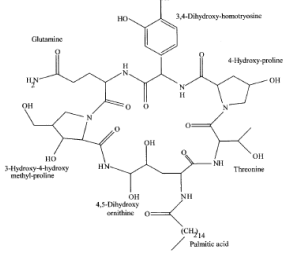
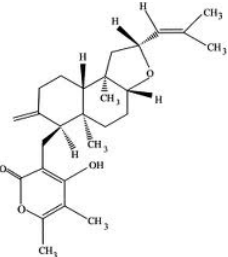
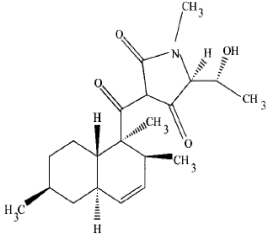
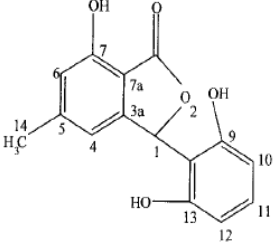
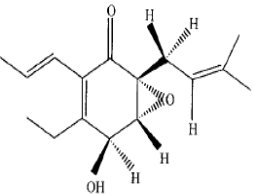
Estrutura química	Atividade	Referencia
	<p>Cryptocandina A, um peptido antifungico obtido de fungo endofítico <i>C. quercina</i></p>	<p>Strobel et al., 2003</p>
	<p>Subglutinol A, imunossupressor, produzido por fungo endofítico <i>Fusarium subglutinans</i></p>	<p>Kim et al., 2000</p>
	<p>Cryptocin, ácido tetramico, agente antifúngico, isolado do fungo endofítico <i>C. quercina</i></p>	<p>Li et al., 2000</p>
	<p>Isopestacina, Antimicótico e antioxidante. produzido por fungos endofítico <i>Paecilomyces</i> sp. <i>Taxus mairei</i>, China.</p>	<p>Arif et al., 2002</p>
	<p>Jesterone e hidroxijesterone, ciclohexano com atividade antioomicota do fungo endofítico <i>P. jesten</i></p>	<p>Li e Strobel, 2001</p>

Figura 3.9 - Compostos Naturais isolados de fungos endofíticos e com ação biológica interessante

3.7 Técnicas para a obtenção de metabólitos microbianos e para a seleção de substâncias bioativas

A metabolômica é análise comparativa dos metabólitos encontrados em conjuntos de semelhantes de amostras biológicas, como caldos fermentados. Para pesquisas de metabólitos bem sucedidas requer eficazes sistemas de extrações e para metabólitos não-alvos, sendo que os métodos de extração necessitam capturar uma ampla quantidade de metabólitos celulares e biofluidos, excluindo componentes, tais como proteínas que não são destinadas às análises. Segundo Sana, Waddell e Fischer (2008), do Instituto de Pesquisa de Scripps (TSRI), trabalhando com análises de extratos orgânicos através de análises espectrométricas, verificou-se que a mudança do pH (ácido e básico) do meio a ser extraído causa um aumento significativo na disponibilidade das diferentes moléculas, cerca de 45% de metabolitos únicos a mais foram retirados quando comparado a mesma extração em pH neutro (7,0).

Para a obtenção de compostos bioativos de fontes microbianas, vários processos para a extração e a purificação dessas biomoléculas foram desenvolvidos, a determinação das características do produto e das principais impurezas é fundamental no sucesso da seleção das operações subsequentes de purificação propriamente dita, uma vez que o fracionamento está baseado nas propriedades físico-químicas das moléculas envolvidas (MACIEL, 2002). Além disso, os processos de purificação, não podem ser aplicados de uma forma única, pois os produtos são altamente diversos, principalmente devido às características físico-químicas específicas (como ácidos orgânicos, antibióticos, polissacarídeos, hormônios, peptídeos) impedindo o uso de uma única técnica com este propósito (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001).

O processo de purificação inicial, resumidamente, compreende as seguintes etapas: separação das células e resíduos do meio de cultivo (clarificação); concentração e/ou purificação de baixa resolução, a qual compreende a separação da molécula alvo (biomolécula) em relação a moléculas com características físico-químicas significativamente diferentes (água, íons, pigmentos, ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídeos); purificação de alta resolução, processo que ocorre a separação de classes de moléculas com algumas características físico-químicas

semelhantes, como por exemplo, proteínas. Além disso, para produtos associados às células é necessário efetuar o rompimento celular, processo que é efetuado sobre o adensamento de células obtido após a clarificação do meio de cultivo (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001; MELO, 2005).

❖ **Clarificação**

Clarificação é a etapa em que as células suspensas são separadas de um meio de cultivo, frequentemente, corresponde à primeira operação do processo de purificação. O meio resultante, isento de células, é denominado de clarificado ou filtrado. Para realização deste processo pode-se utilizar sistemas de filtração (convencional ou tangencial) e centrifugação. Para as operações de clarificação são necessários alguns critérios. Por exemplo, grandes volumes de suspensões de leveduras são eficientemente clarificadas por centrifugação, enquanto que para volumes moderados de suspensões bacterianas a microfiltração é indicada. Microorganismos filamentosos, como os fungos, por outro lado, são clarificados através de filtração convencional, devido à reduzida velocidade de sedimentação destes organismos de baixa densidade (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001).

❖ **Extração em sistema de duas fases aquosas**

A extração é o processo pelo qual compostos, como metabólitos, são seletivamente separados dos outros compostos muitas vezes indesejados. Um dos métodos mais comum de extração é a extração líquido-líquido, que usa a solubilidade diferencial entre solventes miscíveis e imiscíveis com o meio aquoso. Compostos são transferidos de uma fase líquida para outra fase líquida, acrescentando a solução inicial, um solvente imiscível em que os compostos são mais solúveis (KIKILINA; PESSOA Jr., 2001). Vários são os procedimentos para a retirada das biomoléculas do meio líquido (sobrenadante): a precipitação, a adsorção e a extração com solvente imiscível em meio aquoso, que é o mais utilizado para a maioria dos antibióticos (ROBBER et al., 1997).

A extração líquido-líquido (extração com solvente imiscível), constituída de uma fase aquosa e um solvente orgânico, é utilizada há cerca de 60 anos na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos, neste sistema, a molécula alvo e impurezas são

separadas, como resultados de suas diferenças de solubilidades nas fases líquidas, são fatores decisivos às propriedades superficiais das biomoléculas, como carga elétrica e hidrofobicidade, além da massa molecular (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001). Entretanto, a aplicação desta técnica na separação, concentração e purificação de produtos naturais ainda é limitada, principalmente porque alguns destes produtos são insolúveis no solvente orgânico, ou porque este solvente não tem a devida seletividade e/ou capacidade, ou ainda, porque a exposição direta dos produtos naturais ao solvente pode causar desnaturação (RODRIGUES, 2001; FRANCO et al., 2005).

Dependendo do tipo de solvente usado na extração, diferentes quantidades e tipos de produtos podem ser obtidos. É a natureza química da substância a ser extraída, que determina o tipo de solvente a ser utilizado, de baixa, média ou alta polaridade. O princípio geral utilizado é que o semelhante dissolve semelhante; portanto, o solvente não polar extrairá a substância não polar (MACIEL et al., 2002). Os solventes mais comuns utilizados no processo de extração, em ordem crescente de polaridade são: hexano, éter de petróleo, benzeno, dietileter, clorofórmio, acetato de etila, butanol, etanol, metanol (FACCHIN; PASQUINI, 1998; RODRIGUES, 2001; ZUÑIGA et al., 2003).

3.8 Identificação do composto alvo

A identificação dos compostos de interesse é um dos maiores desafios da bioprospecção de novas drogas. Isto porque, existe a necessidade de interação multidisciplinar entre a Biologia Química (enfoca nas pequenas moléculas e sua utilização nos processos biológicos) e a Química Biológica (estuda as macromoléculas, principalmente as proteínas e os mecanismos enzimáticos) para chegar produto com desejáveis características almejadas pela indústria biotecnológica (PUPO; GALLO 2007). Recentemente ocorreu um grande progresso nos métodos robóticos e automatizados relacionados às técnicas cromatográficas de isolamentos (LC-MS, LC-MS-ELSD, LC-NMR, HPLC-UV-VIS, HPLC=ELSD, HPLC-PDA – detectores de matriz fotodiodo) e técnicas de identificação espectrométricas (RMN multidimensional, Raio-X para cristalografia, NOESY, BMS, electrospray MS, HR-MS) facilitando a caracterização química e aumentando em escala exponencial a

quantidade de novos metabolitos e de novas atividades dos compostos existentes (BÉDYS, 2005).

Nas ultimas décadas, com o melhora da sensibilidade desses aparelhos tornou possível realizar a elucidação estrutural com quantidades mínimas do composto alvo. Entretanto, alguns aspectos podem dificultar a caracterização, por exemplo, solubilidades em água, ou baixa ou nenhuma absorção em luz ultravioleta. Além disso, talvez o maior desafio para a química de produtos naturais é a continua produção em larga quantidade, a custos acessíveis para sua disponibilidade em escala industrial. Diante disto, tem aumentado o interesse em micro-organismos como fonte de compostos naturais, por ser uma fonte ecologicamente e economicamente viável, além da abordagem sistemática para a manipulação genética das linhagens chamadas de OSMAC (uma cepa - muitos compostos) para aumentar o rendimento e diversidade de compostos (HOFS et al., 2000; BODE et al., 2002; CHRISTIAN et al., 2005; SCHERLACH; HERTWECK 2006).

Referências

- AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.; COELHO, V.P. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 111, p. 383-95, 2007.
- AGUIAR, J.; LACHER T.E.; SILVA, J.M.C. The Caatinga. In: MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; ROBLES, G.P.; PILGRIM, J.; FONSECA, G.A.B.; BROOKS, T.; KONSTANT, W.R. (Ed.). **Wilderness: earth's last wild places**. Mexico: Cemex, Agrupación Serra Madre, 2002. p. 174-181.
- AKIYAMA, K.; MATSUZAKI, K.; HAYASHI, H. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, London, v. 435, p. 824-827, 2005.
- ARIF, A.M.; GRANT, D.M.; FUNG, P.C.W.; CHAU, R.M.W.; STROBEL, G.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J.K. Isopestacin, an Isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, Oxford, v. 60, p. 179-183, 2002.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Editora da Embrapa, 1998. p. 117-137.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAUJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Microbiology**, Valparaiso, v. 3, p. 40-65, 2000.

BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA K.; BOUCHE, P. Antifungal activities of seven west African Combretaceae used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 66, p. 335-338, 1999.

BALLIO, A.; BOSSA, F.; DIGIOGIO, P.; FERRANTI, P.; PACI, M.; PUCCI, P.; SCALONI, A.; SEGRE, A.; STROBEL, G.A. Structure of the pseudomycins, new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas syringae* MSU 16H. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 355, p. 96–100, 1994.

BÉDYS, J. Bioactive microbial metabolites, a person view. **Journal of Antibiotics**, London, v. 58, p. 1-26, 2005.

BHAT, R.A.; MIKLIS, M.; SCHMELZER, E.; SCHULZE-LEFERT, P.; PANSTRUGA, R. Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 102, p. 3135-3140, 2002.

BINASCHI, M.; FARINOSI, R.; BORGNETTO, M.E.; CAPRANICO, G. *In Vivo* site specificity and human isoenzyme selectivity of two Topoisomerase II – poisoning Antracyclines. **Cancer Research**, Baltimore, v. 60, p. 3770 – 3776, 2000.

BODE, H.B.; BETHE, B.; HOFES, R.; ZEEK, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. **Chemical BioChemical**, Weinheim, v. 3, p. 619–627, 2002.

BOHLIN, L.; ROSÉN, B. Podophyllotoxin derivatives: drugs discovery and development. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 1, p. 343–351, 1996.

BRAGA, F.C.; SERRA, C.P.; VIANA Jr., N.S.; OLIVEIRA, A.B.; CÔRTEZ, S.F.; LOMBARDI, J.A. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 78, p. 353–358, 2007.

BROW, R.; NEES VON ESENBECK, C.G. **Prodromus florae Novae Hollandiae et Insulae Van-Diemen, exhibens characteres plantarum**. 2nd ed. Norimbergae: Sumtibus L. Scra, 1810. p. 350-353.

BRZEZIECKI, B.; KIENAST, F.; WILDI, O. A simulated map of the potential natural forest vegetation in Switzerland. **Journal of Vegetation Science**, Sweden, v. 4, p. 499–508, 1993.

BULL, T.A.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v. 63, p. 573-606, 2000.

CALHOUN, L.A.; FINDLAY J.A.; MILLER, J. D.; WHITNEY, N.J. Metabolites toxic to spruce budworm from balsam fir needle endophytes. **Mycological Research**, Cambridge, v. 96, p. 281-286, 1992.

CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P. **Recursos microbiológicos para biotecnologia**. Disponível em: <<http://www.criabr.org.br>>. Acesso em: 25 nov. 2011.

CAO, T.M.; DURRANT, D.; TRIPATHI, A.; LIU, J.; TSAI, S.; KELLOGG, G.E.; SIMONI, D.; LEE, R.M. Stilbene derivatives that are colchicine-site microtubule inhibitors have antileukemic activity and minimal systemic toxicity. **American Journal of Hematology**, New York, v. 83, p. 390-397, 2008.

CARROLL, G.C. Fungal endophytes in stem and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, Brooklyn, v. 69, p. 2-9, 1988.

CERIGIOLI, M.M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para a promoção de crescimento**. 2005. 132 p. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

CHRISTIAN, O.E.; COMPTON, J.; CHRISTIAN, K.R.; MOOBERRY, S.L.; VALERIOTE, F.A.; CREWS, P. Using jasplakinolide to turn on pathways that enable the isolation of new chaetoglobosins from *Phomopsis asparagi*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 68, p. 1592–1597, 2005.

CHUNG, M.; TENG, C.M.; CHENG, K.L.; KO, F.N.; LIN, C.N. An antiplatelet principle of *Veratrum formosanum*, **Planta Medica**, Stuttgart, v. 58, p.274-276, 1992.

COELHO, F.B.R.; DAL BELO, C.A.; LOLIS, S.F.; SANTOS, M.G. Levantamento etnofarmacológico realizado na comunidade mumbuca localizada no Jalapão – TO. **Revista Eletrônica de Farmácia Suplemento**, Goiania, v. 2, p. 52-55, 2005.

CONTI, E.; LITT, A.; SYTSMA, K.J. Circumscription of Myrtales and their relationships to other rosids: evidence from rbcL sequence data. **American Journal of Botany**. Lancaster, v. 83, p. 221-233, 1996.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; WEISS, R.B. Coral reefs, forests, and thermal vents: the worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. **Seminars in Oncology**, Philadelphia, v. 24, p. 156-163, 1997.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. International collaboration in drug discovery and development from natural sources. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 77, p. 1923–1942, 2005.

CREASY, L.; COFFEE M. Phytoalexin production potential of grape berries. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, New York, v. 113, p. 230-234, 1988.

DAISY, B.H.; STROBEL, G.A.; CASTILLO, U.; EZRA, D.; SEARS, J.; WEAVER, D.K.; RUNYON, J.B. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, Dubuque, v. 148, p. 3737–3741, 2002.

- DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 51, p. 455-463, 1999.
- DONNEZ, D.; JEANDET, P.; CLEMENT, C.; COUROT, E. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 27, p. 706-713, 2009.
- DOWNING, K.J.; LESLIE, G.; THOMSON J.A. Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac7 and *Serratia marcescens* chiA gene in sugarcane-associated bacterial. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 2804-2810, 2000.
- FACCHIN, I; PASQUINI, C. Extração líquido-líquido em sistemas de fluxo. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, p. 60-68, 1998.
- FACUNDO, V.A.; ANDRADE, C.H.S.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFORD, C.D. Triterpenes and flavonoids from *C leprosum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 32, p. 411-415, 1993.
- FACUNDO, V.A.; RIOSA, K.A.; MEDEIROS, C.M.; MILITÃO, J.S.L.T.; MIRANDA, A.L.P.; EPIFANIO, R.A.; CARVALHO, M.P.; ANDRADE, A.T.; PINTO, A.C.; REZENDE C.M. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: antiinflammatory and anticholinesterasic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, p. 1309-1312, 2005.
- FERNANDES, F.F.A.; EL-KIK, C.; FACUNDO, V.A.; MELO, P.A. Evaluation of antifidic activity of *Combretum leprosum* Mart fruit extract. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA, 39., 2007, Ribeirão Preto. **Anais...** Riberão Preto: SBFT, 2007. p. 49-50.
- FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Antibiotic activity of some endophytic fungi from ericaceous plants. **Botanica Helvetica**, Basel, v. 94, p. 249-253, 1984.
- FRANCO, T.T. Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. In: PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B.V. (Org.). **Purificação de produtos biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. p. 167-175.
- GENRE, A.; CHABAUD, M.; TIMMERS, T.; BONFANTE, P.; BARKER, D.G. Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 3489-3499, 2005.
- GIULIETTI, A.N. **Diversidade e caracterização das fanerógamas do Semi-Árido Brasileiro**. Recife: Associação Plantas do Nordeste, 2006. v. 1, 488 p.
- GOLDBERG, D. More on antioxidant activity of resveratrol in red wine. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 42, p. 113-114, 1996.

GOMES, A.P.S.; RODAL, M.J.N.; MELO, A.L. Florística e fitogeografia da vegetação arbustiva subcaducifolia da Chapada de São José, Buíque, PE, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 20, p. 37-48, 2006.

GRABLEY, S.; SATTLER, I. Natural products for lead identification: nature is a valuable resource for providing tools. In: HILLISCH, A.; HILGENFELD, A. (Ed.). **Modern methods of drug discovery**. Switzer: Birkhauser Verlag, 2003. p. 87–107.

HAIT W.N.; RUBIN E.; GOODI S. Tubulin targeting agents. **Update on Cancer Therapeutics**, Oxford, v. 2, p.1–18, 2001.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARRISON, L.D.; TELOW, D.B.; RINALDI, M.; STROBEL, G. Pseudomycins, a family of novel peptides from *Pseudomonas syringae*, possessing broad spectrum antifungal activity. **The Journal of General Microbiology**, London, v. 137, p. 2857–2865, 1991.

HEYNEKAMP, J.J.; HUNSAKER, L.A.; VANDERJAGT, T.A.; DECK, L.M.; VANDER JAGT, D.L. Uncharged isocoumarin-based inhibitors of urokinase-type plasminogen activator. **BMC Chemical Biology**, London, v. 8, p. 6:1, 2006.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganism. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, p. 1-21, 1998.

HINTON, D.M.; BACON, C.W. Enterobacter cloacae is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 129, p. 117-125, 1995.

HOFS, R., WALKER, M.; ZEECK, A. Hexacyclinic acid, a polyketide from Streptomyces with a novel carbon skeleton, **Angewandte Chemie International**, Weinheim, v. 39, p. 3258–3261, 2000.

HUGENHILTZ, P.; PACE, N.R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 14, p. 190-197, 1996.

HUGENHILTZ, P.; GOEBEL B.M.; PACE N.R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 4765-4774, 1998.

HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 1, p. 278-285, 1998

INAMORI, Y.; KUBO, M.; TSUJIBO, H.; OGAWA, M.; SAITO, Y.; MIKI, Y.; TAKEMURA, S. The ichthyotoxicity and coronary vasodilator action of 3, 3'-dihydroxy- α , β -diethylstilbene, **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 35, p. 887-890, 1987.

INGHAM, J. 3,5, 4'-trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). **Phytochemical**, Oxford, v. 15, p. 1791-1793. 1976.

JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.M.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, p. 1262-1265, 1985.

JANG, M.; CAI, L.; UDEANI, G.O.; SLOWING, K.V.; THOMAS, C.F.; BEECHER, C.W.; FONG, H.H.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; MEHTA, R.G.; MOON, R.C.; PEZZUTO, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol: a natural product derived from grapes. **Science**, New York, v. 275, p. 218-220, 1997.

JEANDET, P.; SBAGHI, M.; BESSIS, R.; MEU, P. The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skins. **Vitis**, Siebeldinger, v. 34, p. 91-94, 1995.

KATERERE, D R.; GRAY, A.I.; NASH, R.J.; WAIGH, R.D. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolater from African Combretaceae. **Phytochemistry**, Oxford, v. 63, p. 81-88, 2003.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR, A.P. Purificação de produtos biotecnológicos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMILDELL, W. (Ed). **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 2, p. 254.

KIM, H.; BAKER, J.B.; LEE, S.U.; PARK, Y.; BOLDUC, K.L.; PARK, H.B.; DICKENS, M.G.; LEE, D.S.; KIM, Y.; KIM, S.H.; HONG, J. Stereoselective synthesis and osteogenic activity of subglutinols A and B. **Journal of the America Chemical Society**, Philadelphia, v. 11, p. 3192-3194, 2009.

KING, J.C.; BLUMBERG, J.; INGWERSEN, L.; JENAB, M.; TUCKER, K.L. Tree nuts and peanuts as components of a healthy diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 138, p. 1736-1740, 2008.

KINGSTON, D.G.I. Recent advances in chemistry of taxol. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, p. 726-734, 2000.

KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. 2. ed. Piracicaba: NAP/MEPA; ESALQ, 1999. 46 p.

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

KUBO, M.; KIMURA, Y.; SHIN, H.; HANEDA, H.; TANI, T.; NAMBA, K. Studies on the antifungal substance of crude drugs (II). On the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb.et Zucc. (Polygonaceae). **Shoyakugaku Zasshi**, Tokyo, v. 35, p. 58, 1981.

LATCH, G.C.M.; HUNT, W.F.; MUSGRAVE, D.R. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. **Mycotaxon**, Ithaca, v. 20, p. 535-550, 1984.

LETCHER, R.M.; NHAMO, L.R.M. Chemical constituents from the Combretaceae. Part I. Substituted phenanthrenes and 9,10- dihydrophenanthrenes from the heartwood of *Combretum apiculatum*. **Journal of the Chemical Society C**, Washington, v. 1, p. 3070–3076, 1971.

_____. Chemical constituents from the Combretaceae. Part IV. Phenanthrene derivatives from the heartwood of *Combretum hereroense*. **Journal of the Chemical Society**, London, v. 1, p. 1179–1191, 1973.

LETCHER, R.M.; NHAMO, L.R.M.; GUMIRO, I.T. Chemical constituents of the Combretaceae. Part II. Substituted phenanthrenes and 9, 10 dihydrophenanthrenes and a substituted bibenzyl from the heartwood of *Combretum molle*. **Journal of the Chemical Society**, London, v. 1 p. 206-210, 1972

LI, J.Y.; STROBEL, G.A. Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jester*. **Phytochemistry**. Oxford, v. 57, p. 261–265, 2001.

LI, J.Y.; STROBEL, G.; HARPER, J.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Organic Letters**, Washington, v. 23, p. 767-770, 2000.

LI, J.Y.; STROBEL, G.; SIDHU, R.; HESS, W.M.; FORD, E.J. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. **Microbiology**, Dubuque, v. 142, p. 2223-2226, 1996.

LINSINGEN, L.V. **Estudo taxonômico da família combretaceae R. BR. no sul do Brasil**. 2007. 125 p. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

LOPES, L.S.; MARQUES, R.B.; PEREIRA, S.S.; AYRES, M.C.; CHAVES, M.H.; CAVALHEIRO, A.J.; VIEIRA JR., G.M.; ALMEIDA, F.R.C. Antinociceptive effect on mice of the hydroalcoholic fraction and epicatechin obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Riberão Preto, v. 43, p. 1184-1192, 2010.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA Jr., V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MANILA, E.; TALVITIE, A.; KOLEHAMAINEN, E. Anti-leukaemic compounds derived from Stilbenes in *Picea abies* Bark. **Phytochemical**, Oxford, v. 33, p. 813-816, 1993.

MARK, A.W.; RIMANDO, A.M.; WOLKO, C.A. Methoxylation enhances stilbene bioactivity in *Caenorhabditis elegans*. **BMC Pharmacology**, London, v. 8, p. 1-11, 2008.

MARQUETE, N.F.S.; VALENTE, M.C. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Combretaceae. **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 56, p. 131-140, 2005.

MCGAW, L.J.; JAGER, A.K.; VAN STADEN, J. Antibacterial, anthelmintic and antiamebic activity in South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 72, p. 247–263. 2000.

McGAW, L.J.; RABE, T.; SPARG S.G.; JÄGER, A.K.; ELOFF, J.N.; VAN STADEN, J. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 75, p. 45–50, 2001.

McINROY, J.A.; KLOPPER, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 173, p. 337-342, 1995.

MELO, I.S. Recursos genéticos microbianos. In: MELO, I.S.; VALADARE–INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. **Recursos genéticos e melhoramento: microrganismos**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2002. p. 2-70.

MENESES, A.D.; AMARAL, E.J.R.; CRUZ, F.J.S.M.; SILVÉRIA, R.S.L.; ALMEIDA, F.R.C.; BRITO, S.M.R.C.; CAVALCANTI, P.M.S.; NUNES P.H.M. Atividade antiulcerogênica de *Combretum leprosum* MART & EICHE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL, 35, 2003, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: SBFTE, 2003. v. 1, p. 193.

MILITÃO, G. **Propriedades anticâncer de pterocarpanos naturais**. 2007. 143 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MILLER, R.V.; GARTON-KENNY, D.; REDGRAVE, B.; SEARS, J.; CONDRON, M.M.; TEPLow, D.B.; STROBEL, G.A. Ecomycins, unique antimycotics from *Pseudomonas viridiflava*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, p. 937–944, 1998.

MITCHELL, A.M.; STROBEL, G.A.; HESS, W.M.; VARGAS, P.N.; EZRA, D. *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 31, p. 37–43, 2008.

NASCIMENTO, A.K.C.L. **Desenvolvimento de um vetor bifuncional para a bactéria endofítica *Enterobacter agglomerans* e *Escherichia coli***. 2006. 68 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

OPALSKI, K.S.; SCHULTHEISS, H.; KOGEL, K-H.; HUCKELHOVEN, R. The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. hordei. **Plant Journal**, Udaipur, v. 41, p. 291-303, 2005.

PACE-ASCIAK, C.; HAHN, S.; DIAMANDIS, E.P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D.M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet-aggregation and eicosanoid synthesis-implications for protection against coronary heart-disease. **Clinical Chemica Acta**, Oulu, v. 235, p. 207-219, 1995.

PATTICHIS, K.; LOUCA, L.L.; JARMAN, J.; SANDLER, M.; GLOVER, V. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **The Lancet**, London, v. 341, p. 1103-1108; 1993.

PELIZZONI, F.; COLOMBO, R.; D'INCALCI, M.; VEROTTA, L. **Combretastatin derivatives with antitumoral activity and process for the preparation thereof**. Milan: World Intellectual Property Organization, 1994. 27 p.

PETRINI, O.; FISHER, P.J. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. **Transaction of the British Mycological Society**, London, v. 91, p. 233-238, 1988.

PETTIT, G.R.; GREALISH, M.P. **Structural modification of resveratrol: sodium resverastatin phosphate**. United States Patent Application Publication. Pub. N: US 2005/0240062 A1, Pub Date: Oct. 27, 2005.

PETTIT, G.R.; SINGH, S.B.; NIVEN, M.L.; HAMEL, E.; SCHMIDT, J.M. Isolation, structure, and synthesis of combretastatin A- 1 and B- 1, potent new inhibitors of microtubule Assembly, derived from *Combretum caffrum*. **Journal of Natural Products**. Washington, v. 50, p. 119-131, 1987.

PETTIT, G.R., SINGH, S.B.; SCHMIDT, J.M.; NIVEN, M.L.; HAMEL, E.; LIN, C.M. Isolation, structure, synthesis, and antimetabolic properties of combretastatins B-3 and B-4 from *Combretum caffrum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 51, p. 517–527, 1988.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta, 6beta, 16beta-trihydroxylup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, New York, v. 83, p. 90-99, 2006.

PINTO, L.D. **Atividade antimicrobiana e caracterização molecular de micro-organismos endofíticos isolados de folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco)**. 2003. 75 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p 1446-1455, 2007.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 327p.

ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, Oxford, v. 1, p. 64–369, 2001.

ROCHA-GONZÁLEZ, H.I.; AMBRIZ-TUTUTI M.; GRANADOS-SOTO V. Resveratrol: A Natural Compound with Pharmacological Potential in Neurodegenerative Diseases. **CNS Neuroscience & Therapeutics**. Oxford, v. 14, p. 234-247, 2008.

- RODRIGUES, E.M.G. **Extração líquido-líquido de Xilanase por micela reversa numa microcoluna de campânulas pulsadas**. 2001. 121 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- RODRIGUES, K.F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 40, p. 261-267, 2000.
- ROGERS, C.B. Isolation of the 1a-hydroxycycloartenoid mollic acid a-L-arabinoside from *Combretum edwardsii* leaves. **Phytochemistry**, Oxford, v. 28, p. 279–281, 1989.
- SALERMO, M.I.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Effects on growth and comparison of root tissue colonization patterns of *Eucalyptus viminalis* by pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology News**, St. Paul, v. 146, p. 317-324, 2000.
- SANA, T.R.; WADDELL, K.; FISCHER, S. M. A sample extraction and chromatographic strategy for increasing LC/MS detection coverage of the erythrocyte metabolome, **Journal Of Chromatography B**, Amsterdam, v. 875, p. 314-321, 2008.
- SANTANA, J.A.S.; SOUTO, J. S. Diversidade e estrutura fitossociológica da caatinga na estação ecológica do Seridó, RN. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Campina Grande, v. 6, p. 232-242, 2006.
- SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Discovery of aspoquinolones A–D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Cambridge, v. 4, p. 3517–3520, 2006.
- SHEN, T.; WANG, X.N.; LOU, H.X. Natural stibenes: an review. **Natural Products Reports**, London, v. 26, p. 916-935. 2009.
- SRIVASTAVA, V.; NEGI, A.S.; KUMAR, J.K., GUPTA, M.M.; KHANUJA, S.P.S. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic and Medical Chemistry**, Amsterdam, v.13, p. 5892 -5908, 2005.
- STADEN, R. The staden sequence analyses package. **Molecular Biotechnology**, Oxford, v.5, p.233-241, 1996.
- STADLER, M.; KELLER, N.P. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. **Mycological Research**, Amsterdam, v.112, p. 127–130, 2008.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane* an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, New York, v. 260, p. 214-216, 1993.

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

TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga. In: ARAÚJO, F.S. (Ed.). **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2002. p. 47-52.

TAN, F.X.; SHI, S.; ZHONG, Y.; GONG, X.; WANG, Y. Phylogenetic relationships of Combretaceae (Combretaceae) inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 115, p. 475–481, 2002.

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

TROVÃO, D.M.B.M.; FERNANDES, P.D.; ANDRADE, L.A.; DANTAS NETO, J.D. Variações sazonais de aspectos fisiológicos de espécies da Caatinga. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 11, p. 307-311, 2007.

UENOBE, F. Antimutagenic effects of resveratrol against Trp-P-1. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 373, p. 197-200, 1997.

WAGENAAR, M.M.; CLARDY, J. Dicerandrols, new antibiotic and cytotoxic dimers produced by the fungus *Phomopsis longicolla* isolated from an endangered mint[J]. **Journal Natural Products**, Washington, v. 64, p. 1006-1009. 2001.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: discovery to clinic -Thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. **Cancer Research**. Baltimore, v. 55, p. 753-760, 1995.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.

WEST, C.P., OOSTERHUIS, D.M.; WULLSCHLEGER, S.D. Osmotic adjustment in tissues of tall fescue in response to water deficit. **Environmental and Experimental Botany**, New York, v. 30, p 149-156, 1990.

ZOU, W.X.; MENG, J.C.; LU, H.; CHEN, G.X.; SHI, G.X.; ZHANG, T.Y.; TAN, R.X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal Natural Products**, Washington, v. 63, p. 1529–1530, 2000.

ZUÑIGA, A.D.G.; COIMBRA, J.S.R.; MINIM, L.A.; MEIRELLES, A.J.A. Revisão: técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimento**, Curitiba, v. 21, p. 61-82, 2003.

4 *Combretum leprosum*, DETECCÃO DE COMBRETASTATIN CA4 E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DA ATIVIDADE ANTICÂNCER E ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS BRUTOS

Resumo

Este trabalho investigou a produção de compostos do grupo estilbeno, combretastatin A4 em extratos brutos das partes aéreas de *Combretum leprosum*, além de avaliar atividade biológica tais como: antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana dos respectivos extratos. Os materiais vegetais (folhas, galhos e frutos) foram submetido a sucessivas extração em acetona, tetrahidrofurano, metanol e diclorometano e análise comparativa por espectrometria de massas com padrão Sigma combretastatin CA4 e para os ensaios *in vitro* foram utilizadas o teste de atividade antiproliferativa por citotoxicidade frente a células cancerígenas (MCF-7, NCI-ADR/RES, OVCAR-3, PC-3, HT-29, NCI-H460, 786-S, UACC-62, K-562) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e nove patógenos para verificar a atividade antimicrobiana pelo método de difusão e concentração inibitória mínima. Foi detectado a possível presença de compostos com mesma massa molecular e tempo de retenção característicos do padrão CA4 em todas as partes da planta estudadas (folhas, galho e fruto), as maiores concentrações foram observadas nas amostras foliares. Contudo, é necessário obtenção de mais dados espectrométricos para tal confirmação, o solvente mais eficaz na extração da CA4 foi o THF. Os dados do ensaio *in vitro* mostram que extratos de diclorometano de folhas (CLF) apresentou atividade inibitória para carcinoma de ovário ($\text{IC}_{50} = 12$), carcinoma de próstata ($\text{IC}_{50} = 9,8$), carcinoma de pulmão ($\text{IC}_{50} = 10$), e carcinoma de mama ($\text{IC}_{50} = 14$). O extrato bruto de galho (CLG) foi inativo para a maioria das linhagens testadas, apresentando atividade apenas contra carcinoma de cólon retal ($\text{IC}_{50} = 44$). As concentrações inibitórias mínimas do extrato bruto de *C. leprosum* variaram entre 62- 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A atividade mais forte foi observada contra *Bacillus cereus* e *Agrobacterium tumefaciens* (MIC do 62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), com efeitos moderados contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* (MIC de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Atividades antimicrobiana e anticâncer com acetato de etila foram em geral mais eficaz para os ensaio *in vivo*. Este trabalho apresenta resultados promissores para produção de antitumorais por plantas da caatinga, compostos estes que so tem registro na espécie *Combretum cafferum* da Africa, confirmando a riqueza metabólica associada a necessidade de busca da diversidade intocada do bioma caatinga, uma reserva da biosfera.

Palavras-chave: Combretaceae; *Combretum leprosum*; Combretastatin; Antimicrobiano; Anticâncer

Abstract

This study investigated the production of compounds of the stilbens group, combretastatin A4 in crude extracts of the aerial parts of *Combretum leprosum*, and evaluate activities: antioxidant, anticancer and antimicrobial of extracts. The plant material (leaves, branch and fruits) were subjected to successive extraction in acetone, methanol and dichloromethane in comparative analysis by mass spectrometry standard combretastatin CA4 and *in vitro* assays were used to test for antiproliferative activity against cytotoxicity cancer cells (MCF-7 NCI-ADR/RES, OVCAR-3, PC-3, HT-29, NCI-H460, 786-S, UACC-62, K-562) at concentrations of 0.25, 2, 5, 25 and 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and nine pathogens to determine the antimicrobial activity by the diffusion method and minimum inhibitory concentration. Detected the possible presence of compounds with the same molecular mass and retention time standard characteristics CA4 in all parts of the plant studied (leaves, fruit and branch), the highest concentrations were seen in the leaf samples. However, is further required to obtain spectral data for confirmation, the most effective solvent extraction of the THF was CA4. The test data show that *in vitro* dichloromethane extracts of leaves (CLF) inhibitory showed activity for ovarian cancer ($\text{IC}_{50} = 12$), prostate carcinoma ($\text{IC}_{50} = 9.8$), lung carcinoma ($\text{IC}_{50} = 10$), and carcinoma breast ($\text{IC}_{50} = 14$). The crude extract from branch (CLG) was inactive for most of the strains tested, showing activity only against colorectal carcinoma ($\text{IC}_{50} = 44$). The minimum inhibitory concentrations of the crude extract of *C. leprosum* ranged from 62 to 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The strongest activity was observed against *Bacillus cereus* and *Agrobacterium tumefaciens* ($\text{MIC } 62.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), with moderate effects against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* ($\text{MIC } 125 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Antimicrobial and anticancer activities with ethyl acetate were generally more effective for *in vivo* assay. This study shows promising results for the production for antitumor by caatinga plants, this compound has a record that only the species of *Combretum cafferum* Africa, confirming associated metabolic diversity of pristine caatinga biome, biosphere reserve.

Keywords: Combretaceae; *Combretum leprosum*; Combretastatin; Antimicrobial; Anticancer

4.1 Introdução

Os produtos naturais continuam a desempenhar um importante papel na descoberta e desenvolvimento de drogas, e plantas medicinais têm sido uma fonte rica de muitos compostos com grande produção de moléculas bioativas e ajudar a prevenir o desenvolvimento de graves doenças (BUTLER, 2004; RIPA et al., 2009; SANTOS et al., 2011).

A família Combretaceae compreende espécies de árvores, arbustos e lianas, com distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, e são amplamente utilizados

para fins medicinais na África, Ásia, América do Sul e Índia (PETTIT et al., 1987; TAN et al., 2002). O gênero mais amplo é o *Combretum*, conhecido por muitas aplicações, incluindo o tratamento de distúrbios abdominais, infecções bacterianas, câncer e doenças cardíacas, doenças de pele, dores de garganta, problemas gástricos (FYHRQUIST et al., 2002; PETTIT et al., 1987; MCGAW et al., 2001). Estudos fitoquímicos destas plantas indicam a presença de triterpenóides, flavonóides, fenantrenos, taninos, saponinas, estilbenos, polifenóis responsáveis por tais ações terapêuticas e que desenvolvem funções antimicrobianas contra microorganismos fitopatógenos nas espécies que as possuem. Dentre os principais compostos de importância clínica extraídos desta família em outros países, as combretastatins (estilbenos), com ação antitumoral inibindo a divisão celular, tem sido considerada uma das mais promissoras drogas anticancerígenas por seu excelente mecanismo de ação (TAN et al., 2002).

Combretum leprosum Mart & Eich encontra-se distribuído na região semiárida do nordeste brasileiro, é conhecido como mofumbou ou mufumbo, são utilizados como anti-inflamatório, antitumoral, antidiarréico, entretanto, há poucos relatos fitoquímicos dos compostos responsáveis pelas ações farmacológicas apresentadas, principalmente no que se diz respeito à ação antitumoral (PIETROVSKI et al., 2006; AGRA et al., 2007; LOPES et al., 2010). Desta forma, este estudo teve como objetivo determinar a possível produção do composto combretastatin (CA4), por *Combretum leprosum* e avaliar atividades biológicas dos extratos orgânicos obtidos.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Área de coleta

Segundo dados presentes nos registros do herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), a espécie *Combretum leprosum* possui distribuição por toda região de caatinga do semiárido nordestino brasileiro. De acordo com tais informações foram estabelecidos os locais de coleta nos estados de Bahia, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba (Figura 4.1). Netas áreas foram coletadas partes das plantas (folhas, galhos e frutos) segundo os padrões internacionais de coleta incluindo as coordenadas geográficas como exposto na tabela 4.1. A identificação das espécies botânicas foi realizada pelo botânico MSc Cosme Correia

Santos do HUEFS, exsicatas encontram-se depositadas neste herbário. A coleta foi realizada durante o período de chuva, abril de 2009 (em função do estado fenológico da espécie da planta incluído a coleta de flores, frutos e sementes).



Figura 4.1 - Pontos de coletas selecionados para coleta das espécies de *C. leprosum*, na região de caatinga do semiárido do nordeste brasileiro. Google, 2009

Tabela 4.1 - Pontos de coletas do *Combretum leprosum* na região de caatinga do semiárido do nordeste brasileiro

Estados	Município	Coordenadas
Bahia	Morpará	S10°26'55,7" W43°29'13,6"
Piauí	Caracol – Peixe	S09°27'00,8" W43°23'48,3"
Ceara	Chapada Aba da Serra	S05°55'33,7" W 39°31'44,4"
Rio Grande do Norte	Serra Negra do Norte	S06°39'12,9" W37°26'49,1"
Paraíba	Cajazeiras	S06°51'27,2" W38°40'42,6"

4.2.2 Estudo químico e biológico de metabólitos secundários vegetais do *Combretum leprosum* do semiárido brasileiro

Para a investigação da produção do composto químico do grupo estilbeno, combretastatin A4 (Sigma) pelo *C. leprosum*, o material vegetal (folhas, galhos e fruto) foi seco em temperatura ambiente, triturados separadamente e submetidos à maceração primeiramente em diclorometano durante 24 horas. Após a maceração e filtração, o solvente foi eliminado em rotaevaporador (40°C, 100 rpm, a pressão reduzida) resultando em extrato bruto dessecado. Os marcros vegetais foram recolocados em maceração, repetido o processo descrito anteriormente com os

solventes, tetrahidrofurano (THF) e acetona, uma sequencia crescente de polaridade, de acordo com a metodologia descrita por Pettit et al.(1987), que consiste nas condições de isolamento e síntese da combretastatin como exposto na figura 4.2. Além disso, foram realizadas extrações em acetato de etila, clorofórmio e metanol de cada parte vegetal potencializando a extração de outros compostos possivelmente produzidos pela planta além da CA4.

O padrão comercial combretastatin A4 (Sigma), o qual extraído e purificado de extrato bruto de *Combretum cafferum* Eckl. et Zeyh e os extratos vegetais foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Varian 1200L LC-ESI-MS) com ionização por electrospray em modo positivo. Isto foi realizado para observar a presença de tal composto nos extratos vegetais de *C. leprosum*. As condições dos instrumentos foram: Varian 1200L LC/MS (triplo quadripolo), modo positivo para ESI, temperatura de secagem de gás (azoto) a 250⁰C e as condições cromatográficas de taxa de fluxo: 0,4 mL / min, com fase móvel como eluente metanol: ácido acético a 0,1%; coluna do tipo RP Phenomex Fusion 80,4 μ , 150mm x 4,60milímetros e modo digitalizado - 316-318 m/z.

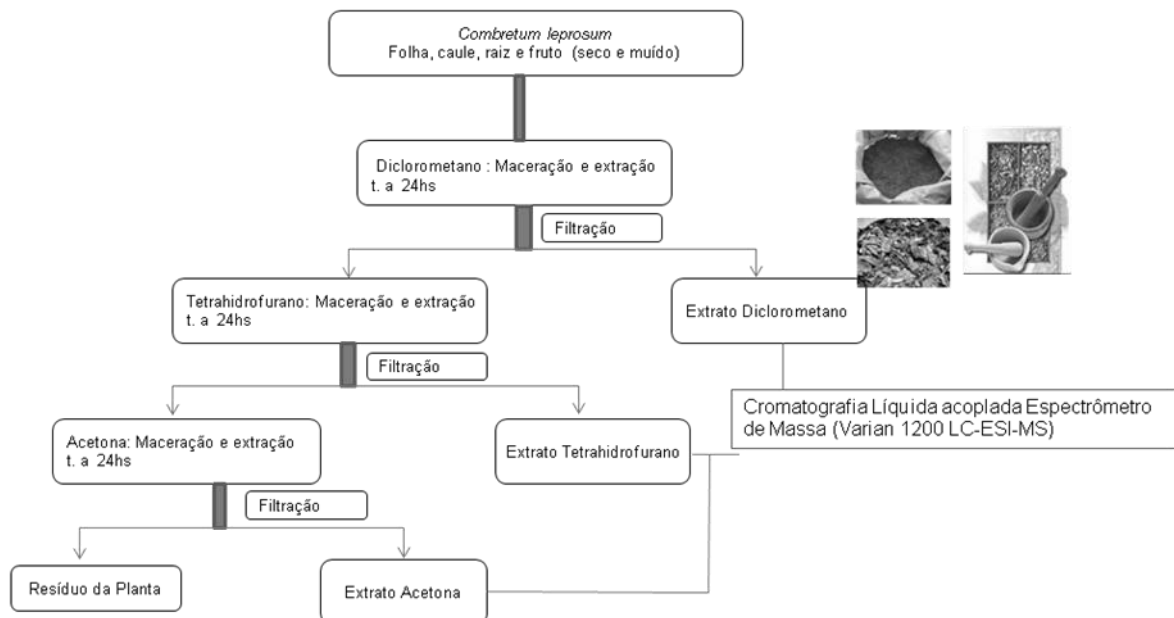


Figura 4.2 - Fluxograma do processo de extração de *Combretum leprosum* com a sequencia de solventes utilizados, em crescente polaridade de acordo com a metodologia da USPatente Combretastatin A4 Pettit et al. 1987

4.2.3 Avaliação da atividade antitumoral dos extratos vegetais

A inibição do crescimento celular, um indicador de citotoxicidade, causadas pelos compostos dos extratos vegetais foram avaliados frente a culturas de células tumorais humanas de U251 (glioma); UACC-62 (melanoma); MCF-7 (ATCC – HTB-22, carcinoma de mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 786-0 (ATCC-CRL-1932, carcinoma de rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (ATCC CRL 1435, carcinoma de próstata); OVCAR-3 (ATCC HTB 161, carcinoma de ovário); HT29 (ATCC HTB-38 carcinoma de cólon retal); o mesmo ensaio foi realizados em células normais de rim de macaco VERO (ATCC-CCL81), segundo metodologia descrita por Mosmann e colaboradores (1983), utilizando doxorrubicina como controle positivo. Este ensaio foi realizado no Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, CPQBA – Unicamp.

As células foram cultivadas em microplacas com 96 poços em meio de cultura DMEM ou RPMI 1640, a 10% de soro bovino fetal, na concentração de $1 \cdot 10^5$ células/mL e incubadas à 37°C, 5% de CO₂. Após 20h de crescimentos, foram adicionadas diferentes diluições dos extratos vegetais nas concentrações de 0,25; 2,5, 25 e 250 µg.mL⁻¹ solubilizadas em DMSO/RPMI e re-incubadas à 37°C, 5% de CO₂ por 48h, cada uma em triplicata. No controle negativo, as células foram crescidas na ausência de qualquer composto somente meio de cultura contendo DMSO 0,5% e no controle positivo foram crescidas em meio contendo Doxorrubicina (Eurofarma).

O teste de citotoxicidade adotado baseia-se na coloração de proteínas, pelo corante sulforodamina B (SRB, Sigma). Este corante possui dos grupos sulfônicos, e liga-se às proteínas fixadas na placa, cujas proteínas são precipitadas pelo Ácido Tricloro Acético (TCA - Sigma). E detes modo, em 48 h, o meio foi removido e substituído por 100 µL de TCA 40%, 30 minutos. As placas foram incunadas por 30min, a 4°C e posteriormente removeu-se a solução de TCA, lavou-se as placas e adicionou 50µL de SRB 0,1% (diluido em ácido acético 1%) e reinibidas em temperatra ambiente por 30 minutos e proliferação celular foi determinado pela quantificação espectrofotométrica (540 nm) .

Foram obtidas as absorbâncias: amostras-teste (T), controle negativo (CN), branco das amostras-teste e a leitura do início da incubação, ou seja, antes da

adição das amostras-teste (T0). A inibição de crescimento - IC (%) de cada amostra-teste, foi calculada em programa Excel 2007, utilizando-se as fórmulas segundo Monks et al. (1991):

- T > CN, a droga estimulou o crescimento, não é possível o cálculo da IC₅₀; Se T ≥ T0 e < CN, (efeito citostático): $IC_{50} = 100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$; Se T < T0 (efeito citocida): $IC_{50} = 100 \times [(T-T_0)/(C)]$.

A dose que inibe 50% do crescimento celular (IC₅₀) foi determinada graficamente em programa para gráficos e análises de dados (Microcal Origin Versão 6.0) e Microsoft Office Excel 2007. Extratos que apresentam IC₅₀ ≤ 30µg/mL são considerados ativos (ITARATH et al., 2004).

4.2.4 Avaliação do potencial antimicrobiana

4.2.4.1 Os micro-organismos testes:

Os micro-organismos testados foram oito linhagens bacterianas patogênicas humanas: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (CCMA 120), *Escherichia coli* (CCMA 104), *Klebsiella pneumoniae* (CCMA 540), *Burkholderia cepacia* (CCMA 92), *Staphylococcus aureus* (CCMA 190), *Staphylococcus schleiferi*, *Salmonella thyfe* (CCMA 85), *Agrobacterium tumefaciens* e três linhagens fúngicas fitopatogênicas *Pythium aphanidermatum* (CCMA 243), *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*. Os micro-organismos testes foram obtidos a partir da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia Ambiental, EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, Brasil. Todas as linhagens bacterianas e fúngicas foram crescidas em meio de cultura respectivamente em agar nutriente (NA) e Agar dextrose batata (BDA), a 28°C por 24 h para linhagens bacterianas e ate 4 dias para linhagens fúngicas.

4.2.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos vegetais de *C. leprosum*

A atividade antifúngica foi avaliada pela técnica de difusão em agar, Kirby-Bauer (1960), utilizando-se disco de papel (diâmetro ¼ IN) autoclavados e impregnados com 5µL (5mg.ml⁻¹) da suspensão dos extratos brutos contra disco de

5 mm do fitopatógono em BDA, 28°C, por 24h. Após este período foi observado se houve ou não a formação de halos de inibição. Como fármacos controle a nistatina foi utilizada. A atividade antibacteriana foi realizada de acordo com a técnica de microdiluição do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004), com adaptações. Colônias isoladas crescidas por 24 horas foram ressuspensas e diluídas em solução salina a 0,85%, a fim de se obter a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para tanto, foi utilizado um aparelho espectrofotométrico (A-Just TM- Abbot, Chicago, EUA) em absorvância de 625nm. Em microplacas de 96 poços foram adicionada um volume total de 200µL (95µL de caldo de cultura + 5µL suspensão de bacteriana na concentração de $2 \cdot 10^5$ UFC/mL + 95µL dos extratos testes) e incubadas por 24h a 37°C. Foram utilizadas as concentrações entre $3,9 - 500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ dos extratos brutos de folha, galho e fruto e os respectivos solventes extratores (acetato de etila, clorofórmio e metanol). Como controles foram utilizados meio de cultura (controle negativo), meio de cultura e as bactérias, para análises da viabilidade das linhagens testadas. Como fármacos controle foi utilizada a cloranfenicol a $25 \mu\text{mol}^{-1}$. A microplaca foi incubada a 37°C e após 24 horas, foram adicionado 25µL de 1-cloreto2,3,5-trifenil-2H-tetrazolium (Sigma Chemical, USA) em salina. A microplaca foi re-incubada a 37°C e após 3 horas a leitura foi realizada leitora ocular para determinação da concentração inibitória mínima, definida pela menor concentração de droga capaz de impedir o crescimento bacteriano. A permanência da cor avermelhada indicou crescimento bacteriano. Todos os testes foram realizados em triplicatas.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Estudo fitoquímico dos metabólitos de *Combretum leprosum* quanto a presença da Combretastatin A4

De acordo com avaliação fitoquímica dos compostos obtidos dos extratos brutos das partes aéreas de *Combretum leprosum*, foram observados a presença de compostos com mesma massa molecular e tempo de retenção característicos o padrão CA4 correspondente à $317,2 \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$, segundo a análise em LC/MS,

apresentado na figura 4.3. Entretanto, para confirmação exata da produção de fato da CA4 é necessário a obtenção de mais dados espectrométricos MS (MS/MS), análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono.

Pettit et al. (1991), autores responsáveis pelo isolamento e síntese da CA4 de extratos da casca de *Combretum caffrum* utilizaram solventes em sequencia crescente de polaridade e mostraram que os solventes mais eficientes na extração de CA4 foram tetrahidrofurano (THF) e diclorometano (DCM). Com relação aos resultados obtidos em nosso trabalho o solvente mais eficaz na extração da CA4 foi o THF, corroborando com os dos autores acima, o pico correspondente a $317,2\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ foi detectado em todas as partes da planta estudadas (folhas, galho e fruto). Contudo, as maiores concentrações foram observadas nas amostras foliares e não nos galhos como as análises de Pettit et al.(1987, 1988). Na tabela 4.2 encontram-se os resultados das análises realizadas com os extratos em diferentes solventes e as partes das plantas.

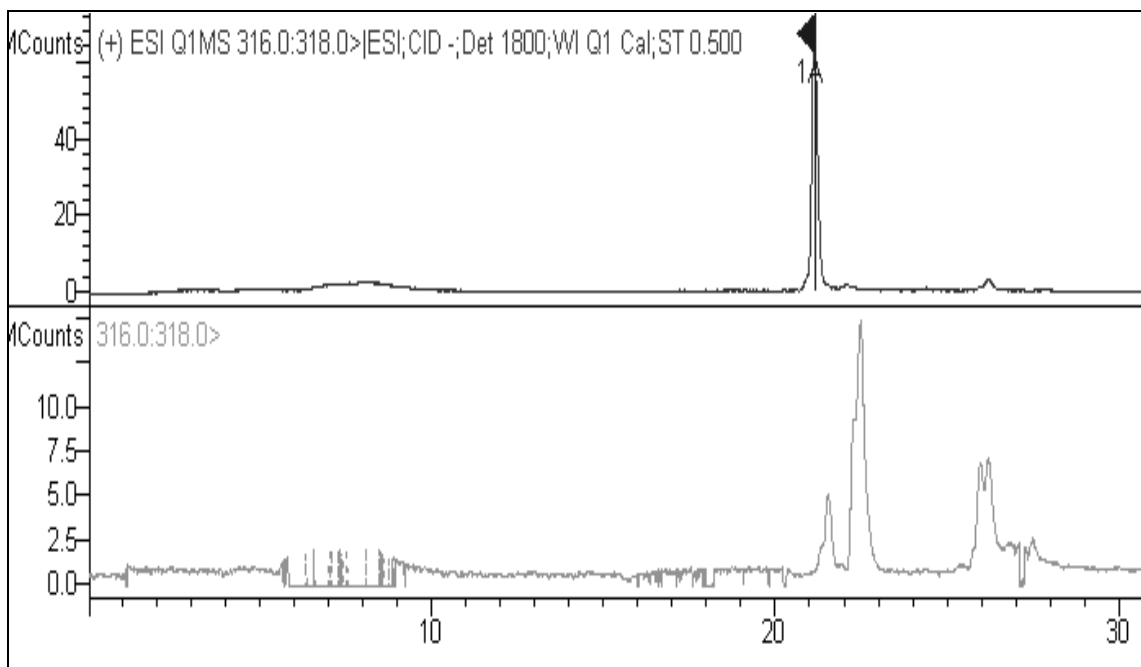


Figura 4.3 - Cromatograma LC-ESI-MS, (espectro superior) Padrão da Combretastatin A4, (espectro inferior) Extrato bruto de folha extraído com THF

Tabela 4.2 - Detecção da presença da Combretastatin A4 nos extratos brutos das partes vegetais de *C. leprosum* de acordo com os solventes utilizados

Extrato vegetal	Presença de CA4		
	THF	DCM	ACT
CLF ¹	+++	++	-
CLG ²	++	+	-
CLFR ³	++	+	-

¹ *C. leprosum* extrato de folha, ² *C. leprosum* extrato de galho, ³ *C. leprosum* extrato de fruto; THF (Tetrahidrofurano), DCM (Diclorometano), ACT (Acetona), CA4 (Combretastatin A4); (+++) alta concentração; (++) moderada concentração, (+) baixa presença, (-) ausência de CA4.

4.3.2 Atividade antitumoral dos metabólitos vegetais de *C. leprosum*

Os resultados da atividade antitumoral *in vitro* dos extratos brutos vegetais frente às linhagens celulares cancerígenas, estão apresentados na tabela 4.3, onde são expostos os valores de IC₅₀. Os extratos brutos de diclorometano dos frutos de *C. Leprosum* (CLFR) apresentaram significativa atividade inibitória contra carcinoma de rim, carcinoma de ovário, glioma, carcinoma de mama; enquanto que o extrato bruto de diclorometano de folhas (CLF) apresentou atividade inibitória para carcinoma de ovário, carcinoma de próstata, carcinoma de pulmão e carcinoma de mama. O extrato bruto de galho (CLG) foi inativo para a maioria das linhagens testadas, apresentando atividade apenas contra carcinoma de cólon retal. Entretanto, nenhum dos extratos foi mais potente que o controle positivo, a Doxorubicina. Todos os extratos não apresentaram atividade contra a linhagem melanoma UACC-62.

Entretanto, os autores Queiroz et al. (2010) em seus estudos de atividade antitumoral com extratos brutos etanólicos de galhos de *C. leprosum* apresentaram forte atividade apenas para carcinoma de rim com IC₅₀ = 1,8 µg/mL⁻¹ e moderada atividade para carcinoma de próstata. Como os solventes extratores foram de diferentes polaridades químicas, possivelmente, os metabólitos obtidos e a concentração são diferentes das obtidas em nosso trabalho.

Tabela 4.3 - Efeito antitumoral (IC₅₀) dos extratos orgânicos de *Combretum leprosum* em células neoplásicas em período de incubação de 48 horas

	U251	UACC	MCF7	NCI	746-0	NCI-H460	PC-3	OVCA R-03	HT29	VERO
DXB	0,68	>25	0,56	2,3	0,73	0,15	1,0	1,8	0,85	3,2
CLG	70,7	>250	81,1	>250	94,9	121,1	73,2	122,7	44,2	45
CLF	22,1	>250	14,4	124,7	138,7	10,0	9,8	12,0	20,6	31
CLFR	13,5	>250	14,1	23,3	8,7	30,3	21,8	10,0	17,0	32

(DXB – Doxorubicina, CLG – *C. leprosum* galho; CLF – *C. Leprosum* folha; CLFr – *C. Leprosum* fruto); U251 (glioma); UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário resistente a múltiplos fármacos); 746-0 (rim); NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCA-3 (ovário); HT29 (color retal); VERO (célula epitelial renal, macaco verde)

A atividade antitumoral de frações que continham CA4 de galho de *C. cafrum*, apresentaram forte atividade para linhagens tumorais leucêmicas de camundongos como também de carcinoma de cólon (PETIT et al., 1988). Em nosso trabalho todos os extratos brutos de *C. leprosum* apresentaram atividade inibitória contra a linhagem tumoral HT29 de carcinoma de colon retal, sendo as maiores atividades observadas pelos extratos brutos do fruto e da folha. Isto pode indicar que possivelmente uma das substâncias responsáveis por tal ação poderá ser a CA4, entretanto, estudos futuros são necessários para tal confirmação. A atividade antitumoral dos extratos obtidos a partir das partes vegetais de *C. leprosum* observado neste modelo de experimento sugere a participação de diferentes compostos com diferentes mecanismos de ação.

A figura 4.4 apresenta os gráficos que expõem a porcentagem de crescimento das linhagens neoplásicas após 48 h de exposição em 4 diferentes concentrações (0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL) dos extratos CLF, CLFR, CLG. Os valores positivos em relação ao eixo y correspondem à atividade citostática, enquanto os outros se referem à atividade citotóxica.

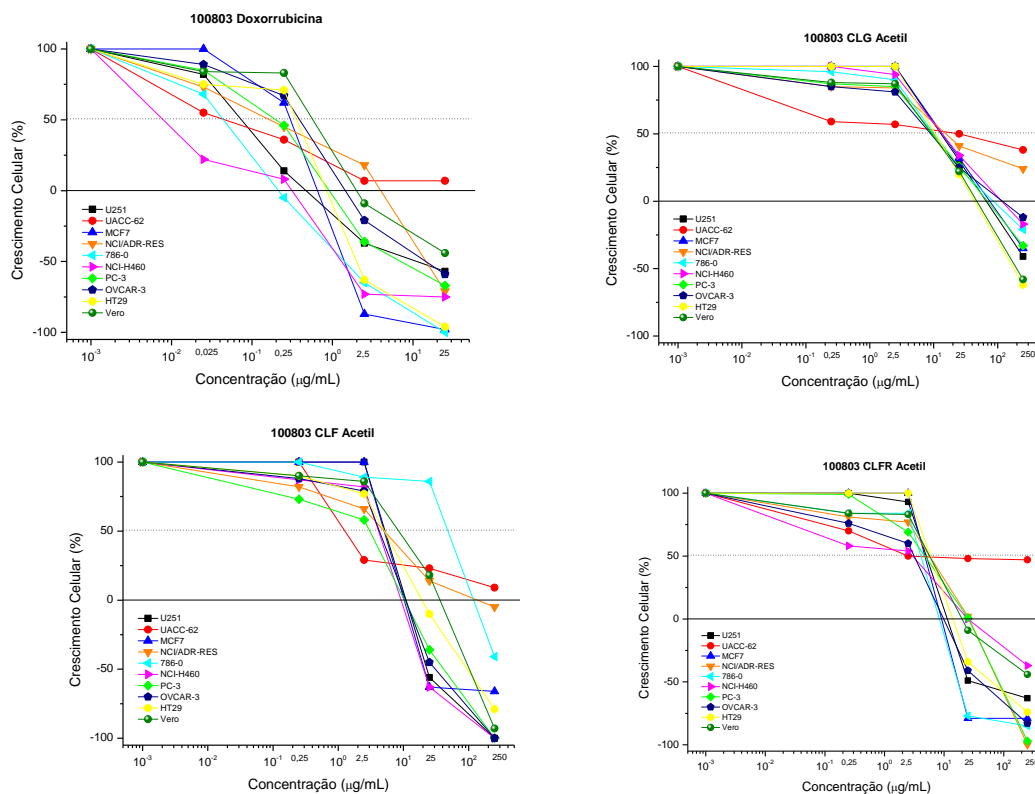


Figura 4.4 - Porcentagem de inibição do crescimento celular de linhagens tumorais de acordo com as concentrações em 48 horas

4.3.3 Atividade antimicrobiana dos metabólitos vegetais de *C. leprosum*

Neste trabalho a detecção de ação antibiótica foi definida como a produção de metabólitos secundários específicos (antibióticos) com ação contra fungos e bactérias. Para a determinação quantitativa da atividade antibacteriana nós utilizamos o método de microdiluição, adaptado da NCCLS (2004) para obter a menor concentração de inibição, tal procedimento pode eliminar problemas associados com as técnicas de difusão em agar, como por exemplo, as dificuldades na difusão de extratos não-polares através de uma matriz aquosa de agar resultando num falso negativo.

As concentrações inibitórias mínimas do extrato bruto de *C. leprosum* variaram entre 62- 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A atividade mais forte foi observada contra *Bacillus cereus* e *Agobacterium tumefaceis* (MIC do 62.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), com efeitos moderados contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* (MIC de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$), como mostrado na tabela 4.4 A atividade antimicrobiana dos extratos de metanol de folhas

e dos galhos indica amplo espectro de ação tanto para bactérias Gram-negativas quanto para Gram-positivas, além de serem mais eficazes em menores concentrações, de acordo com as técnicas utilizadas neste estudo. Dos compostos obtidos dos frutos de *C. Leprosum* apenas os extraídos pelo solvente orgânico metanol foram capazes de apresentar inibição nas linhagens bacterianas testadas.

Para atividade antifúngica, *Rhizoctonia solani* foi o mais susceptível aos extratos e o *Pythium aphanidermatum* foi o mais resistente à ação dos metabólitos. Apenas os compostos extraídos por metanol do fruto apresentaram moderada inibição no crescimento micelial de *R. Solani*. Além disso, pode-se observar que possivelmente os compostos que apresentam atividade antifúngica podem ser diferentes dos que apresentam atividade antibacteriana devido à diferença de potencial de ação observada. Os solventes utilizados extraíram diferentes compostos dos mesmos órgãos vegetais, pelo menos de acordo com a bioatividade observada neste trabalho. Investigações químicas de extratos de espécies *Combretum* sp. apresentaram valores mínimos de inibição entre 1 a 6 mg.mL⁻¹, as Gram-positivas foram mais sensíveis que as Gram-negativas (ELOFF et al., 2008) flavonóides, combretastatin, alpenitin, pinocembrin, quercetina, rhamnazin, apigenin, ácido arjunólico (MARTINI et al., 2004; ELOFF et al., 2006; MASOKO 2005).

Tabela 4.4 - Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais obtidos de diferentes solventes extratores de partes aéreas de *Combretum leprosum*

Extrato Vegetal	Fungo (5mg.mL ⁻¹)				Bactérias/MIC (µg.mL ⁻¹)					
	<i>P.a.</i>	<i>Rs</i>	<i>Sr</i>	<i>Sa</i>	<i>Pa</i>	<i>Ec</i>	<i>Ef</i>	<i>Kp</i>	<i>Bc</i>	<i>At</i>
CLF ¹ AcEt	(-)	(+)	(+)	250	125	500	250	250	250	250
CLF ¹ MeOH	(-)	(+)	(-)	250	250	250	250	250	125	62.5
CLF ¹ Clorofórmio	(+)	(-)	(-)	250	250	250	125	250	125	250
CLG ² AcEt	(-)	(-)	(-)	250	250	250	125	500	125	125
CLG ² MeOH	(-)	(-)	(+)	250	125	250	250	250	62.5	125
CLG ² Clorofórmio	(-)	(-)	(-)	250	125	500	250	500	125	125
CLFr ³ AcEt	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CLFr ³ MeOH	(-)	(-)	(-)	500	250	500	125	500	250	(-)
CLFr ³ Clorofórmio	(-)	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

¹*C. leprosum* extrato de folha, ²*C. leprosum* extrato de galho, ³*C. leprosum* extrato de fruto; AcEt (acetato de etila), MeOH (metanol); (++) moderada inibição, (+) fraca inibição, (-) ausência de inibição; MIC (Concentração inibitória mínima). *Pa* (*Pythium aphanidermatum*), *Rs* (*Rhizoctonia solani*), *Sr* (*Sclerotium rolfsii*), *Sa* (*Staphylococcus aureus*), *Pa* (*Pseudomonas aeruginosa*), *Ec* (*Escherichia coli*), *Ef* (*Enterococcus faecalis*), *Kp* (*Klebsiella pneumoniae*), *Bc* (*Bacillus cereus*), *At* (*Agrobacterium tumefaciens*).

Além disso, estudos fitoquímicos de extratos etanólicos de *C. leprosum* descrevem a presença de outras substâncias como ácido málico, ácidos graxos, o triterpeno 3β,6β,16β-trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL) (capaz de inibir a nocicepção (dor) provocada em diferentes modelos como a hiperalgesia visceral), flavonóides glicosilados, 3-O-metilquercetina e quercetina (atividade antioxidante) (FACUNDO et al., 1993, 2005; PIETROVSKI et al., 2006).

Portanto, os resultados encontrados confirmam o potencial de metabólitos com ação biológica antitumoral e antimicrobiana produzidas por plantas da caatinga, além disso, evidencia-se a possível presença de um promissor anticancerígeno comercial combretastatin CA4, que atualmente têm-se registro apenas em espécie *Combretum cafferum* da África, confirmando que a bioprospecções em biomas como

a caatinga, uma diversidade intocada, constitui alternativas reais para fonte de compostos de interesse biotecnológico.

Referências

AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.; COELHO, V.P. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 111, p. 383-95, 2007.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 67, p. 2141–2153, 2004.

ELOFF, J.N.; KATERERE, D.R.; MCGAW, L.J. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v.119, p. 686–699, 2008.

ELOFF, J.N.; ANGEH, I.; MCGAW, L.J. A plant antifungal product from *Melianthus comosus* (Melianthaceae) leaf extracts GA Conference Helsinki, **Planta Medica**, Stuttgart, v. 72, p. 982, 2006.

FACUNDO, V.A.; ANDRADE, C.H.S.; SILVEIRA, E.R.; BRAZ-FILHO, R.; HUFORD, C.D. Triterpenes and flavonoids from *C. leprosum*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 32, p. 411–415, 1993.

FACUNDO, V.A.; RIOS, K.A.; MEDEIROS, C.M.; MILITAO, J.S.L.T.; MIRANDA, A.L.P.; EPIFANIO, R.A.; CARVALHO, M.P.; ANDRADE, A.T.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M. Arjunolic acid in the ethanolic extract of *Combretum leprosum* root and its use as a potential multi-functional phytomedicine and drug for neurodegenerative disorders: antiinflammatory and anticholinesterasic activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, p. 1309-1312, 2005.

FYHRQUIST, P.; MWASUMBI, L.; HAEGGSTROM, C.A.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; VUORELA, P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 79, p. 169–177, 2002.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of the medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 90, p. 33-38, 2004.

LOPES, L.S.; MARQUES, R.B.; PEREIRA, S.S.; AYRES, M.C.; CHAVES, M.H.; CAVALHEIRO, A.J.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; ALMEIDA, F.R.C. Antinociceptive effect on mice of the hydroalcoholic fraction and epicatechin obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 43, p. 1184-1192, 2010.

MARTINI, N.D.; KATERERE, D.R.P.; ELOFF, J.N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 93, p. 207–212, 2004.

MASOKO, P.; ELOFF, J.N. The diversity of antifungal compounds of six South African *Terminalia* species (Combretaceae) determined by bioautography, **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 4, p. 1425–1431, 2005.

MCGAW, L.J.; RABE, T.; SPARG, S.G.; JAGER, A.K.; ELOFF, J.N.; VAN STADEN, J. An investigation on the biological activity of *Combretum* species. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 75, p. 45-50, 2001

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFE, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; BOYD, M.R. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen utilizing a diverse panel of human tumor cell lines in culture. **Journal Natural of Cancer Institute**, Oxford, v. 83, p. 757-766, 1991.

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

NATIONAL COMMITTEE CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**: performance standards for antimicrobial susceptibility testing; approved standart. (Norma M7-A5). 5th ed. Wayne: Wayne 4th The National Committee for Clinical Laboratory, 2004. 49 p. (Standards Documents, M100-S14).

PETTIT, G.R.; HERALD, D.L.; SINGH, S.B.; THORNTON, T.J.; MULLANEY, J.T. Antineoplastic agent. 2202 Synthesis of natural (-)-dolastatin 15. **Journal American Chemistry Society**, Washington, v. 113, p. 6692-6693, 1991.

PETTIT, G.R.; SINGH, S.B.; NIVEN, M.L.; HAMEL, E.; SCHMIDT, J.M. Isolation, structure, and synthesis of combretastatins A- 1 and B- 1, potent new inhibitors of microtubule Assembly, derived from *Combretum caffrum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 50, p. 119-131, 1987.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta, 6beta, 16beta-trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, New York, v. 83, p. 90-99, 2006.

QUEIROZ L.M.M.; MATOS, M.F.C.; PERDOMO, R.T.; ZORZATTO J.R.; GARCEZ W.; GARCEZ F.R. Atividade *in vitro* da atividade antineoplásica de plantas do cerrado. Disponível em:
<<http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=478>>. Acesso em: 13 nov. 2010.

RIPA, F.A.; NAHAR, L.; HAQUE, M.; ISLAM, M.M. Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant activity of crude extract of *Marsilea quadrifolia*. **European Journal of Scientific Research**, Amsterdam, v. 33, p. 123–129, 2009.

SANTOS, S.N.; OLIVEIRA, L.K.X.; MELO, I.S.; VELOZO, E.S.; ROQUE, M.R.A. Antifungal activity of bacterial strains from the rhizosphere of *Stachytarpheta crassifolia*. **Africa Journal of Biotechnology**, Nigeria, v. 10, p. 4996-5000, 2001.

TAN, F.X.; SHI, S.H.; ZHONG, Y.; GONG, X.; WANG, Y.G. Phylogenetic relationships of Combretaceae inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 115, p. 475–481, 2002.

5 ISOLAMENTO DE FUNGOS ENDOFITICOS DE *Combretum leprosum* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Resumo

O escopo deste trabalho foi o isolamento de fungos endofíticos a partir de folhas, caules e raízes de *Combretum leprosum*, planta endêmica do semiárido brasileiro, coletada em cinco estados brasileiros (BA, PI, CE, PB e RN) e avaliação das propriedades antimicrobianas dos respectivos metabólitos obtidos dos endofíticos. Os isolados foram obtidos pela técnica de fragmentação dos tecidos vegetais, em meio agar água, BDA, Martin a 28°C. Para obtenção dos extratos os isolados foram cultivadas em meio BDA, e os fragmentos miceliais foram triturados em tubos de ensaio contendo 3mL e extraído utilizando acetato de etila. Para avaliação da atividade antibacteriana foi realizado o ensaio de difusão em disco e para atividade antifúngico foi realizado o antagonismo direto dos extratos contra disco do fitopatógenos de 5mm, em BDA, 28 °C, por 24h. 405 endofíticos fúngicos foram isolados, 44% de fragmentos foliares, 45% de caule e 11% de fragmentos radiculares. Destes 47% apresentaram atividade inibitória contra *R. solani* e 7% contra *P. aphanidermatum*. Dentre os 28 extratos em potencial os isolados foram cultivado em larga escala em caldo Czapek, os filtrados particionados em diclorometano em múltiplos pH. Os compostos obtidos em pH ácido apresentou amplo mecanismo de ação para fungos e bactérias (Gram-positiva e Gram-negativas), *S. schelfer* foi a mais sensível de todas as bactérias, na presença do extrato 03 (pH ácido) com halo de inibição de 40 mm, seguido de *S. aureus*, *B. pumilis* com halos de inibição ≥ 20 mm (extrato 108a, 223a, 410a, 136a, 236a). Os metabólitos dos extratos 17a, 17b, 170b, 335b apresentaram atividade apenas para linhagens bacterianas Gram-positivas. Além disso, os extratos fúngicos foram submetidos à análise comparativa utilizando a técnica LC/MS e tendo como padrão a combretastatin A4, com o objetivo de verificar se os mesmos possuíam tal substância assim como a planta, entretanto, não foram detectados sinais correspondentes ao padrão CA4 nos extratos analisados. Os resultados indicam possibilidades exploratórias de produtos naturais em endofíticos isolados de planta endêmica de ambientes extremos no Brasil como a caatinga.

Palavras-chave: Semiárido; Caatinga; Endofítico; *Combretum leprosum*; Atividade antimicrobiana

Abstract

The scope of this work was the isolation of endophytic fungi from leaves, stems and roots of *Combretum leprosum*, an endemical plant from Brazilian semi-arid region, collected in five Brazilian states (Ba, PI, CE, RN and PB) and evaluation of antimicrobial properties of their metabolites obtained from endophytes. The isolates were obtained by technique of fragmentation of plant tissues in water agar, PDA and Martin at 28°C. To obtain extracts of the isolates were grown on PDA and mycelial fragments were crushed in test tubes containing 3 mL and extracted using ethyl acetate. To evaluate the antibacterial activity test was performed disk diffusion and antifungal activity was carried out direct antagonism of the extracts against pathogens 5mm disc in BDA, 28°C for 24h.

405 were isolated endophytic fungi, 44% of fragments of leaves, stem 45% and 11% of root pieces. Of these 47% had inhibitory activity against *R. solani* and 7% against *P. aphanidermatum*. Among the potential 28 extracts, isolates were grown on a large scale Czapek broth, the filtrates are partitioned into dichloromethane at multiple pH. The compounds from at acidic pH showed broader action of mechanism for fungi and bacteria (Gram-positive and Gram-negative), *S. schelfer* was the most sensitive of all bacteria in the presence of extract 03 (acidic pH) with zone of inhibition of 40 mm, followed by *S. aureus*, *B. pumilis* with inhibition zones ≥ 20 mm (extract 108a, 223a, 410a, 136a, 236a). The metabolites of extracts 17a, 17b, 170b, 335b showed activity only for Gram-positive bacterial strains. In addition, the fungal extracts were subjected to comparative analysis using the technique LC/MS and with the standard combretastatin A4, in order to verify the production the same substance as the plant (*C. leprosum*), however, were not detected signals corresponding to the standard CA4 in the extracts analyzed. The results indicate possibilities for exploration of natural endophytic isolates of endemic plant of extreme environments such as the Brazilian caatinga.

Keywords: Semiarid; Caatinga; *Combretum leprosum*; Endophytic; Antimicrobial activity

5.1 Introdução

O semiárido brasileiro é uma região marcada pelas restrições hídricas, grandes oscilações diárias de temperatura, alta insolação, ventos fortes e em solos rasos e/ou arenosos. Tais características podem explicar, em parte, a grande diversidade de espécies, muitas das quais endêmicas desta região. Organismos isolados e/ou coletados em ambientes extremos, principalmente micro-organismos e plantas, sofreram uma forte pressão evolutiva, sendo moldados para sobreviverem nestas condições, desenvolvendo mecanismos e estruturas que representam vantagens ecológicas (GIULIETTI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006). Os ecossistemas presentes em regiões tropicais, tais como a caatinga, um bioma considerado exclusivamente brasileiro, têm sido alvo de busca de compostos naturais devido à riqueza de espécies e nichos ecológicos presentes nestas comunidades.

Recentemente, a Caatinga foi reconhecida como umas das 37 grande regiões naturais do planeta, pois é um ecossistema que ainda abriga, pelo menos 70% de sua cobertura original, sendo considerada estratégica no contexto das grandes mudanças globais (AGUIAR, 2002; TABARELLI; SILVA 2002). De forma mais

específica, a conservação da caatinga é importante para a manutenção dos padrões regionais e globais do clima, da disponibilidade de água potável, de solos agricultáveis, e de parte importante da biodiversidade do planeta. Valem ressaltar que o bioma caatinga é o mais degradado do semiárido, principalmente por pressões antrópicas, e possui menos de 1% de sua área protegida em reservas resultando em ameaça real a extinção de diversas espécies, podendo considerá-la como área de extrema importância biológica (TABARELLI; SILVA 2002).

As comunidades biológicas pouco exploradas ou inexploradas, tais como os micro-organismos endofíticos, estão frequentemente associadas à diversidade biológica e diretamente relacionada à descoberta de moléculas químicas com potencial de atividade biológica. Estes organismos habitam os tecidos internos de espécies vegetais e produzem metabólitos que desempenham funções favoráveis a sua relação interespecíficas com o hospedeiro. Uma vez isolado, selecionado e preservado, um micro-organismo produtor de biomoléculas de interesse, pode ser submetido à pesquisa e desenvolvimento o que, às vezes, torna-se difícil com plantas raras ou com crescimento lento.

Nesse contexto, os endofíticos isolados de plantas medicinais do semiárido brasileiro, podem ser considerados fonte promissora para bioprospecção de novos produtos naturais resultantes do metabolismo microbiano, tendo em vista a sua aplicação biotecnológica. A exemplo disto o taxol um diterpenóide extraído da casca de *Taxus brevifolia*, com efeito contra câncer de mama e útero, esta planta possui o crescimento lento e baixa produção de taxol, contudo Stierle et al. (1993) isolaram do floema desse hospedeiro o fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, que quando cultivado em meio semisintético, produz o taxol em maior quantidade. Tal endofítico constitui-se em fonte alternativa para a produção desse fármaco e também contribui para evitar desequilíbrio ecológico em função da derrubada de *T. brevifolia*. Além disso, segundo Azevedo (1998), este evento sugere a possibilidade de uma transposição de genes entre fungos e plantas, indicando uma engenharia genética *in vivo*.

Desta forma, este projeto tem como objetivo avaliar o potencial da atividade antimicrobiana e possível produção de biomoléculas, especificamente combretastatin CA4, pertencentes dos grupos dos estilbeno, obtidas de isolados

fúngicos endofíticos de plantas da espécie *Combretum leprosum* coletadas em áreas de caatinga do semiárido nordestino brasileiro.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Área de coleta

Os locais de coleta de plantas da espécie vegetal *Combretum leprosum*, foi delimitado pela região de caatinga do semiárido nordestino, nos estados de Bahia, Ceara, Pernambuco, Piauí, Paraíba e Rio Grande do Norte. Nestas áreas foram coletadas partes das plantas (raiz, caule e folhas) segundo os padrões internacionais de coleta incluindo as coordenadas geográficas. A identificação das espécies botânicas foi realizada pelo botânico MSc Cosme Correia Santos do HUEFS, uma exsicata encontra-se depositada neste herbário. As coletas foram realizadas durante o período de chuva (em função do estado fenológico da espécie da planta incluído a coleta de flores, frutos e sementes, quando presentes). As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e submetidos a vácuo e transportadas para o laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente onde foi realizado o isolamento dos micro-organismos endofíticos.

5.2.2 Isolamento e preservação dos micro-organismos endofíticos

Os materiais botânicos coletados foram processados imediatamente após a coleta para isolamento de micro-organismos endofíticos. Para desinfecção superficial e retirada de possíveis micro-organismos epifíticos das amostras coletadas, as folhas, caules e raízes foram lavados com água destilada e detergente. Em seguida, em câmara asséptica, foram submetidos a uma sequência de desinfecção em álcool a 70% (5 min para folhas e 10 min para caule e raiz) e hipoclorito (NaClO) 3% (3 min para folhas e 5 min para caule e raiz). Após a assepsia, foram cortados fragmentos de 8 a 12 cm e plaqueados em placas de Petri em meio de cultura agar batata dextrose (BDA), meio de Martin, agar água (AA) para isolamento de fungos (ARAUJO, 2001), como representado na figura 5.1. Como controle de efetividade do processo de desinfecção, foram realizados controles com alíquotas de 0,1mL da última água destilada esterilizada (última etapa do processo)

em BDA. Para cada parte da planta (raiz, caule e folha) e para cada planta, foram feitas três placas de cada meio de cultura, cada um com sete pedaços do tecido vegetal. As culturas foram incubadas em estufa a 28°C por um período até 60 dias (COLLADO et al., 1996).

Após o crescimento das hifas dos fungos endofíticos nas extremidades dos fragmentos, foram realizados repiques de todos os isolados para novas placas de BDA. Após purificação, as culturas foram incubadas por 15 dias a 28°C para crescimento.

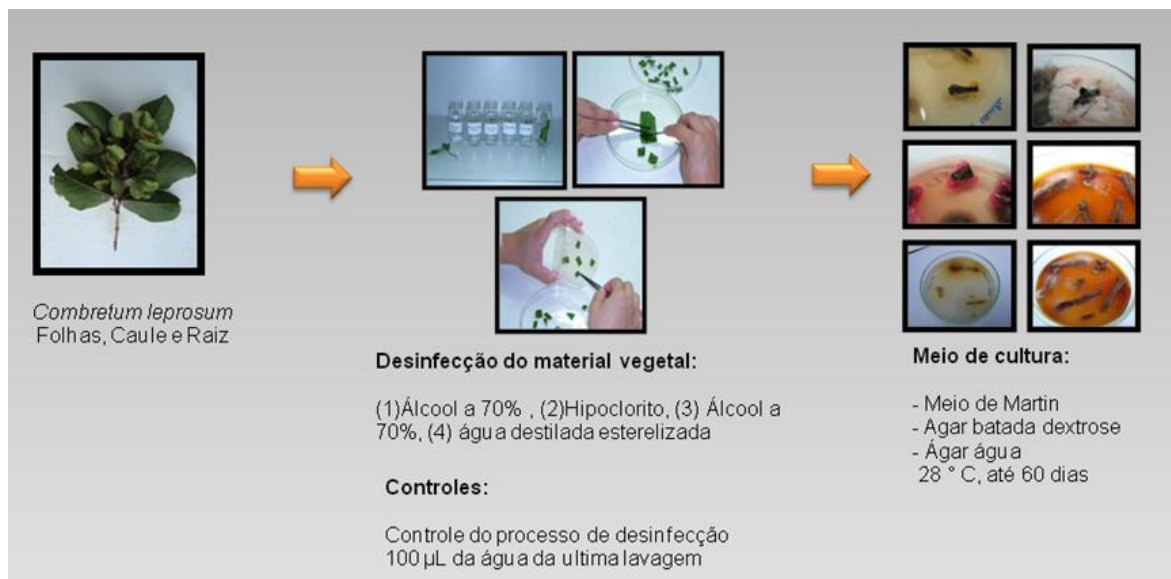


Figura 5.1 - Esquema com as etapas do isolamento dos micro-organismos endofíticos

Para preservação dos isolados, discos de meio de cultura de 5 mm de diâmetro de todos os isolados foram submersos em 5 mL de água destilada em frascos lacrados, à temperatura ambiente e em triplicata (CASTELANI, 1967), e depositados na Coleção de Cultura de Micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Ambiental, Empresa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP/Brasil.

5.2.3 Frequência de isolamento

A frequência de colonização nos fragmentos dos órgãos vegetais de *C. leprosum* pelos fungos foi definida como: o número total de fragmentos que apresentaram colonização por fungo endofítico em relação ao número total de fragmentos analisados. Considerando cada parte vegetal analisada (folha, caule e raiz) como um tratamento, utilizou-se a Taxa de Colonização (T_c) (TAYLOR et al.,

1999). Foi realizada análise total da taxa de colonização e parcial e comparando-se o local de colonização na planta (folha, caule e raízes).

$$\text{Taxa de Colonização} = \frac{\text{Número de Fragmentos com crescimento fúngico} \times 100}{\text{Número total de fragmentos}}$$

5.2.4 Seleção dos micro-organismos com biomoléculas ativas

Como ponto inicial para avaliação do potencial biológico dos endofíticos isolados foram obtidos extratos brutos em pequena escala e testado a atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos (*Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*). Os isolados que apresentaram melhores resultados foram submetidos à fermentação líquida e ensaios *in vitro* para avaliação do potencial de suas biomoléculas na determinação da atividade antimicrobiana para diversos micro-organismos testes. Paralelamente, tais extratos foram submetidos à análise comparativa com o padrão combretastatin A4, com intuito de analisar se os mesmos produziam tal substância assim como possivelmente o *C. leprosum*.

5.2.4.1 Avaliação da atividade antifitopatogênica

Os micro-organismos endofíticos isolados foram submetidos aos ensaios antimicrobianos para seleção inicial dos isolados fúngicos produtores de biomoléculas em potencial para novos compostos de interesse industrial. Os isolados obtidos foram cultivados em meio de cultivo ágar batata dextrose (BDA), durante 7 dias, a 30°C e os blocos de gelose com os micélios foram triturados em tubos de ensaio contendo 3 mL de acetato de etila, com auxílio de bastão de vidro. Os sobrenadantes foram recuperados e evaporados, restando extratos brutos das principais substâncias produzidas, utilizados no microensaio de atividade antifúngica. Este ensaio foi realizado pela técnica de difusão em agar, Bauer et al., (1960), utilizando-se disco S&S (diâmetro ¼ IN) autoclavados e impregnados com 5µL da suspensão dos extratos brutos contra disco de 5 mm do fitopatogêno (*Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*), em BDA, 28°C, por 24 h. Após este período foi observado se houve ou não a formação de halos de inibição.

5.2.4.2 Obtenção dos metabólitos secundários: cultivo, filtração e obtenção dos extratos brutos das linhagens selecionadas

A extração é o processo pelo qual compostos, como metabólitos, são seletivamente separados dos outros compostos muitas vezes indesejados. Um dos métodos mais comuns de extração é a extração líquido-líquido, que usa a solubilidade diferencial entre solventes miscíveis e imiscíveis com o meio aquoso. Compostos são transferidos de uma fase líquida para outra fase líquida, acrescentando a solução inicial, um solvente imiscível em que os compostos são mais solúveis (KIKILINA; PESSOA Jr., 2001). A metabolômica é análise comparativa dos metabólitos encontrados em conjuntos de semelhantes de amostras biológicas, como caldos fermentados. Para pesquisas de metabólitos bem sucedidas requer eficazes sistemas de extrações e para metabólitos não-alvos, sendo que os métodos de extração necessitam capturar uma ampla quantidade de metabólitos celulares e biofluidos, excluindo componentes, tais como proteínas que não são destinadas às análises. Segundo Sana e Fischer (2007), do Instituto de Pesquisa de Scripps (TSRI), trabalhando com análises de extratos orgânicos através de análises espectrométricas, verificou-se que a mudança do pH (ácido e básico) do meio a ser extraído causa um aumento significativo na disponibilidade das diferentes moléculas, cerca de 45% de metabólitos únicos a mais foram retirados quando comparado a mesma extração em pH neutro (7,0).

Diante disto, neste trabalho as linhagens foram inoculadas em 2000mL de caldo Czapek (Himedia, Índia), incubada a 28°C, por 30 dias, com ausência de agitação. Após o crescimento fúngico, os caldos de culturas foram submetidos ao sistema de filtração a vácuo (Sartorius), com membrana de celulose de 0,45µm (Milipore), e centrifugação a 9000rpm por 30 min a 4°C para retirada das células fúngicas. Os filtrados foram submetidos, por três vezes, ao processo de extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas (SDFA), com o solvente diclorometano na proporção de 1:1(v/v) em múltiplos pHs (ácido 3,0; básico 11,0) onde houve a formação de duas camadas: uma aquosa, na parte inferior e outra orgânica, na parte superior. Foi adicionada à fase orgânica 5% de sulfato de sódio anidro, filtrada em papel Whatman nº4 e concentrada no evaporador rotativo (Quimis) a temperatura de 45°C, à pressão reduzida (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001). Os extratos brutos obtidos foram pesados em balança analítica e armazenados em

freezer a -20°C. O extrato bruto seco do controle negativo foi obtido através da extração do caldo de cultura sem inóculo.

5.2.4.3 Avaliação do potencial antimicrobiana

5.2.4.3.1 Os micro-organismos testes:

Os micro-organismos testados foram oito linhagens bacterianas patogênicas humanas: *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (CCMA 120), *Escherichia coli* (CCMA 104), *Klebsiella pneumoniae* (CCMA 540), *Burkholderia cepacia* (CCMA 92), *Staphylococcus aureus* (CCMA 190), *Staphylococcus schleiferi*, *Salmonella typhi* (CCMA 85) e cinco linhagens fúngicas fiopatogênicas *Pythium aphanidermatum* (CCMA 243), *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii* e *Phytophthora* sp.. Os micro-organismos testes foram obtidos a partir da coleção de cultura de micro-organismos do laboratório de microbiologia Ambiental, EMBRAPA Meio Ambiente Jaguariúna, São Paulo, Brasil. Todas as linhagens bacterianas e fúngicas foram crescidas em meio de cultura respectivamente em agar nutriente (NA) e Agar dextrose batata (BDA), a 28°C por 24h para linhagens bacterianas e ate 4 dias para linhagens fúngicas.

5.2.4.3.2 Avaliação da suscetibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em disco de acordo com a metodologia de Bauer et al. (1960) com adaptações, esquemas representativo da atividade antimicrobiana na figura 5.2. Com auxílio de uma alça bacteriológica foram colhidas colônias bacterianas isoladas e ressuspendida em solução salina a 0,85%, a fim de se obter uma turvação correspondente com a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para tanto, foi utilizado um aparelho espectrofotométrico (A-Just TM- Abbot, Chicago, EUA) em absorbância de 625nm. Após a homogeneização do inóculo foram retiradas 100 µL da suspensão bacteriana, plaqueadas em NA e semeadas com auxílio de um *swab* estéril. Para as linhagens fúngicas foram repicado parte do micélio com diâmetro de 5 mm e com auxílio de uma pinça estéril foram colocados no centro de placas com meio BDA. Em discos de papel estéreis foram impregnados 5 µL da suspensão dos extratos brutos

ressuspendidos em DMSO (dimetilsulfoxido) e aplicação destes foi feita com auxílio de uma pinça estéril para evitar contaminação. Após o período de incubação, foram realizados a leitura foi realizada com o auxílio de um halômetro utilizando fonte de luz refletida para iluminar a placa invertida sobre um fundo preto e opaco dos halos de inibição.

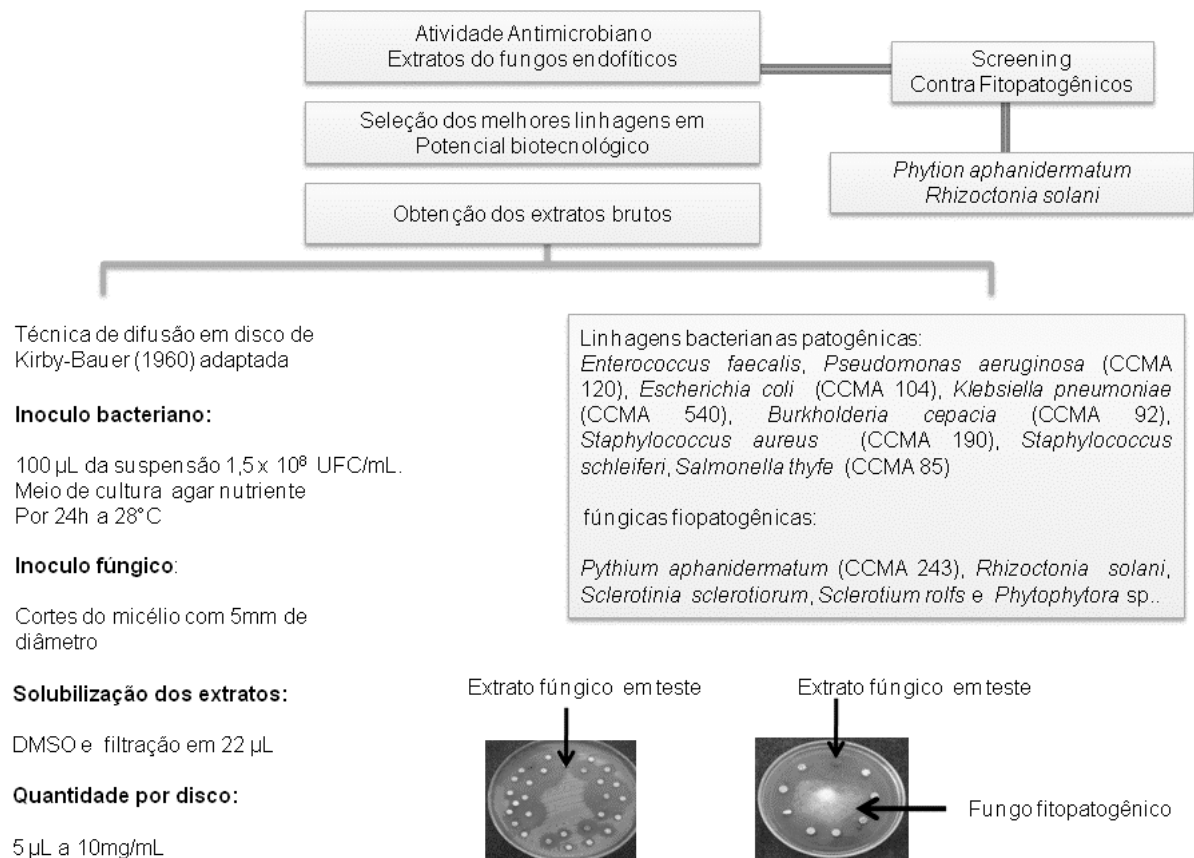


Figura 5.2 - Esquema representativo da atividade antimicrobiana de extratos brutos das linhagens endofíticas contra patógenos bacterianos fúngicos pela técnica de difusão em disco Kirby-Bauer (1960) adaptada

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Taxa de colonização

Um total de 405 isolados fúngicos foram obtidos dos órgãos vegetais de *Combretum leprosum* da caatinga do semiárido brasileiro. As linhagens foram provenientes de diferentes partes amostradas, sendo 44% das colônias de

fragmentos foliares, 45% de fragmentos caulinares e 11% de fragmentos radiculares, tabela 5.1. Houve diferença da quantidade de isolados quanto ao local de coleta da planta e quanto aos órgãos da planta, sendo as maiores quantidades foram isolados do *C. leprosum* coletados do estado do Piauí e do Rio Grande do Norte como visualizado na figura 5.3. Tal evento pode esta associado com a umidade, pois eram os estados que estavam com ocorrência de chuva na época da coleta, preservando mais tecidos verdes e nutridos e conseqüentemente com maior número de micro-organismos endofíticos de acordo com as técnicas de isolados utilizados neste estudo. Além disso, as linhagens isoladas neste trabalho não representam a diversidade total de fungos endofíticos de *Combretum leprosum* principalmente devido à seleção de linhagens bacterianas capazes de crescer nos meios de cultivos utilizados.

Tabela 5.1 - Número total de fungos endofíticos isolados de plantas da espécie *Combretum leprosum* distribuída na região de caatinga do semiárido do nordeste brasileiro

Planta	Local de coleta	Quantidade de Isolados			
		folhas	caules	raiz	total
<i>C. leprosum</i>	Bahia	31	36	11	78
<i>C. leprosum</i>	Piauí	43	53	9	105
<i>C. leprosum</i>	Ceará	11	51	11	73
<i>C. leprosum</i>	Paraíba	39	4	9	52
<i>C. leprosum</i>	Rio Grande do Norte	53	38	6	97

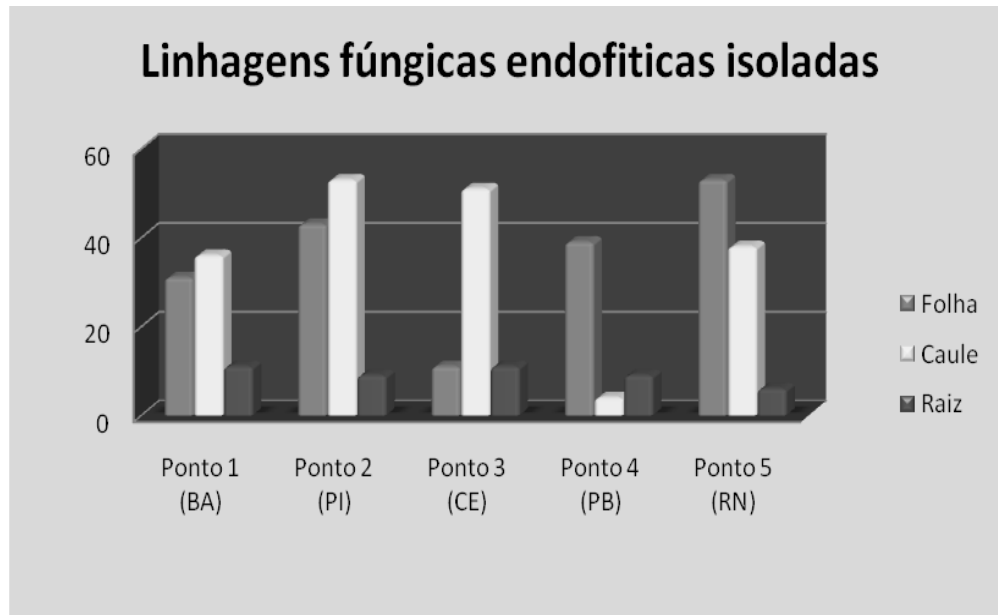


Figura 5.3 - Gráfico apresentando o número de isolados de acordo as partes das plantas (folha, caule e raiz)

A tabela 5.2 apresenta a frequência estimada dos fungos endofíticos para a planta *C. leprosum*. De forma geral houve uma maior frequência de fungos endofíticos nos caules do que nas folhas, decrescendo ainda mais para raiz. Este fato sugere que pode ocorrer uma migração dos micro-organismos para os diferentes tecidos das plantas independentemente da sua porta de entrada na planta. Estas apresentam tecidos mais frágeis e expostos devido aos estômatos, prováveis portas de entrada para os endófitos (SOUZA et al., 2004).

Tabela 5.2 - Frequência de fungos endofíticos isolados de folhas, caules e raízes das plantas *C. leprosum*

Planta	Tipos de tecido vegetal						Frequência total
	Folha		Caule		Raiz		
	Quant. Isol.	Freq. (%)	Quant. Isol.	Freq. (%)	Quant. Isol.	Freq. (%)	
<i>C.leprosum</i>	177	91%	182	95%	46	83%	89%

Quant. Isol (quantidade de isolados), freq. (frequência)

As comunidades endofíticas variam espacialmente no vegetal havendo diferença e especificidade da microbiota entre diversos tecidos vegetais: raízes, caules, folhas, flores e frutos (NALINI et al., 2005; TEJESVI et al., 2005; GOND et al., 2007), além de sofrerem influência do ambiente, sazonalidade (UNTERSEHER et al., 2007) e da idade do tecido vegetal. As espécies mais frequentemente isoladas pertencem ao filo Ascomycota, incluindo anamorfos (Hyphomycetes e Coelomycetes). Espécies de Basidiomycota e Zigomicota também são isoladas como endofíticas, mas representam um número menor (SCHULZ; BOYE, 2005). Os gêneros mais comumente isolados incluem: *Ascochyta*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Glomelera*, *Guignardia*, *Mucor*, *Nadulisporium*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Phomopsis*, *Rhizopus* e *Xylaria* são os mais frequentes (RODRIGUES et al., 2000; ZOU et al., 2000; PEIXOTO-NETO et al., 2002).

Realizando buscas nos principais sites de busca científica (NCBI, Sciencedirect, Sciencefinder) não foram encontrados até a data, registro de trabalhos científicos com isolamento de endofíticos a partir de plantas do gênero *Combretum*, sendo este trabalho pioneiro para isolamento de endofíticos associados a este gênero e em espécies da caatinga do semiárido do nordeste brasileiro.

5.3.2 Triagem para seleção de fungos endofíticos produtoras de metabólitos

5.3.2.1 Avaliação da atividade contra linhagens fitopatogênicas

Todos os 405 isolados foram avaliados quanto ao antagonismo contra dois fungos fitopatogênicos (*Pythium aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*), cujos ensaios foram utilizados como seleção inicial dos isolados mais promissores na produção de compostos de interesse. Pelos resultados obtidos verificou-se que 159 apresentaram atividade contra pelo menos um dos microrganismos testados e dentre estes isolados fúngicos 72% apresentaram atividade inibitória contra *R. solani* e 28% contra *P. aphanidermatum*, dados apresentados na figura 5.4, as áreas de inibição podem ser visualizadas na figura 5.5. De acordo com dados obtidos, os compostos obtidos do ponto 4 (planta coletada no estado da Paraíba) apresentaram menores efeitos inibitórios para ambos patógenos.

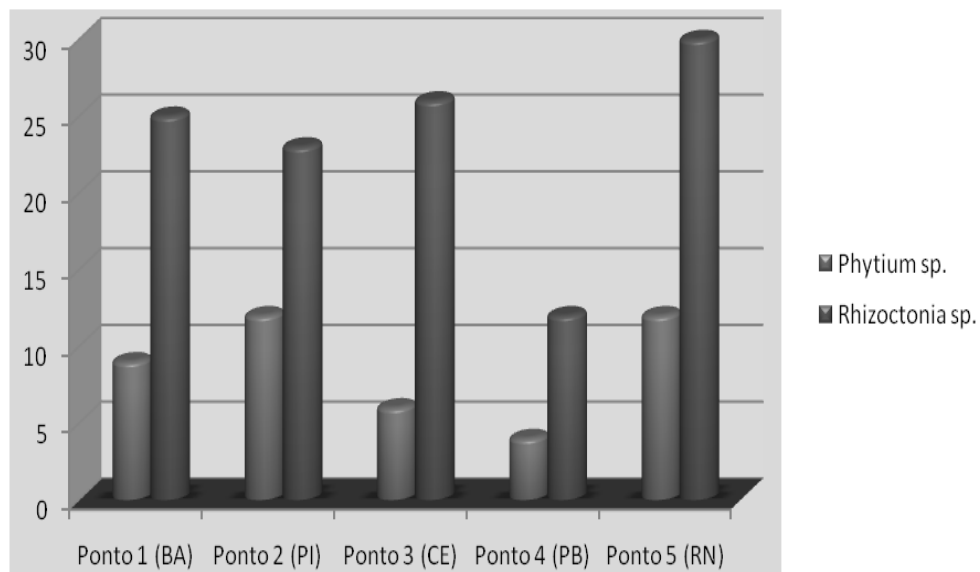


Figura 5.4 - Gráfico apresenta atividade antifúngica dos extratos brutos dos fungos isolados contra fungos fitopatogênicos

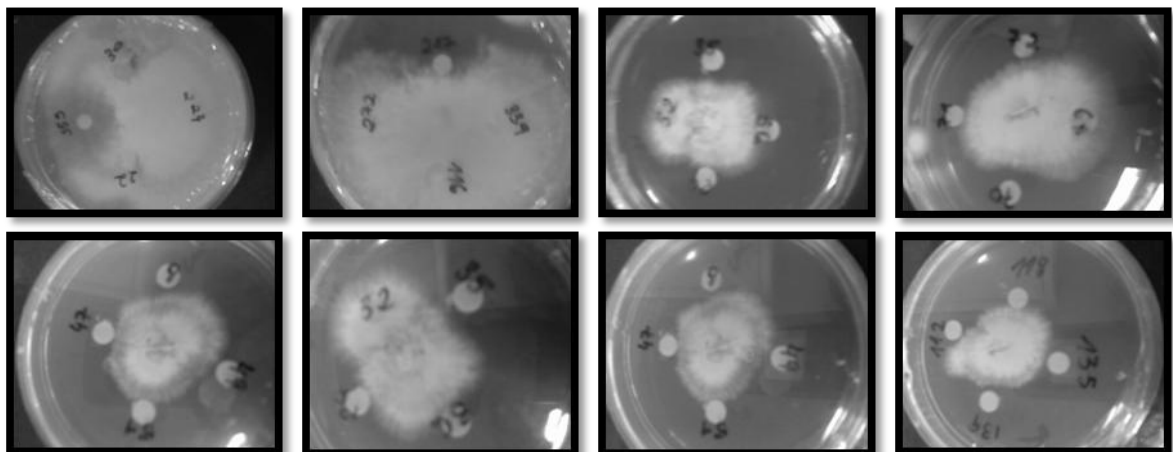


Figura 5.5 - Teste de atividade antifúngica utilizando a técnica de difusão em disco

A partir deste ensaio inicial, foram selecionados vinte e três isolados que apresentaram significantes halos de inibição contra ambos tais fitopatogênicos.

5.3.2.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos fúngicos

De acordo com a atividade antimicrobiana, extratos brutos do mesmo caldo fermentado, mas em diferentes pHs apresentaram atividade biológica diferente diante dos micro-organismos testes; o que significa a extração de diferentes compostos do mesmo caldo fermentado. Segundo Sana e Fischer (2007), do Instituto de Pesquisa de Scripps (TSRI), trabalhando com análises de extratos

orgânicos através de análises espectrométricas, verificou-se que a mudança do pH (ácido e básico) do meio a ser extraído causa um aumento significativo na disponibilidade das diferentes moléculas alvos, cerca de 45% de metabólitos únicos a mais foram retirados quando comparado a mesma extração em pH neutro (7,0).

Cerca de 90% dos metabólitos dos extratos brutos obtidos em pH ácido apresentaram as maiores atividades inibitórias do que os metabólitos em pH básico, apenas os metabólitos do pH ácido do extrato 306 não apresentou atividade contra as linhagens fúngicas fitopatogênicas, mas apresentou contra as linhagens bacterianas patogênicas. A maioria dos metabólitos em pH básico apresentaram atividade bem inferiores aos obtidos em pH ácido, como apresentados na tabela 5.3.

Dentre as linhagens fúngicas fitopatogênicas *Sclerotium rolfii* foi o mais sensível à ação dos metabólitos presentes nos quarenta e seis (ácidos e básicos) extratos fúngicos e o fungo *Phytophthora* sp. foi o mais resistente de todos. Os extratos 03a, 177a, 391a, 236a e 108a, todos extraídos em pH ácido, apresentaram as maiores zonas de inibição e contra todos linhagens bacterianas testadas. *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. thyfe*, todas Gram negativas, apresentaram maior resistência frente à ação dos extratos. *S. schelfer* foi a mais sensível de todas, na presença do extrato 03 (pH ácido) com halo de inibição de 40 mm, seguido de *S. aureus*, *B. pumilis* com halos de inibição ≥ 20 mm (extrato 108 a, 223a, 410a, 136a, 236a). Os metabólitos presentes nos extratos 17a, 17b, 170b, 335b apresentaram atividade apenas para linhagens bacterianas Gram positivas, podendo ser indicativo de possíveis especificidades do mecanismo de ação, não ativos para as linhagens bacterianas patogênicas Gram negativas, resultados apresentados na tabela 5.4.

Trabalhos sobre isolamentos de fungos endofíticos de espécies de planta da família Combretaceae, como no caso Strobel et al.,(2003) estudou endofíticos de *Terminalia morobensis* mostraram a presença do fungo pertencente ao gênero *Pestalotiopsis* (*P. microspora*, *P. clavispora* e *P. virgatula*) e tendo como produtos isolados criptocinina e ácido torrecianico, que apresentam atividade antitumoral e antibiótica. Até então não se tem registro de estudos de micro-organismos endofíticos associados às plantas do gênero *Combretum*, sendo possivelmente este trabalho o primeiro relato.

Tabela 5.3 - Atividade antifúngica de extratos bruto em múltiplos pHs (ácido e básico) de linhagens fúngicas endofíticas isoladas de *C. leprosum*

Extratos Fúngicos	<i>P. aphanidermatum</i>	<i>Phytophthora sp.</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotium</i>	<i>S. rolfsii</i>
03a	(+++)	(++)	(+)	(+++)	(++)
03b	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
17a	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
17b	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
89a	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
89b	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
108a	(+++)	(++)	(++)	(+++)	(++)
108b	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
111a	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
111b	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
129a	(-)	(-)	(+)	(-)	(++)
129b	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
133a	(++)	(-)	(+)	(+++)	(++)
133b	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
136a	(++)	(++)	(+)	(+++)	(+)
136b	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
170a	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)
170b	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
177a	(++++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
177b	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)
182a	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)
182b	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
223a	(+)	(-)	(+)	(+++)	(+)
223b	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
235a	(-)	(-)	(-)	(+++)	(++)
235b	(-)	(-)	(-)	(++)	(+++)
236a	(+++)	(++)	(+++)	(+)	(++)
236b	(++)	(-)	(+)	(-)	(-)
250a	(++++)	(+)	(++)	(-)	(++)
250b	(++)	(+)	(-)	(-)	(-)
264a	(++)	(-)	(-)	(-)	(++)
264b	(++)	(-)	(-)	(-)	(++)
306a	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
306b	(-)	(-)	(+)	(+++)	(-)
335a	(+++)	(-)	(-)	(++)	(+++)
335b	(-)	(-)	(-)	(++)	(+++)
333a	(-)	(+)	(+++)	(+)	(+)
333b	(+)	(+)	(++)	(-)	(-)
391a	(+)	(++++)	(+)	(+)	(+)

391b	(-)	(++)	(-)	(+)	(++)
410a	(++)	(+)	(+)	(+++)	(++)
410b	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
415a	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
415b	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
427a	(-)	(-)	(+)	(+)	(++)
427b	(-)	(-)	(+)	(+)	(++)

a – extrato bruto obtido em pH ácido;
b – extrato bruto obtido em pH básico;
 (+) atividade moderada;
 (++) média atividade;
 (+++) forte atividade inibitória;
 (-) ausência de atividade inibitória}

Tabela 5.4 - Atividade antibacteriana de extratos bruto com múltiplos pHs (ácido e básico) de linhagens fúngicas endofíticas isoladas *C. leprosum*

Extratos Fúngicos	<i>B. pumilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Scheffer</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. thyph</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>A. tumefaceius</i>
03a	14 mm	(-)	40 mm	27 mm	12 mm	8 mm	10 mm	12 mm	(-)	(-)
03b	(-)	7 mm	7 mm	(-)	7 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
17a	14 mm	7 mm	16 mm	7 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
17b	10 mm	16 mm	8 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
89a	+	10 mm	12 mm	12 mm	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	+
89b	+	+	8 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	+
108a	+	20 mm	25 mm	+	9 mm	10 mm	12 mm	(+)	13 mm	+
108b	(-)	(-)	(-)	10 mm	(-)	(-)	12 mm	(+)	(-)	7 mm
111a	12 mm	7 mm	12 mm	7 mm	(-)	(-)	8 mm	(-)	(-)	12 mm
111b	16 mm	7 mm	8 mm	(-)	(-)	(-)	12 mm	(-)	(-)	8 mm
129a	14 mm	16 mm	30 mm	8 mm	7 mm	8 mm	7 mm	7 mm	7 mm	14 mm
129b	11 mm	10 mm	10 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	7 mm	(-)
133a	+	+	20 mm	+	8 mm	8 mm	(-)	(+)	22 mm	+
133b	+	+	(-)	+	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	+
136a	20 mm	20 mm	26 mm	12 mm	10 mm	12 mm	(-)	12 mm	14 mm	(-)
136b	(-)	12 mm	12 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	8 mm	(-)
170a	10 mm	10 mm	25 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10 mm
170b	(-)	(-)	30 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
177a	20 mm	16 mm	14 mm	7 mm	7 mm	7 mm	(-)	(-)	10 mm	(-)
177b	8 mm	+	+	+	(-)	(-)	10 mm	(+)	(-)	+
182a	+	+	+	15 mm	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	15 mm
182b	+	+	14 mm	10 mm	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	10 mm
223a	24 mm	10 mm	12 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	30 mm	(-)
223b	12 mm	8 mm	16 mm	8 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	14 mm	16 mm
235a	+	+	16 mm	+	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	+
235b	+	10 mm	10 mm	+	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	10 mm
236a	12 mm	20 mm	12 mm	+	20 mm	12 mm	(-)	(+)	30 mm	8 mm

236b	8 mm	10 mm	14 mm	10 mm	(-)	(-)	(-)	(+)	20 mm	+
250a	+	+	45 mm	+	15 mm	10 mm	(-)	(+)	12 mm	+
250b	+	+	12 mm	+	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	+
264a	16 mm	14 mm	20 mm	+	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	15 mm
264b	+	+	15 mm	12 mm	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	+
306a	14 mm	14 mm	12 mm	12 mm	8 mm	8 mm	10 mm	10 mm	12 mm	(-)
306b	12 mm	(-)	10 mm	10 mm	7 mm	7 mm	8 mm	8 mm	10 mm	(-)
333a	12 mm	10 mm	8 mm	8 mm	(-)	7 mm	10 mm	(-)	10 mm	10 mm
333b	12 mm	(-)	10 mm	8 mm	(-)	(-)	10 mm	(-)	(-)	10 mm
335a	7 mm	8 mm	10 mm	7 mm	7 mm	8 mm	7 mm	(-)	(-)	8 mm
335b	7 mm	(-)	7 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
391a	(-)	14 mm	14 mm	14 mm	10 mm	14 mm	14 mm	14 mm	14 mm	10 mm
391b	(-)	10 mm	10 mm	10 mm	7 mm	12 mm	12 mm	10 mm	12 mm	7 mm
410a	20 mm	18 mm	20 mm	8 mm	7 mm	8 mm	8 mm	16 mm	20 mm	20 mm
415a	16 mm	12 mm	16 mm	10 mm	(-)	(-)	10 mm	10 mm	(-)	10 mm
415b	(-)	7 mm	16 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	10 mm	(-)	12 mm
427a	(-)	8 mm	7 mm	(-)	7 mm	8 mm	(-)	(-)	(-)	(-)
427b	7 mm	8 mm	12 mm	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	7 mm	10 mm

a – extrato bruto pH ácido;

b – extrato bruto pH básico;

(+) atividade moderada;

(-) ausência de atividade inibitória.

5.3.4 Detecção da presença Combretastatin A4 (CA4) nos extratos fúngicos

Tan e Zou (2001) consideram a razão pela qual alguns endofíticos produzem determinados compostos originalmente característicos do hospedeiro, pode estar relacionado com uma recombinação genética endofítico/hospedeiro num evento evolutivo. Este conceito foi inicialmente proposto como uma hipótese para explicar como o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* pode ser produtor do Paclitaxel, um composto similar ao taxol um agente anticancerígeno isolado primariamente de *Taxus brevifolia* (CRAGG; NEWMAN, 2005). Assim, se endofíticos possivelmente podem produzir os mesmos compostos bioativos de suas plantas hospedeiras, os mesmos funcionam como novos alvos para pesquisas, uma vez que reduziria a necessidade de coletar plantas raras e de crescimento lento, como também preservará a biodiversidade que vem diminuindo mundialmente. Importante relatar ainda que, do ponto de vista econômico o custo na obtenção do produto, diminuirá, reduzindo o preço de mercado do fármaco produzido (STROBEL; DAYSE, 2003).

Neste trabalho, os extratos microbianos foram submetidos à análise comparativa utilizando a técnica LC/MS e tendo como padrão a combretastatin A4, com o objetivo de verificar se os mesmos possuíam tal substância assim como a planta. Foi constatado que nos referidos extratos brutos fúngicos não foi detectada a presença da substância padrão CA4, de acordo com as técnicas utilizadas neste estudo. Entretanto, são necessários estudos de prospecção genética para detectar a presença ou genes associados a síntese da CA4 em micro-organismos, pois os mesmo podem estar presentes mas não estão sendo expresso e por isso não sendo provável detectar a presença nos extratos brutos dos mesmo.

A produção de metabólitos secundários por micro-organismos é influenciada por vários fatores ambientais, modulados principalmente pelas condições de nichos ecológico, além da distribuição das plantas hospedeiras, fisiologia, ecologia e bioquímica. Por exemplo, a presença de íons de zinco no solo aumenta a produção de fenazina e baixas temperaturas (12°C) influência à produção de 2,4-diacetil floroglucinol (DAPG) por *Pseudomonas* sp. (KUMAR et al., 2002). Estudos têm mostrado que desde o primeiro isolamento do taxol em fungos endofíticos *Taxomyces andreanae* em 1993 (STIERLE et al., 1993, 1994), outros autores isolaram o mesmo composto e/ou análogos produzidos por outros endofíticos de diferentes hospedeiros, tais como *Taxodium distichum* (LI et al., 1996),

Pestalotiopsis microspora (endofítico de *Taxus wallachia*) (STROBEL et al., 1996), *Pestalotiopsis terminaliae* (endofítico de *Terminalia arjuna*, família Combretaceae) (Gangadevi; Muthumary 2009), *Colletotrichum gloeosporioides* (endofítico de *Justicia gendarussa*) (GANGADEVI; MUTHUMARY 2008). Tal fato evidencia a existência de mecanismos iguais ou semelhantes de síntese de metabolismo secundário, e sugere a existência de vias comuns de metabolismo secundário em espécies diferentes e de outros níveis hierárquicos (fungos e plantas) (KURYLOWICZ, 1981; VIDENSEK et al. 1990; PETRINI et al., 1992; BÉRDYS, 2005).

Referências

- AGUIAR, J.; LACHER, T.; SILVA, J.M.C. The caatinga. In *Wilderness - Earth's Last Wild Places*, GIL, P.R. ed., Cemex, Cidade do México, 2002, p.174-181.
- ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and Interaction between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.
- AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 445-464.
- BAUER, A.W.; ROBERTS, C.E.; Jr, KIRBY, W.M. Single disc versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing. **Antibiotics Annual**, New York, v. 7, p. 574–580, 1960.
- CASTELLANI, A. A Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 70, p 181-184, 1967.
- COLLADO, J.; PLATAS, G.; PELAEZ, F. Identification of an endophytic *Nodulisporium* sp. from *Quercus ilex* in central Spain as the anamorph of *Biscogniauxia mediterranea* by rDNA sequence analysis and effect of different ecological factors on distribution of the fungus. **Mycologia**, Lancaster, v. 93, p. 875-886, 2001.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. International collaboration in drug discovery and development from natural sources. **Pure Applied Chemistry**, Berlin, v. 77, p. 1923–1942, 2005.
- GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*, **Mycologia Balcanica** Bulgarian, v. 5, p. 1–4, 2008.

_____. Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 52, p. 9-15, 2009.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; BARBOSA, M.R.V.; BOCAGE NETA, A.L.; FIGUEIREDO, M.A. Diagnóstico da vegetação nativa do bioma Caatinga. In: SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; FONSECA, M.T.; LINS, L.V. (Ed.). **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente; SBF, 2002. p. 48-90.

GOND, S.K.; VERMA, V.C.; KUMAR, A. Study of endophytic fungal community from different parts of Argle marmelos *Correae* (Rutaceae) from Varanasi (India). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 23, p. 1371–1375, 2007.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR., A.P. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMILDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Ed). **Biociencia industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 2, p. 201-215.

KUMAR, N.R., THIRUMALAI, V.A.; GUNASEKARA, P. Genotyping of antifungal compounds procuring plant grow-promotion rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens*. **Current Science**, Bangalore, v. 82, p. 25, 2002.

LI, J.Y.; STROBEL, G.A.; SIDHU, R.; HESS, W.M.; FORD, E.J. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. **Microbiology**, New York, v. 142, p. 2223-2226, 1996.

NALINI, M.S.; MAHESH, B.; TEJESVI, M.V.; PRAKASH, H.S.; SUBBAIAH, V.; KINI, K.R.; SHETTY, H.S. Fungal endophytes from the three-leaved caper, *Crataeva magna* (Lour.) DC. (Capparidaceae). **Mycopathologia**, Boston, v. 159, p. 245-249, 2005.

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; GARBOGGINI, F.F. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **Multiciência**, São Carlos, v. 7, p. 1-19, 2006.

PEIXOTO-NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAUJO, W.L. Microrganismos endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biociencia, Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, v. 29, p. 32-37, 2002.

PETRINI, O.; SIEBER, T.N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, New York, v. 1 p. 185-196, 1992.

RODRIGUES, K.F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlim, v. 40, p. 261-267, 2000.

SANA, T.R.; WADDELL, K.; FISCHER, S.M. A sample extraction and chromatographic strategy for increasing LC/MS detection coverage of the erythrocyte metabolome, **Journal Of Chromatography B**, Amsterdam, v. 875, p. 314-321, 2008.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 109, p. 661-686, 2005.

SOUZA, A.D.L.; ASTOLF-FILHO, S.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de plantas tóxicas da Amazonia: *Pallcourea longiflora* (AULB.) Rich e *Strychnos cogens* BENTHAM. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 34, p. 185–195, 2004.

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

STIERLE, A.; STIERLE, D.; STROBEL, G.; BIGNAMI, G.; GOTHAUS, P. Bioactive metabolites of the endophytic fungi of Pacific yew, *Taxus brevifolia*. In: GEORG, G.I.; CHEN, T.T.; OJIMA, I.; VYAS, D.M. (Ed.). **Taxane anticancer agents: basic science current status**. Washington: American Chemical Society, 1994. p. 583. (Symposium Series).

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

STROBEL, G.A.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M.; Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*, **Microbiology**, New York, v. 142, p. 435-440, 1996

TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga. In: ARAÚJO, F.S. (Ed.). **Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2002. p. 47-52.

TAN, R.X.; ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Report**, New York, v. 18, p. 448–459, 2001.

TAYLOR, N.B.; FUCHS, R.L.; MACDONALD, J.; SHARIFF, A.R.; PADGETTE, S.R. Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 47, p. 4469- 4473, 1999.

TEJESVI, M.V.; MAHESH, B.; NALINI, M.S.; PRAKASH, H.S.; KINI, K.R.; SUBBIAH, V., SHETTY, H.S. Endophytic fungal assemblages from inner bark and twig of *Terminalia arjuna* W. & A. (Combretaceae). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1535-1540, 2005.

UNTERSEHER, M.; REIHER, A.; FINSTERMEIER, K.; OTTO, P.; MORAWETZ, W. Species richness and distribution patterns of leaf-inhabiting endophytic fungi in a temperate forest canopy. **Mycological Progress**, Munchen, v. 6, p. 201-212, 2005.

VIDENSEK, N.; LIM, P.; CAMPBELL, A.; CLARSON, C. Taxol content in bark, wood, root, leaf, twig and seedlings from several *Taxus* species. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 53, p. 1609-1610, 1990.

ZOU, W.X.; MENG, J.C.; LU, H.; CHEN, G.X.; SHI, G.X.; ZHANG, T.Y.; TAN, R.X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 63, p. 1529–1530, 2000.

6 ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA, ANTIMICOBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DOS METABÓLITOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Combretum leprosum*

Resumo

Quatro linhagens fúngicas endofíticas (CFE03, CFE108, CFE177 e CFE391) isoladas previamente de folhas e galhos de *Combretum leprosum*, obtidas na região semiárida brasileira (S 05°55'33,7", W39°31'44,4"). Foram submetidas a avaliação de atividades biológicas de seus metabolitos secundários quanto às atividades: antimicobacterianas, antioxidante, antitumoral. Os isolados foram submetidos a crescimento em caldo de cultura Czapek (30 dias, 28°C, cultura estacionária), os extratos foram obtidos em múltiplos pHs (3.0; 11.0) por diclorometano, solubilizadas e preparados nas concentrações 10mg/mL⁻¹; 1mg/mL⁻¹; 0,1mg/mL⁻¹; 0,01mg/mL⁻¹; 0,001mg/mL⁻¹. Utilizou-se o ensaio de captura do radical livre DPPH, para avaliação antioxidante, a técnica de Alamar blue para atividade antimicobacteriana em *Mycobacterium bovis* BCG e o ensaio *in vitro* de citotoxicidade em MTT para atividade antiproliferativa das linhagens anticancerígenas testadas. As linhagens fúngicas foram identificadas pela técnica de sequenciamento da região 18S rDNA, com primers amplificadores da região 18S e ITS: linhagem CFE177 para *Fusarium oxysporum*, linhagem CFE03 para *Hypocrea koningii*, linhagem CFE108 para *Aspergillus oryzae*, linhagem CFE391 para *F. solani*. Compostos do extrato 108 de pH ácido, foi o mais potente ação contra *M. bovis* a 0.01 mg/mL⁻¹, com apenas 36.8% de viabilidade bacteriana. Os coeficiente de captura do radical DPPH EC₅₀ variou entre 0.63 a 17.81 µg/mL⁻¹, sendo que os compostos obtidos da linhagem CFE108a (EC₅₀ = 0.63) com capacidade alta equitativa aos padrões, seguido de CFE03 pH básico (EC₅₀ = 3.44), capacidade moderada e os outros extratos com EC₅₀ entre 4.13 a 17.81. Apenas os extratos 177(a; b) não apresentaram nenhuma atividade antioxidante, ocorrendo o inverso, com valores EC₅₀ negativos. As maiores atividade citotóxicos contra linhagens cancerígenas foram observadas foram pelo extrato 108 (IC₅₀ = 0.80 para linfoma histiocítica), leucemia (IC₅₀=0.89), carcinoma de bexiga e de cólon (IC₅₀=3.08 e 2.97), inibe até a concentração 0.01 mg/mL⁻¹. Para os compostos presentes no extrato 177a, apresentaram inibições contra leucemia LLA (P388) com IC₅₀ de 2.14 e linfoma histiocítica (J744) com IC₅₀ de 2.98. Enquanto para os compostos presentes no extrato de CFE03 foram observadas moderadas inibições com o menor IC₅₀ de 4.12 contra linhagem J744. Vale ressaltar que, os compostos obtidos no pH ácido foram mais ativos dentre todos os ensaios realizados. Diante dos supracitados, linhagens fúngicas endofíticas de plantas endêmicas da caatinga evidencia uma fonte em potencial para bioprospecção de compostos com atividades biológicas, principalmente, antitumoral como vistos nestes resultados prévios.

Palavra-chave: Endofíticos; Caatinga; Antitumoral; Antimicobacteriana; Antioxidante; *Fusarium solani*; *Aspergillus oryzae*; *Hypocrea koningii*; *Fusarium oxysporum*

Abstract

Four endophytic fungal strains (CFE03, CFE108, CFE177 and CFE391) previously isolated from leaves and twigs of *Combretum leprosum*, obtained by semiarid region of Brazil (S05 °55'33, 7", W39 ° 31'44, 4"), were subjected to evaluation of biological activities of secondary metabolites: antimycobacterium, antioxidant and antitumor activities. The isolates were grown in culture Czapek (30 days, 28°C, stationary culture), the extracts were obtained from multiple pH (3.0 and 11.0) of dichloromethane, use concentrations: 10mg/mL⁻¹; 1mg/mL⁻¹; 0.1mg/mL⁻¹, 0.01mg/mL⁻¹, 0.001mg/mL⁻¹. The test of the capture of free radical DPPH, for evaluating antioxidant, the technique of Alamar blue for antimycobacteriana activity in *Mycobacterium bovis* BCG and assay *in vitro* cytotoxicity in MTT to antiproliferative activity in cancer cells. The fungal strains were identified by sequencing of 18S rDNA with primers amplifiers 18S and ITS region: strains CFE177 to *Fusarium oxysporum*, CFE03 to *Hypocrea koningii*, CFE108 to *Aspergillus oryzae* and CFE391 to *F. solani*. Compounds 108 extract of acidic pH was the most potent action against *M. bovis* mg/mL⁻¹ to 0.01mg/mL⁻¹, with only 36.8% of bacterial viability. The ratio EC₅₀ capture DPPH ranged from 0.63 to 17.81µg/mL⁻¹, and the compounds obtained CFE108a line (EC₅₀ = 0.63) with capacity equal to high standards, followed by CFE03 basic pH (EC₅₀ = 3.44), moderate capacity and other extracts with EC₅₀ from 4.13 to 17.81. Only extracts 177 (b) showed no antioxidant activity, while the opposite occurred, with EC₅₀ values negative. The highest cytotoxicity activity against cancer lines were observed for the extract were 108 (IC₅₀ = 0.80 to histiocytic lymphoma), leukemia (IC₅₀ = 0.89), bladder carcinoma and colon cancer (IC₅₀ = 3.8 and 2.97), inhibited until the concentration 0.01mg/mL⁻¹. For compounds in the extract 177a, showed inhibition against leukemia (P388) with IC₅₀ of 2.14 and a histiocytic lymphoma (J744) with IC₅₀ of 2.98. As to the compounds present in the extract CFE03 moderate inhibition was observed at the lowest IC₅₀ of 4.12 against strain J744. It is noteworthy that the compounds obtained in acidic pH were more active among all the tests. So, endophytic fungal strains of plants endemic to the caatinga shows a potential source for bioprospection of compounds with biological activities, especially as seen in these antitumor previous results.

Keywords: Endophytic; Caatinga; Antitumor; Antimicrobial; Antioxidant; *Fusarium solani*; *Aspergillus oryzae*; *Hypocrea koningii*; *Fusarium oxysporum*

6.1 Introdução

A diversidade genética dos ecossistemas tem sido usada para solucionar problemas na área da saúde, da agricultura e do meio ambiente. Isto tem sido potencializados pelo rápido desenvolvimento da engenharia genética e nos avanços nas técnicas de bioprospecção. Os ecossistemas de regiões tropicais e subtropicais tem sido alvo de busca de compostos naturais por causa da riqueza de espécies e nichos ecológicos presentes nestas comunidades. Os micro-organismos que habitam o interior das plantas (endofíticos ou endófitos) tornaram-se foco de

interesse por estarem envolvidos na produção de compostos químicos como enzimas, alcalóides, antibióticos, anticancerígenas e diferente metabólitos, os quais favorecem a adaptação da planta perante as condições adversas. Além disso, estão frequentemente associadas à diversidade biológica e diretamente relacionada à descoberta de moléculas químicas com potencial de atividade biológica, tais como taxol, criptocandina, naftaleno, neomicina, beta-lactâmicos, alcaloides, antibióticos, ciclosporina A (STROBEL; DAISY, 2003; GRABLEY; SATTTLER, 2003; MITCHELL et al., 2008; STADLER; KELLER, 2008). A versatilidade da capacidade de síntese de diferentes compostos inerente a esses organismos pode ser reflexo da sua eficiência na exploração em diferentes nichos ecológicos o que torna capaz de competir em diferentes *habitats*. Então, um reservatório em potencial para exploração no uso medicinal, agrícola e industrial (TAN; ZOU 2001; ZHANG et al., 2006).

Espécies do gênero *Combretum* pertencente à família Combretaceae, são utilizadas na África, Índia e Tailândia como plantas medicinais para o tratamento de hepatite, malária, hanseníase e câncer. Estudos fitoquímicos destas plantas indicam a presença de triterpenóides, flavonóides, fenantrenos, taninos, saponinas, estilbenos, polifenóis responsáveis por efeitos analgésicos, antimicrobianos e antitumorais (TAN et al., 2002; PETTIT et al., 1987). No Brasil, na região do semiárido nordestino, este gênero é utilizado como anti-inflamatório, antitumoral, antidiarréico, entretanto, há poucos relatos fitoquímicos dos compostos responsáveis pelas ações terapêuticas apresentadas, principalmente no que se diz respeito a ação antitumoral (PIETROVSKI et al., 2006, AGRA et al., 2007).

Pesquisas reforçam a afirmação de que endofíticos de plantas medicinais podem ser fontes promissoras de substâncias com atividades biológicas. Como exemplo, o taxol um diterpenóide, excelente anticancerígeno contra linhagens celulares cancerígenas de mama e útero, foi extraído da casca da árvore *Taxus brevifolia*, mas que apresenta crescimento lento, baixa rendimento da droga dificultando sua obtenção. Contudo Stierle et al. (1993) isolou do floema desse hospedeiro o fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, que quando cultivado em meio semisintético, produz o paclitaxol (análogo do taxol) constitui-se uma fonte alternativa para a produção desse fármaco (STROBEL; DAISY, 2003). Outro exemplo deste fenômeno é a produção de um composto pertencente ao grupo das fitoalexinas estilbenos por um fungo endofítico do gênero *Fusarium*, o ácido

cajainestilbeno (CSA), compostos do grupo estilbenos até então tinha registro de produção apenas por plantas, o qual atividade biológica constitui ajudar a planta hospedeira a resistir invasores como fungos fitopatogênicos e pragas (ZHAO et al., 2012). Os autores sugerem que a produção de CSA pode ser por meio da biossíntese fúngica, mas existe a possibilidade de CSA pode ser produzida de CSA foram isolados da raiz de *Cajanus cajan* [(L.) Millsp] pertencentes ao gênero de *Fusarium*. Entretanto, a mesma substância foi detectada nas folhas e raízes, sendo as quantidades encontradas nas folhas bem maiores do que nas raízes. Diante de tal evento, podemos levantar a hipótese de que ocorra um mecanismo regulatório planta/fungo modulado, uma vez que se existe fungo produtor nas raízes, a planta produziria em menor quantidade do que nas folhas como uma manobra de economia de gasto energético. Do ponto de vista genético, a produção de metabolitos bioativos, tais como CSA por fungos endofíticos cada vez mais apoia à possibilidade de transferência horizontal de genes entre hospedeiro e seus correspondentes organismos endofíticos. A hipótese de alguns autores como Germaine et al. (2004) e Strobel et al. (1996) é que, no tempo evolutivo, fungos endofíticos tenham adaptado às seus microambientes especiais por variação genética, trocam fragmentos de seus DNAs genômicos podendo conferir a capacidade de certos endofíticos biosintetizarem alguns fitoquímicos que são característicos de suas plantas hospedeiras.

Estudos indicam que 51% das substâncias biológicas isoladas de fungos endofíticos são previamente desconhecidas, neste contexto, os endófitos isolados de plantas medicinais do semiárido brasileiro, podem ser considerados fonte promissora para bioprospecção de novos produtos. Neste trabalho, avaliou-se a potencialidade dos compostos presentes nos extratos brutos provenientes dos fungos endofíticos de *Combretum leprosum*, para atividade antimicrobiana, antioxidante e antitumoral.

6.2 Material e Métodos

Quatro linhagens fúngicas endofíticas (CFE03, CFE108, CFE177 e CFE391) isoladas previamente de folhas e galhos de *Combretum leprosum*, obtidas na região semiárida brasileira (S 05°55'33,7" e W 39°31'44,4"). Foram submetidas a

avaliação de atividades biológicas de seus metabolitos secundários. Os isolados foram identificados por sequenciamento da região 18S rDNA. DNA genômico foi extraído de acordo com os procedimentos do Power Kit, DNA isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, USA). Para reação em cadeia da polimerase foram utilizados primers EF4 e ITS4 para amplificação da região 18S rDNA: EF4 (GGAAGGGRTGTATTTATTAG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) de acordo White et al. (1990). As sequências obtidas foram levadas ao sequenciador automático SCE 2410 (Spectrumedix LLC), para eletroforese capilar. Os eletroferogramas resultantes foram editados através do programa GAP4 do Pacote Staden (STADEN, 1996). As sequências foram submetidas à pesquisa no BLASTn do NCBI (National Center for Biotechnology www.ncbi.nlm.nih.gov).

6.2.1 Obtenção dos metabolitos secundários: cultivo, filtração e obtenção dos extratos brutos das linhagens selecionadas

As linhagens foram cultivadas em meio líquido, 2000mL de caldo Czapek modificado (3g de Nitrato de sódio (NaNO_3), 1g de Fosfato Dipotássico (KH_2PO_4), 0.5g de Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.5g de Cloreto de Potássio (KCl), 0.01g de Sulfato Ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 8g de extrato de levedura, 15.0g de dextrose, pH 7.3), incubada a 28°C, por 30 dias, com ausência de agitação. Após o crescimento fúngico, os caldos de culturas foram submetidos ao sistema de filtração a vácuo (Sartorius), com membrana de celulose de 0,45 μm (Milipore), e centrifugação a 9000rpm por 30 min a 4°C para retirada das células fúngicas. Os filtrados foram submetidos, por três vezes, ao processo de extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas (SDFAs), com o solvente diclorometano na proporção de 1:1 (v/v) em múltiplos pHs (ácido 3.0; básico 11.0) onde houve a formação de duas camadas: uma aquosa, na parte inferior e outra orgânica, na parte superior. Foi adicionado à fase orgânica 5% de sulfato de sódio anidro, filtrada em papel Whatman nº4 e concentrada no evaporador rotativo (Quimis) a temperatura de 45°C, à pressão reduzida (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001). Os extratos brutos obtidos foram pesados em balança analítica e armazenados em freezer a -20°C. O extrato bruto seco do controle negativo foi obtido através da extração do caldo de cultura sem inóculo.

6.2.2 Avaliação da atividade biológica dos extratos orgânicos

6.2.2.1 Atividade antimicobacteriana *in vitro*

O efeito antimicobacteriano dos compostos em teste foi avaliado em *Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guerin), cepa enfraquecida, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Foi realizada a técnica de microdiluição em placa utilizando como revelador o corante Alamar Blue - *Microplate Alamar Blue Assay* (COLLINS; FRANZBLAU, 1997), esquema representativo na figura 6.1. As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em meio líquido de Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI) em cinco concentrações ($10\text{mg}/\text{mL}^{-1}$; $1\text{mg}/\text{mL}^{-1}$; $0,1\text{mg}/\text{mL}^{-1}$; $0,01\text{mg}/\text{mL}^{-1}$, $0,001\text{mg}/\text{mL}^{-1}$). A concentração de DMSO nas diluições foi inferior a 1%. A linhagem *M. bovis* BCG, foi cultivada em meio de cultura Lowenstein-Jesen a 37°C por 20 dias e subcultivadas em meio líquido middlebrook 7H9 (Difco) a 37°C por 15 dias. Em microplacas de 96 poços, foram adicionada suspensão de micobactérias na concentração de $2 \cdot 10^5$ micobactéria/mL e $100\mu\text{L}$ de meio de cultura e diferentes concentrações das amostras. Como controles foram utilizados meio de cultura (controle negativo), meio de cultura e as micobactérias, (controle positivo). Como fármacos controle foi utilizada a rifampicina nas concentrações de 0,015 a $25\mu\text{mol}^{-1}$. A microplaca foi incubada a 37°C e após 7 dias, foram adicionado $25\mu\text{L}$ de uma mistura 1:1 Tween 80 á 10% e Alamar Blue as amostras. A microplaca foi re-incubada a 37°C e após 24 horas a leitura foi realizada pelo leitor espectrofotômetro para determinação da concentração inibitória mínima, definida pela menor concentração de droga capaz de impedir a alteração da cor rósea. A permanência da cor azul indicou ausência de crescimento micobactériano e o desenvolvimento da cor rósea indicou a presença de crescimento micobactériano.

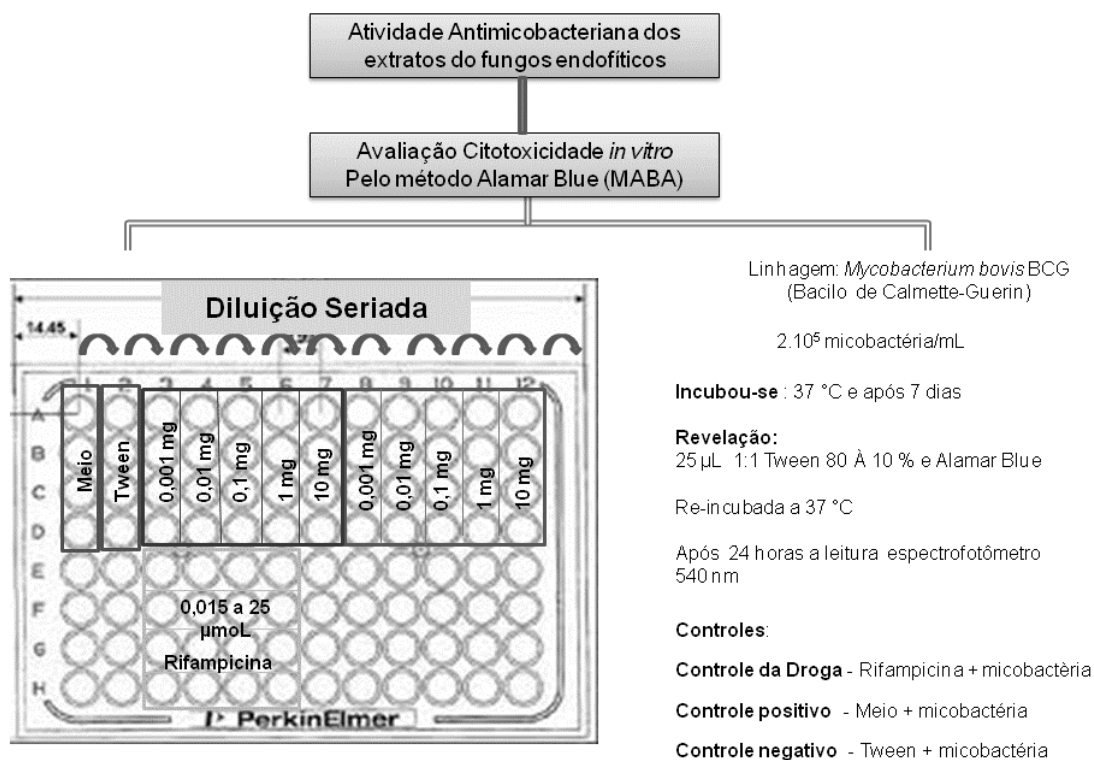
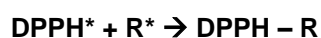
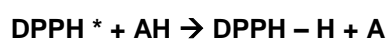


Figura 6.1 - Esquema representativo do ensaio para atividade antimicobacteriana, método Alamar Blue (Collins e Franzblau, 1997) dos extratos diclorometano (pH ácido) das linhagens fúngicas 03a, 108a, 177a e 391a

6.2.2.2 Determinação da Atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH

Brand-Williams et al. (1995) propuseram o método envolvendo a utilização de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH*), no qual compostos antioxidantes reagem com o radical estável em uma solução de etanol. A redução do DPPH* é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo na absorbância em comprimento de onda característico durante a reação. Em sua forma radical, o DPPH* apresenta absorbância a 517nm, mas sob redução por antioxidante (AH) ou uma espécie radical (R*) a absorbância desaparece, como apresenta a equação abaixo:



A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pela amostra é determinada pela habilidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. A

propriedade de sequestrar radicais livres dos compostos presentes em vários extratos de plantas ou microrganismos têm sido recentemente apontado, sugerindo um possível papel redutor destes compostos, reduzindo os riscos de doenças cardiovasculares em humanos. O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes. Esse método pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em curto período de tempo (BRAND- WILLIAMS et al., 1995).

A atividade antioxidante dos extratos brutos foram analisadas baseado na técnica de captura dos radicais livres segundo Milardovic et al. (2006) e modificado para as condições deste trabalho, esquema representativo na figura 6.2. A partir do extrato obtido, preparou-se soluções dos extratos com três concentrações de 5, 2.5; 1.25, 0.625, 0.312 (mg/mL^{-1}). Em ambiente escuro, transferiu-se alíquotas de 100 μL de cada diluição do extrato com 900 μL do radical DPPH, na concentração de 0,004%. Como controle negativo preparou-se 100 μL de álcool etílico com 900 μL do radical DPPH e para controle positivo da solução de DPPH adicionou-se 100 μL da solução de Trolox (ácido. 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico) a 0,05% com 900 μL do radical DPPH. A validade da análise foi confirmada quando a % de redução de trolox deve ser de 50% (± 5). Após a homogeneização incubou as amostras por 30 minutos, com ausência total de luz. As leituras no espectrofotômetro foram realizadas a 517nm.

A atividade de antioxidante dos compostos foi expressa em porcentagem de redução do DPPH (Eq.1). Para cada amostra o ensaio deve ser realizado em triplicata e os resultados apresentados em EC_{50} .

$$\text{Equação 1: \% redução do DPPH} = \frac{[(\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Branco}) / \text{Abs branco}] \times 100}{100}$$

Onde: Abs = absorbância

EC_{50} (concentração efetiva 50%), expressa a concentração mínima de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, plotar a % redução do DPPH no eixo Y e a concentração dos extratos (mg/mL) no eixo X e determinar a equação da reta (Eq. 2). Para o cálculo do EC_{50} utilizou-se a equação

da reta, substituindo o valor de y (Eq. 2) por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH.

Equação 2: $Y = -ax + b$, Onde: $Y = \% \text{ redução do DPPH e}$
 $X = EC_{50} \text{ (mg/mL)}$

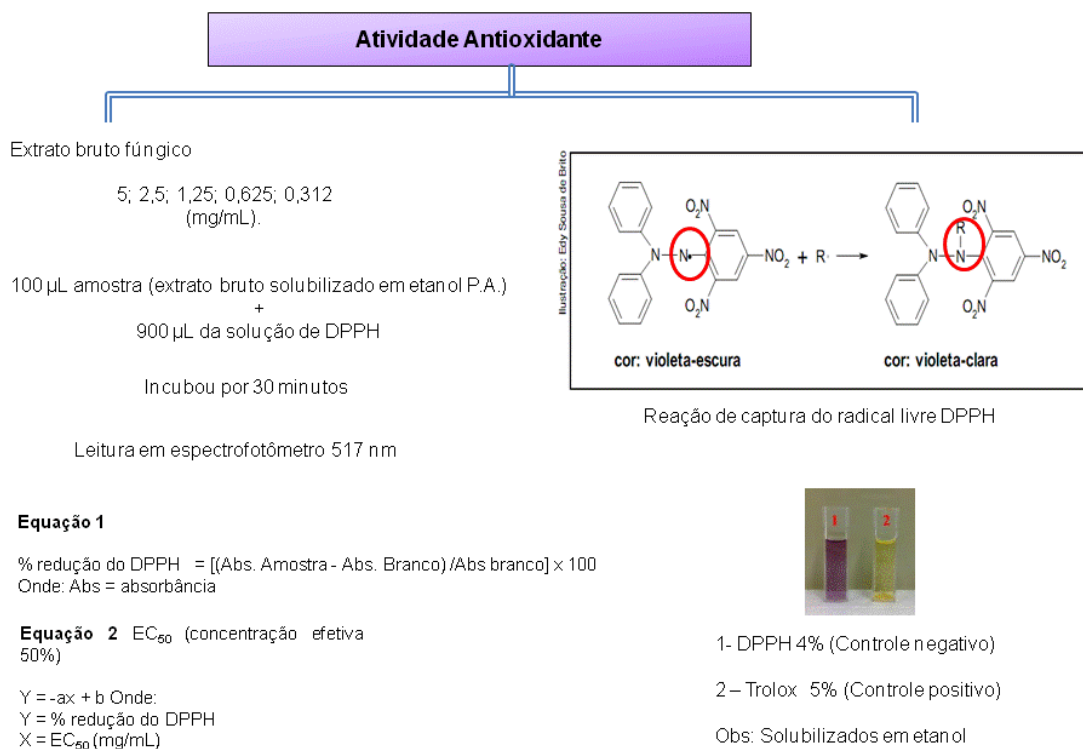


Figura 6.2 - Esquema representativo do ensaio para atividade antioxidante pelo método de captura do radical livre DPPH* (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) dos extratos diclorometano (pH ácido) das linhagens fúngicas 03a, 108a, 177a e 391a

6.2.2.3 Avaliação da atividade antiproliferativa em células tumorais *in vitro*

A determinação da sensibilidade das diferentes doses foi otimizada de acordo com as normas estabelecidas pelo Instituto Nacional de Câncer, USA (NCI). Foram determinadas as atividades citotóxicas das suspensões das linhagens celulares normais e das celulares tumorais cultivadas em placas de 96 orifícios, fundo chato.

A citotoxicidade dos extratos e frações foi avaliada pelo método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) descrito por Mosmann (1983) que consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas, esquema representativo na figura 6.3.

Para estudos *in vitro*, foram utilizadas linhagem de células tumorais: J744 (linfoma histiocítica, tumor não sólido), P388 (Leucemia LLAT- murino, tumor não sólido), Jurkat (Leucemia LLAT humano, tumor não sólido), K562 (Leucemia eritroblástica humano, tumor não sólido), ECV304 (Carcinoma de bexiga humano, tumor sólido), B16F10 (Mieloma murino, tumor sólido) e HeLa (Carcinoma colón humano, tumor sólido). Todas as linhagens foram cedidas pelo Laboratório de Pesquisa do Timo e os experimentos foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Farmanguinhos - Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

As células foram crescidas em meio de cultura RPMI 1640 com L glutamina (Sigma, St. Louis, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de gentamicina. Os testes foram realizados em microplacas com 96 poços com fundo chato (Corning, NY 14831), para as linhagens celulares não aderentes primeiramente foram plaqueadas 100µL da suspensão celular na concentração de $2.10^5 \text{ cel/mL}^{-1}$ em meio RPMI e posteriormente foram acrescentados 100µL dos extratos fúngicos solubilizados em RPMI e DMSO (1%) e nas concentrações 10 mg/mL^{-1} ; 1 mg/mL^{-1} ; $0,1 \text{ mg/mL}^{-1}$; $0,01 \text{ mg/mL}^{-1}$; $0,001 \text{ mg/mL}^{-1}$, incubadas por 20h em estufa a 37°C contendo 95% de ar e 5% CO₂. Para linhagens celulares aderentes inicialmente 100µL da suspensão celular foram plaqueadas e incubadas por 24h em estufa a 37°C contendo 95% de ar e 5% CO₂, para adesão celular, após este período acrescentou-se 100µL nas mesmas concentrações e condições de cultivo que as células não aderentes. Após incubação plaqueou-se 22,5µL de MTT diluído em solução salina a (5 mg/mL^{-1}) para revelação das placas, incubou por 3 horas em ausência total de luz. Centrifugou a placa a 2800rpm por 3 minutos, retirou o sobrenadante com auxílio de pipeta, adicionou-se 150µL de DMSO, incubou por mais 15 minutos protegido de luz e a leitura foi realizada a 540nm com agitação de 5 segundos prévia a leitura espectrofotômetro (Spectromax 190, Molecular Services, Sunnyvale, CA). Vale ressaltar que os testes foram realizados em quintuplicata para cada concentração.

A partir dos dados obtidos da leitura espectrofotométrica, foram calculados a taxa de viabilidade celular de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{Amostras} - \text{branco}}{\text{Meio} - \text{Branco}} \times 100$$

Meio – Branco

Controles: Branco = células lisadas com tween 3% (ausência de viabilidade);

Meio = Meio de cultura RPMI + células;

100% de viabilidade = Meio – branco.

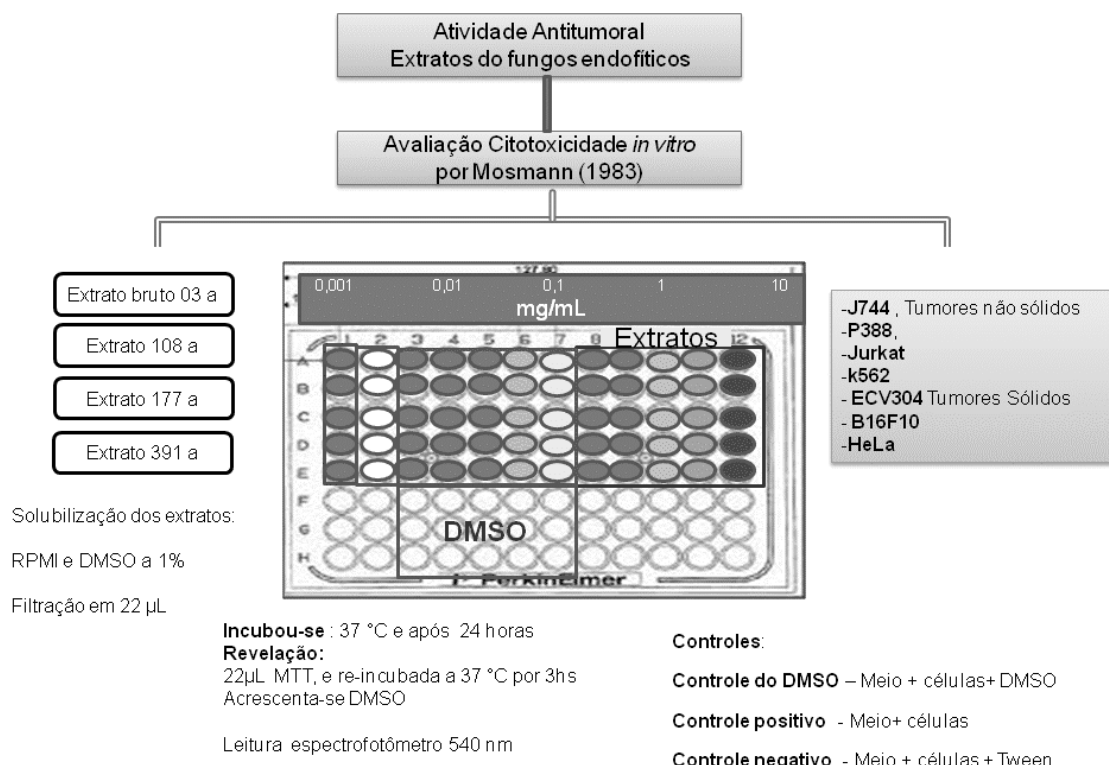


Figura 6.3 - Esquema representativo do ensaio para atividade antitumoral pelo método colorimétrico MTT [3-(5-Dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo tetrazolium] descrito por Mosman (1983) dos extratos diclorometano (pH ácido) das linhagens fúngicas 03a, 108a, 177a e 391a

6.3 Resultados e Discussão

As linhagens fúngicas foram identificadas pelo sequenciamento da região 18S, As sequencias obtidas foram comparadas com sequencias de nucleotídeos depositadas GenBank, apresentando alta similaridade da linhagem CFE177 para *Fusarium oxysporum*, linhagem CFE03 para *Hypocrea koningii*, linhagem CFE108 para *Aspegillus oryzae*, linhagem CFE391 para *Fusarium solani*.

Através dos experimentos foi possível perceber que as condições ideais de cultivo, em meio líquido, visando a produção de metabolitos ativos, variam de um fungo para o outro. Além disso, a forma de extração é um fator importante na obtenção das substancias de interesse, pois pode favorecer a extração de alguns metabolitos em detrimentos de outros. Assim, a extração utilizando a variação de pH parece ser umas da melhores alternativas para obter extratos mais complexos, purificados e em maiores rendimentos, em concordância com Sana e Fischer (2007).

6.3.1 Atividade antimicobacteriana

A atividade antimicobacteriana contra *M. bovis* BCG dos extratos estão apresentadas na tabela 6.1. Pode-se observar que todos os extratos apresentaram alguma atividade inibitória nas concentrações utilizadas, mostrando que o solvente escolhido neste estudo (diclorometano) foi capaz de extrair metabolitos bioativos. O extrato 108a foi o mais potente com a menor concentração inibitória de 0.01 mg/mL⁻¹ e com apenas 36.8% de viabilidade bacteriana nesta concentração. Para os outros extratos as maiores inibições foram observadas apenas na concentração de 1 mg/mL⁻¹ com viabilidade entre 39.6 a 55.9%, como apresentando na figura 6.4.

Tabela 6.1 - Concentração inibitória mínima dos extratos fúngicos contra *M. bovis* BCG

Extratos fúngicos	Viabilidade (%)		
	mg/mL ⁻¹		
	0.01	0.1	1
03 a	72.05	45.03	55.91
108 a	36.88	33.18	30.82
177 a	91.92	64.37	39.61
391 a	79.87	56.43	46.37

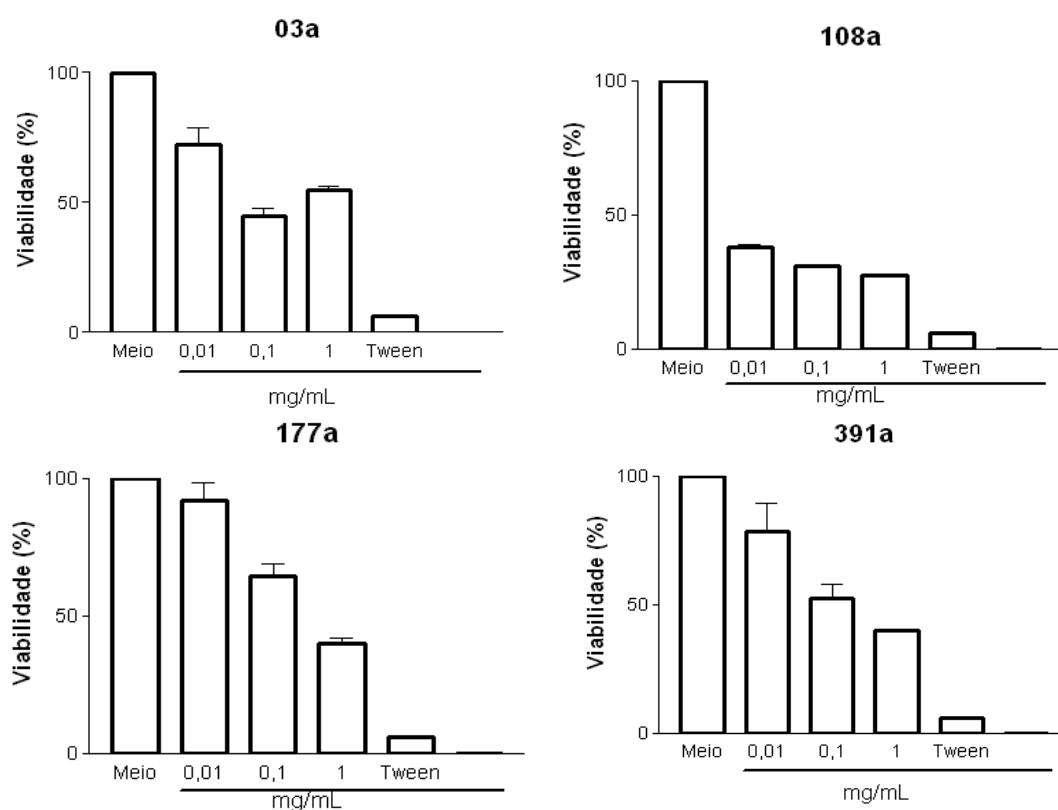


Figura 6.4 - Representação gráfica da atividade antimicobacteriana dos extratos fúngicos contra *M. bovis* BCG

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa respiratória crônica, que vem afligindo a humanidade há muito tempo, os agentes etiológicos causadores da tuberculose em mamíferos são formados pelo complexo, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti* e *M. africanum* (COLLINS; GRANGE 1987; O'REILLY; DABORN, 1995). O *M. bovis*, conhecido como bacilo tubérculo bovino e que causa a tuberculose em uma gama de animais tais como: bovinos, raposas, búfalos, porco, ovelha, cachorro, homens, primatas não humano e outros. A transmissão ocorre entre intra e interespecíficos, além do contanto com fluidos corpóreos infectados, tornando muito difícil sua total erradicação e em países em desenvolvimento é considerado um grave problema de saúde publica que afeta aproximadamente 32% da população mundial. No Brasil, 80.000 casos são registrados anualmente, com taxa de incidência de 37.1/100.000 habitantes, segundo dados do Ministério da Saúde, além disso, entre as pessoas infectadas no mundo, cerca de oito milhões por ano desenvolvem tuberculose activa e quase dois milhões de pessoas morrem (COLLINS; GRANGE 1987; O'REILLY 1995; TRIPATHI et al., 2004; CRUZ et al., 2010; WHO, 2010).

Atualmente, mesmo as regiões onde a tuberculose não era mais prioridade nas políticas de saúde, ele vem ressurgindo. As possíveis razões para o recrudescimento desta anomalia incluem a epidemia da AIDS, os níveis crescente de pauperização, uso de drogas, a existência de mutantes resistentes em cepas selvagens, sua provável seleção pelo tratamento sob certas condições, além de poucas drogas potentes para combatê-la.

Neste bioensaio, observamos que compostos presentes no extrato bruto do isolado CFE108, identificado com alta similaridade de *Aspergillus oryzae* apresenta interessante atividade contra *M. bovis*, tornando um candidato em potencial como protótipo antimicobacteriana. Sabe-se que é necessário continuar os estudos a níveis *in vivo* e para outras linhagens de *Mycobacterium* a fim de confirmar a bioatividade.

6.3.2 Atividade antioxidante

A avaliação preliminar quantitativa dos extratos pela redução do radical DPPH sugeriu a existência de substancias com atividade antioxidante. As atividades foram dose-dependente, o que permitiu o cálculo do EC₅₀ para cada um dos extratos

fúngicos analisados. As porcentagens de inibição obtidas para cada extrato plotadas na figura 6.5 (A), relacionando concentração versus % de inibição, calculando-se o coeficiente de regressão linear e equação da regressão da reta, exposto na tabela 6.2.

A quantidade de extrato bruto fúngico testadas necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH a 50%, EC_{50} variou entre 0.63 a 17.81 $\mu\text{g/mL}^{-1}$, sendo que os compostos obtidos da linhagem CFE108a ($EC_{50} = 0.63$) mostrou-se comparável aos controles positivos rutina ($EC_{50} = 0,74$), quercetina ($EC_{50} = 0,03$) e trolox ($EC_{50} = 0,01$), figura 6.5(B). Os compostos obtidos da linhagem fúngica CFE03b ($EC_{50} = 3.44$), apresentaram capacidade moderada seguida de fraca para os outros extratos com EC_{50} entre 4.13 a 17.81. Apenas os extratos 177(a e b) não apresentaram nenhuma atividade antioxidante, ocorrendo o inverso, com valores EC_{50} negativos, que pode ser resultante de uma ação de oxidação, entretanto não pode ser provada neste estudo.

Tabela 6.2 - Equação da reta usada para calcular EC_{50} da atividade antioxidante de extratos fúngicos endofíticos de *C. leprosum*

Amostra	Equação da reta	R ²	EC ₅₀
03 a	$y = 4.4755x + 7.7092$	0.974	9.44
03 b	$y = 12.086x + 8.3649$	0.996	3.44
108 a	$y = 6.673x + 45.772$	0.636	0.63
108 b	$y = 3.4664x + 7.0841$	0.977	12.38
177 a	$y = -16.209x + 10.204$	0.928	-2.45
177 b	$y = -5.5351x + 2.1237$	0.970	-8.65
391 a	$y = 9.403x + 9.4462$	0.962	4.31
391 b	$y = 3.0664x - 4.6374$	0.977	17.82
Trolox	$y = 9.511\ln(x) + 88.093$	0.910	0,01
Quercetina	$y = 10.44\ln(x) + 85.837$	0.826	0,03
Rutina	$y = 10.844\ln(x) + 78.107$	0.920	0,07

(EC_{50} = coeficiente de equivalência)

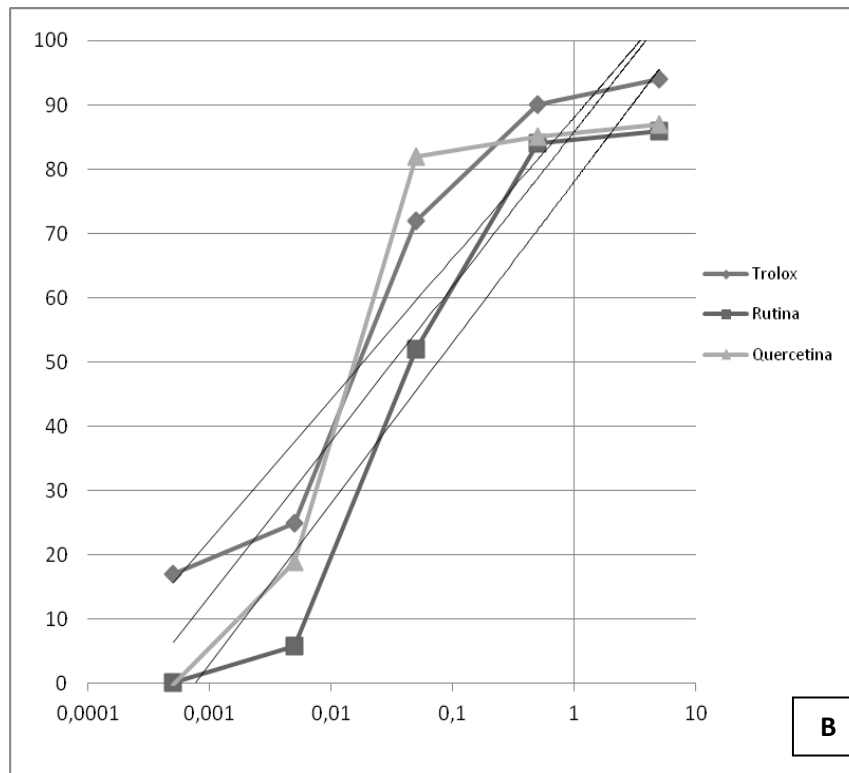
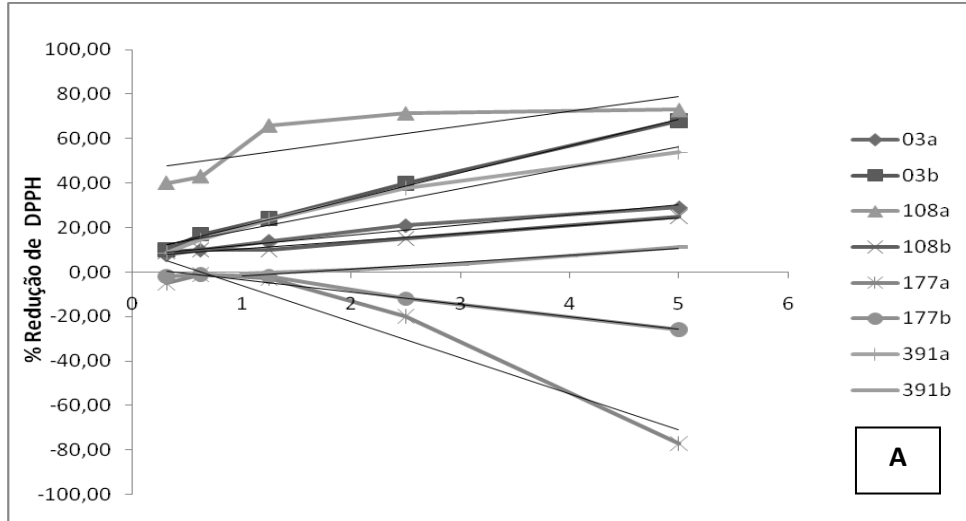


Figura 6.5 - (A) Efeito da captura dos radicais livre DPPH do extrato bruto de múltiplos pHs de fungos endofíticos de *C. leprosum*. (B) Determinação da atividade de captura do radical livre pelos padrões Trolox, Quercetina e Rutina

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos extratos fúngicos e controles positivos, nas concentrações 5, 2.5; 1.25, 0.625, 0.312 (mg/mL^{-1}), determinada pelo ensaio do DPPH, estão apresentados na figura 6.2, mostrando que de todos os extratos testados, 6 apresentaram atividade sequestradora do radical DPPH. Assim como apresentado na tabela 6.3, os maiores potencias redutores do radical livre DPPH, foram observadas nos extratos 108a ($\text{EC}_{50} = 0.63$).

Tabela 6.3 - Percentual de redução do DPPH pelos extratos fúngicos utilizados de acordo com as concentrações utilizadas

Amostras	% de Redução do DPPH				
	mg/L ⁻¹				
	0.312	0.625	1.25	2.5	5
03a	7.90	10.00	14.00	21.00	29.00
03b	10.00	17.00	24.00	39.90	68.00
108a	40.00	43.00	66.00	71.50	73.00
108b	9.00	10.00	10.00	15.00	25.00
177a	-5.00	-1.00	-3.00	-20.00	-77.00
177b	-2.00	-1.00	-2.00	-12.00	-26.00
391a	8.64	14.50	23.66	37.73	53.80
391b	-0.75	1.08	3.70	7.33	11.45

Antioxidantes são compostos capazes de reduzir a ação de espécies reativas de oxigênio (radicais livres) que podem causar danificação em tecidos orgânicos. A formação de radicais livres está associada com o metabolismo natural das células, pois o consumo do oxigênio durante o crescimento celular resulta na geração de compostos que interagem com lipídios e produzem radicais livres na forma de superóxidos, hidroxilas e peróxidos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A ação de tais radicais em organelas celulares por meio da oxidação de lipídios, lisossomos e membranas mitocondriais, causa um desequilíbrio eletrolítico de constituintes endo e exonucleares, o qual resulta em danos celulares e teciduais por diferentes mecanismos. Tais eventos contribuem para o desenvolvimento de patologias como inflamação, artrites, doenças gastrointestinais, isquemia, cardiovasculares, desordem no sistema nervoso e doenças neurodegenerativas (SOKMEN et al., 2005; HUANG et al., 2007). Portanto, a utilização de substâncias com ação de capturar radicais livres surge como uma alternativa na terapia de várias doenças, o que torna importante a busca de novos compostos capazes de inibir processos oxidativos, *in vivo*, sem a presença de risco para a saúde humana (HUANG et al., 2007).

A capacidade de sequestro do radical livre DPPH pela amostra é determinada pela habilidade de transferência de hidrogênio para o radical livre estável DPPH. A

propriedade de sequestrar radicais livres dos compostos presentes em vários extratos de plantas ou micro-organismos tem sido recentemente apontada sugerindo um possível papel redutor destes compostos, diminuindo os riscos de doenças cardiovasculares em humanos. O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Estudos mostram que a alta atividade antioxidante dos compostos pode se dar em decorrência da presença, principalmente, de compostos fenólicos (por exemplo, ácidos fenólicos, flavonóides, quinines, cumarinas, lignanas, taninos), compostos de azoto (alcalóides, aminas, Betalaínas), vitaminas, terpenóides (carotenóides incluínd), e alguns outros metabolitos endógenos, que são ricos em antioxidante atividade (ZHENG; WANG, 2001; ELOFF et al., 2008). (ARUOMA et al., 1996; SOKMEN et al., 2005). Dois compostos, pesticina e isopestacina (isobenzofutanona) foram isolados e caracterizados de culturas de *P. microspora*, um fungo endofítico de *Terminalia morobensis* (planta da família Combretaceae), apresentaram atividade antioxidante, além de antimicrobiana contra *Pythion* sp. *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* (STROBEL; DAISY, 2003), sendo assim, metabolitos isolados de endofíticos de plantas pertencente à família Combretaceae apresentam atividade biológicas interessantes, alvo para prospecção de novos compostos (ARUOMA et al., 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SOKMEN et al., 2005; SOUSA et al., 2007).

6.3.3 Atividade antitumoral

A avaliação da atividade antitumoral de cada extrato fúngico foi realizada em sete linhagens tumorais (sólidos e não sólidos) e todos os extratos brutos fúngicos apresentaram atividade antitumoral em pelo menos uma das concentrações utilizadas. Os coeficientes de inibição (IC_{50}) estão apresentados na tabela 6.4 e efeitos citotóxicos de acordo com as concentrações estão visualizados na figura 6.6.

Os compostos presentes no extrato obtido da linha CFE108a identificada como *Aspergillus* sp. apresentou significantes efeitos citotóxicos contra as linhagens causadores de linfoma histiocítica (J744) com IC_{50} de 0.80 e leucemia (Jurkat) com IC_{50} de 0.89. Dentre os tumores sólidos os maiores inibições foram contra carcinoma de bexiga (ECV304) com IC_{50} de 3.08 e carcinoma de cólon (HeLa) com IC_{50} de

2.97. Além disso, os extrato 108a foi o único que apresentou inibição até a concentração 0.01mg/mL^{-1} , como observado na figura 6.3.

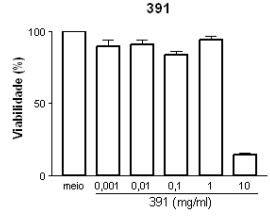
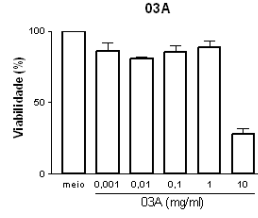
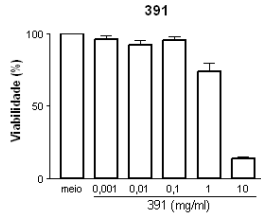
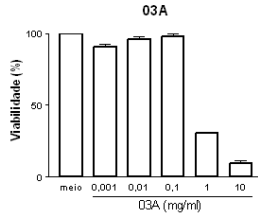
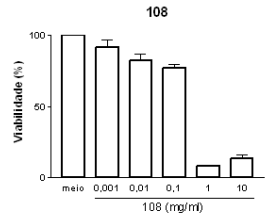
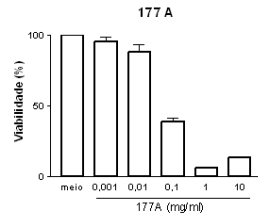
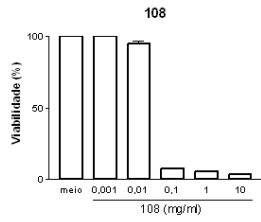
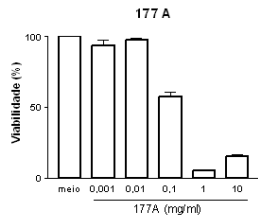
Para os compostos presentes no extrato 177a, com alta similaridade para *Fusarium oxysporum*, apresentaram os maiores índices de inibições contra leucemia LLA (P388) com IC_{50} de 2.14 e linfoma histiocítica (J744) com IC_{50} de 2.98. Para as outras linhagens cancerígenas apresentou atividade moderada com valores de IC_{50} entre 3.40 a 175. Contudo, este extrato em particular apresentou os maiores efeitos citotóxicos na concentração de 1mg/mL^{-1} do que na concentração de 10mg/mL^{-1} , como pode ser observado na figura 6.3. Este evento, antagonismo químico, pode demonstra a presença de misturas de compostos diferentes que competem entre si, pelos mesmos sítios de ação e/ou quando diluídos, a atividade de um composto é potencializado pela diminuição da concentração do outro. Em relação atividade citotóxica dos compostos presentes nos extratos obtidos da linhagem CFE03 (identificada como *Hypocrea koningii*), foram observadas moderadas inibições com o menor IC_{50} de 4.12 contra linhagem J744. O extrato 391a com alta similaridade para *Fusarium solani* apresentou todos os valores de IC_{50} acima de 5, sendo o menos eficaz neste ensaio.

Neste estudo, as linhagens de tumores não sólidos foram mais susceptíveis aos compostos teste do que os tumores sólidos, isto é um indicativo dos possíveis mecanismos de ação dos compostos em teste.

Tabela 6.4 - Concentração inibitória IC_{50} dos extratos fúngicos contra linhagens de células cancerígenas

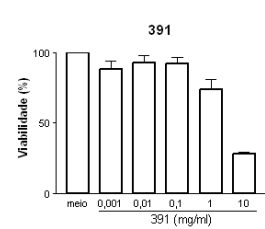
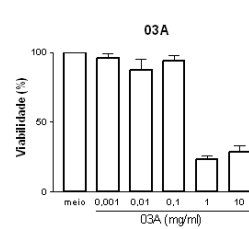
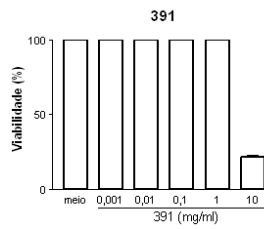
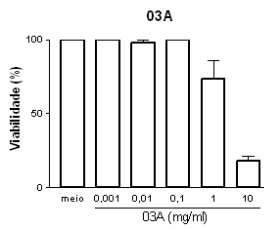
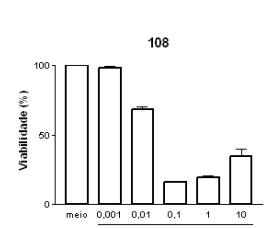
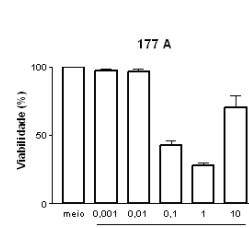
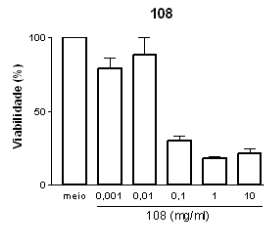
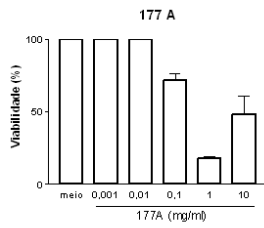
Células Tumorais	IC_{50}			
	03a	108a	177a	391a
B16F10	5.28	5.00	4.67	8.11
ECV304	4.54	2.97	5.42	5.80
HeLa	5.42	3.08	3.40	5.96
P388	6.29	2.89	2.14	5.33
K562	5.87	1.47	7.78	6.51
Jurkat	4.77	0.89	175.0	6.25
J744	4.12	0.80	2.98	5.36

a - extratos orgânicos obtidos em pH ácidos (3), IC_{50} —Coeficiente de inibição



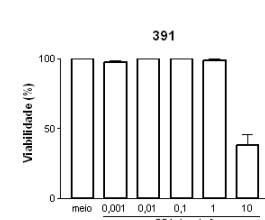
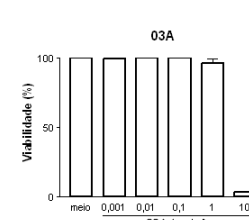
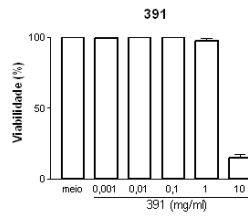
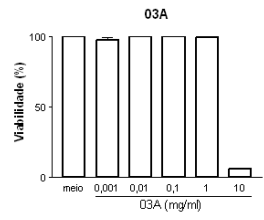
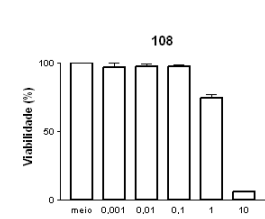
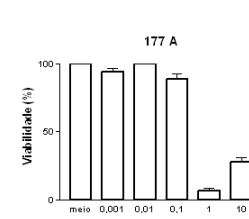
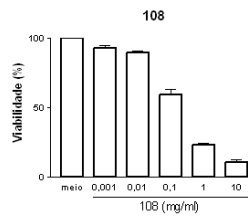
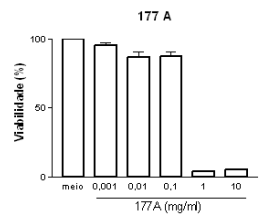
Linhagem J774 – linfoma histiocítico

Linhagem P388 – leucemia LLA- T mutino



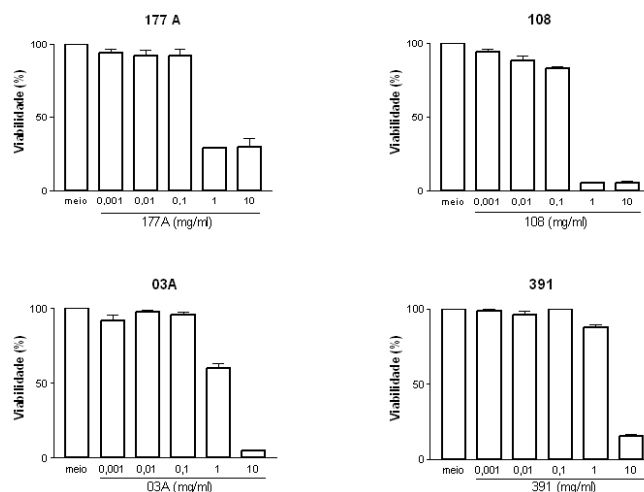
Linhagem K562– leucemia eritoblástica humana

Linhagem JURKAT - Leucemia LLA-T humana



Linhagem HeLa (carcinoma colon humano)

Linhagem B16F10 (mieloma murino)



Linhagem ECV304 – carcinoma de bexiga humano

Figura 6.6 - Gráficos dos ensaios de citotóxicidade dos extratos brutos fúngicos frente a sete linhagens cancerígenas; construção de dados baseados na viabilidade versus concentrações utilizadas

De acordo com pesquisas para ensaios focados na descoberta de drogas anticâncer, o Instituto de Câncer Nacional dos Estados Unidos (NCI) (SHOEMAKER, 2006) desenvolveu um programa primário de *screening* para determinar as principais modelos para avaliação da atividade antiproliferativa de linhagens celulares cancerígenas *in vitro*. Os testes de microcultivos *in vitro* que avaliam o crescimento e viabilidade celular tais como MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e XTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), que são testes colorimétricos em que a concentração da coloração resultante pela redução do MTT ou XTT em sal de formazam determina proporcionalmente a viabilidade das células. Além disso, existe a necessidade de utilização de no mínimo 3 linhagens de células cancerígenas, de preferências de tumores sólidos e não sólidos, para real determinação da possível ação dos compostos testes. Com base em tais afirmações, neste trabalho utilizamos a técnica de microcultivo *in vitro* utilizando o MTT como revelador e podemos afirmar que esta técnica é simples, rápidas e de fácil interpretação. Utilizamos também, sete linhagens cancerígenas de humanos e murinos (camundongos) para determinar a real atividade antiproliferativa dos compostos em questão.

A contínua necessidade de novos produtos antitumorais gera a necessidade de pesquisar novas fontes de bioprospecção tal como micro-organismos endofíticos, os quais representam uma fonte abundante e confiável de bioativos e quimicamente

novos compostos com potencial para exploração em uma ampla variedade de aplicação médica, agrícola e industrial. Os mecanismos pelos quais endófitos existem e responder ao seu ambiente deve ser melhor compreendido, isto pode facilitar os processos de detecção de produtos. Embora o trabalho sobre a utilização deste vasto recurso apenas começou, estudos tem mostrado enorme potencial para estes organismos, como pode ser observado com os resultados deste trabalho.

Investigações anteriores demonstraram metabólitos secundários de fungos revelam ser um importante grupo de novo agentes biológicos, apresentando baixa toxicidade para células normais, além de em sua maioria possuírem baixo peso molecular, exibindo um potencial atividade anticâncer pois podem desencadear um grande conjunto de processos incluindo a apoptose, angiogênese, metástase, regulação do ciclo celular, e transdução de cascatas de sinalização tais como: Viridina (*Trichoderma viride*), Isoechinulina A (*Aspergillus ruber*), Chaetoglobosin C (*Chaetomiun globosum*), Cytochalasina A (*Phoma exigua*, *Ascochyta heteromorpha*, *Helminthosporium dematioideum*) (atividade citotóxica em células Hela com interferência na divisão celular), zigosporina D (*Phoma exigua*, *Ascochyta heteromorpha*) (atividade citostática em P-185 células de mastócito), Randarin B (*Aspergillus sulphureus*) (citotóxicidade contra linhagens de tumores sólidos) (COLE; SCHEWEIKERT, 2003).

Outras atividades biológicas também são observadas incluindo: oxysporidinone e 6-epi-oxysporidinone como agentes anti-fúngicos (BREINHOLT et al., 1997), agentes antimicrobianos como beauvericina e bikaverin, toxinas fúngicas fumonisina e sambutoxin, fosfatidilinositide inibidor 3-quinase, agente imunossupressor como ciclosporina A (ZHAN et al., 2007; JAYASINGHE et al., 2006). Octa-hidro-antraquinona, com atividade antimicobacteriana conta espécies de *Mycobacterium*, fusarantraquinonas, fusarnaftoquinonas A-C e fusarona derivados de *Fusarium* spp isolados de ambientes marinhos com ampla atividade antibacteriana, antifúngica, antimicobacteriana, antimálaria, citotóxicas em câncer de próstata (TRISUWAN et al., 2010). Vale ressaltar a descobertas de novos alcaloides como fusamina com atividade antiproliferativa, tetrahidrocarbolin, tirosino, provenientes de endofíticos de *Aegiceras corniculatum* (DING et al., 2012). Neste estudo as linhagens endofíticas utilizadas foram a linhagem CFE03 para *Hypocrea koningii*, linhagem CFE108 para *Aspergillus oryzae*, a linhagem CFE177 identificada como *Fusarium oxysporum*, a linhagem CFE391 identificada como *Fusarium solani*, e os nossos resultados corroboram com os

referenciado acima, que linhagens fúngicas endofíticas de plantas endêmicas da caatinga evidencia uma fonte em potencial para bioprospecção de compostos com atividades biológicas, principalmente, antitumoral como vistos nestes resultados prévios. Entretanto, há necessidade de estudos de caracterização química para identificação dos compostos responsáveis por tais ações, além da continuidade dos estudos para os mecanismos de ação utilizados pelos mesmos.

Tabela 6.5 - Identificação dos fungos endofíticos, segundo sequenciamento da região 18S do DNAr

Código	Percentual de cobertura	Percentual de identidade	Taxon encontrado	Número de acesso Genbank
CFE063	100%	99%	<i>Hypocrea koningii</i>	AJ301990
CFE108	100%	98%	<i>Aspergillus oryzae</i>	DQ155287
CFE177	100%	99%	<i>Fusarium oxysporum</i> , strain OUCMDZ-639	JN604548
CFE391	100%	99%	<i>Fusarium solani</i> strain EGY1	JQ837837

Referências

AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.; COELHO, V.P. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 111, p. 383-95, 2007.

ARUOMA, O.I. Free radicals: dietary advantages and disadvantages. In: SCANDALIOS, J. G.. (Ed.). **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses**. Cold Spring Harbor: CSHL Press, 1996. p. 841-860. ((Cold Spring Harbor Monograph Series, 34).

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Lebensm Wiss Technology**, Oxford, v. 28, p. 25-30, 1995.

BREINHOLT, J.; LUDVIGSEN, S.; RASSING, B.R.; ROSENDAHL, C.N. Oxysporidinone: a novel, antifungal *N*-Methyl-4-hydroxy-2-pyridone from *Fusarium oxysporum* **Journal of Natural Products**, Washington, v. 60, p. 33-35, 1997.

COLE, R.J.; SCHWEIKERT, M.A. **Handbook of secondary fungal metabolites**. San Diego: Elsevier Science, 2003. v. 1, 1006 p.

COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M. Zoonotic implications of *Mycobacterium bovis* infection. **Irish Veterinary Journal**, London, v. 41, p. 363-366, 1987.

- COLLINS, L.; FRANZBLAU, S.G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 41, p. 1004-1009, 1997.
- CRUZ, H.L.A.; MONTENEGRO, R.A.; LIMA, J.F.A.; POROCA, D.R.; LIMA, J.F.C.; MONTENEGRO, L.M.L.; CROVELLA, S.; SCHINDLER, H.C. Evaluation of a nested-pcr for *Mycobacterium tuberculosis* detection in blood and urine. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, p. 321-329, 2010.
- DING, L.; DAHSE, H.M.; HERTWECK, C. Cytotoxic alkaloids from *Fusarium incarnatum* associated with the mangrove tree *Aegiceras corniculatum*, **Journal of Natural Products**, Washington, v. 75, p. 617-621, 2012.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, p. 61- 68, 1997.
- GERMAINE, K.; KEOGH, E.; GARCIA-CABELLOS, G.; BORREMANS, B.; LELIE, D.; BARAC, T.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD, J.; MOORE, F.P.; MOORE, E.R.B.; CAMPBELL, C.D.; RYAN, D.; DOWLING, D.N. Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. **FEMS Microbiology Ecology**, New York, v. 48, p.109, 2004.
- GRABLEY, S.; SATTLER, I. Natural products for lead identification: nature is a valuable resource for providing tools. In: HILLISCH, A.; HILGENFELD, A. (Ed.). **Modern methods of drug discovery**. Switzerland: Birkhauser Verlag, 2003. p. 87-107.
- HUANG, W.; CAI, Y.; XING, J.; CORKE, H.; SUN, M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. **Economic Botany**, New York, v. 61, p. 14-30, 2007.
- JAYASINGHE, L.; ABBAS, H.K.; JACOB, M.R.; HERATH, W.H.M.W.; NANAYAKKARA, N.P.D. *N*-Methyl-4-hydroxy-2-pyridinone Analogues from *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 69, p. 439-442, 2006.
- KILIKIAN, B.V.; PESSOA, JR. A.P. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMILDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Org.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 2, p. 201-215.
- MILARDOVIC, S.; IVEKOVIC, D.; GRABARIC, B.S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. **Bioelectrochemistry**, Amsterdam, v. 68, p. 175-180, 2006.
- MITCHELL, A.M.; STROBEL, G.A.; HESS, W.M.; VARGAS, P.N.; EZRA, D. *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 31, p. 37-43, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 16, p. 55-63, 1983.

O'REILLY, L.M. Tuberculin skin test: sensitivity and specificity. In: THOEN, C.O.; STEELE, J.H. (Ed.). **Mycobacterium bovis infection in animals and humans**. Ames: Iowa State University, 1995. p. 85-91.

O'REILLY, L.M.; DABORN, C.J. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. **Tubercle and Lung Disease**, New York, v. 76, p. 1-46, 1995.

PETTIT, G.R.; SINGH, S.B.; NIVEN, M.L.; HAMEL, E.; SCHMIDT, J.M. Isolation, structure, and synthesis of combretastatin A-1 and B-1, potent new inhibitors of microtubule Assembly, derived from *Combretum caffrum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 50, p. 119-131, 1987.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta, 6beta, 16beta-trihydroxylup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Amsterdam, v. 83, p. 90-99, 2006.

SANA, T.R.; WADDELL, K.; FISCHER, S. M. A sample extraction and chromatographic strategy for increasing LC/MS detection coverage of the erythrocyte metabolome, **Journal Of Chromatography B**, Amsterdam, v. 875, p. 314-321, 2008.

SHOEMAKER, R.H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen, **Nature Reviews Cancer**, London, v. 6, p. 813-823, 2006.

SOKMEN, M.; ANGELOVA, M.; KRUMOVA, E.; PASHOVA, S.; IVANCHEVA, S.; SOKMEN, A.; SERKEDJIEVA, J. *In vitro* antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. **Life Sciences**, Oxford, v. 76, p. 2981-2993, 2005.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-Jr., G.M.; AYRES, M.C.C. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 351-355, 2007.

STADEN, R. The staden sequence analyses package. **Molecular Biotechnology**, Boston, v. 5, p. 233-241, 1996.

STADLER, M.; KELLER, N.P. Paradigm shifts in fungal secondary metabolite research. **Mycological Research**, Amsterdam, v. 112, p. 127-130, 2008.

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

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

STROBEL, G.; YANG, X.; SEARS, J.; KRAMER, R.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*, **Microbiology**, Dubuque, v. 142, p. 435-440, 1996.

TAN, F.X.; SHI, S.; ZHONG, Y.; GONG, X.; WANG, Y. Phylogenetic relationships of Combretaceae (Combretaceae) inferred from plastid, nuclear gene and spacer sequences. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 115, p. 475–481, 2002.

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

TRIPATHI, R.P.; TEWARI, N.; DWIVEDI, N.; TIWARI, V.K. Fighting tuberculosis: an old disease with new challenges. **Medical Care Research and Review**, California, v. 25, p. 93-131, 2004.

TRISUWAN, K.; KHAMTHONG, N.; RUKACHAISIRIKUL, V.; PHONGPAICHIT, S.; PREEDANON, S.; SAKAYAROJ, J. Anthraquinone, Cyclopentanone, and Naphthoquinone derivatives from the sea fan-derived fungi *Fusarium* spp. PSU-F14 and PSU-F135, **Journal of Natural Products**, Washington, v. 73, p. 1507–1511, 2010.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing; WHO report. 2007**. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/2007/pdf/full.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2012.

ZHAN, J.; BURNS, A.M.; LIU, M.X.; FAETH, S.H.; GUNATILAKA, A.A.L. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum* **Journal of Natural Products**, Washington, v. 70, p. 227-232, 2007.

ZHANG, C.L.; PEARSON, A.; LI, Y.L.; MILLS, G.; WIEGEL, J. A thermophilic temperature optimum for crenarchaeol and its implication for archaeal evolution. **Applied Environment Microbiology**, Washington, v. 72, p. 4419-4422, 2006.

ZHAO, J.T.; FU, Y.; LUO, M.; ZU, Y.G.; WANG, W.; ZHAO, C.; GU, C. Endophytic fungi from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] produce antioxidant cajanin stilbene acid. **Journal of Agriculture, Food and Chemistry**, Easton, v. 60, p. 4314–4319, 2012.

7 ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Aspergillus oryzae* (CFE108)

Resumo

O presente trabalho teve como escopo isolamento, purificação e elucidação química dos compostos obtidos de extrato bruto de diclorometano da linhagem endofítica fúngica *Aspergillus oryzae* CFE108. O Processo de isolamento foi realizado pelo fracionamento bioguiado do extrato bruto diante das atividades biológicas (Antimicrobiana, Antioxidante, Anticancerígenas), as mesmas inicialmente observadas no extrato bruto. Foram utilizadas técnicas cromatográficas (cromatografia em coluna, CCD, CCD preparativa) e espectrométricas (GC-MS, LC-MC, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, COSY, HMBC, HMQC) para identificação e elucidação dos compostos. Os resultados mostram as frações que foram obtidas pela solução de solventes de média polaridade: Clorofórmio/metanol (8:2); Clorofórmio/Metanol (9:1), Clorofórmio/Metanol (8:2) apresentaram as mesmas atividades observadas anteriormente pelo extrato bruto: sequestro do radical livre DPPH com EC₅₀ de 6.67, ação antimicrobiana para linhagens fúngicas e bacterianas como maior ação frente *P. aphanidermatum*, *S. rolfis*, *Phytophthora* sp. e *S. sclerotium*. De acordo com as atividade citotóxicas as maiores ações foram contra as linhagens linfoma histiocística (J744), mieloma murino (B16F10) e baixa citotóxicidade para carcinoma de bexiga (ECV304) e leucemia eritroblástica humana (k562) na concentração de 1mg/mL⁻¹. Foram isolados dois compostos: SS-XL-32-01 identificado como bis-(2-etilhexil) ftalato (DEHP) e SS-XL-20-1 identificado como fenol, 2.2metileno-bis[6-(1,1-dimetiletil)-4-etil], ambos com atividade anticâncer para células Hela com percentual de ate 98% e 71%, de morte, respectivamente. Além disso, a modificação através da reação de metilação do composto SS-XL-32-1 resultou na quebra do anel aromático, formação de 4 subprodutos e perda da atividade, sendo um indicativo do sitio ativo da molécula responsável pela atividade observada.

Palavras-chave: *Aspergillus oryzae*; Anticancerígeno; *Combretum leprosum*; Caatinga; Biomoléculas; Bis-(2-etilhexil)ftalato; Fenol 2.2methylenobis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-ethyl]

Abstract

The scope of this study was isolation, purification and elucidation of the chemical compounds obtained from dichloromethane crude extract of endophytic fungal, *Aspergillus oryzae* CFE108 strain. The isolation procedure was performed by fractionation of the crude extract according to biological activities (antimicrobial, antioxidant, anticancer), as observed in the crude extract. Chromatographic techniques were used (column chromatography, TLC, preparative TLC) and spectrometric (GC-MS, LC-MC, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, COSY, HMBC, HMQC) for identification and clarification of the compounds. The results show fractions that were obtained by the solution of average polarity solvent: chloroform/methanol (8:2),

chloroform/methanol (9:1), chloroform/methanol (8:2), the same activities as previously observed for the extract crude: the captures of free radical DPPH with EC_{50} of 6.67, antimicrobial for bacterial and fungal strains as major action against *P. aphanidermatum*, *S. rolfis*, *Phytophthora* sp. and *S. Sclerotium*. According to cytotoxic activity against, the highest activities were histiocística lymphoma lines (J744), murine myeloma (B16F10) and low cytotoxicity for bladder carcinoma (ECV304) and leukemia eritroblástica human (K562) the concentration of 1mg/mL^{-1} . Two compounds were isolated: SS-XL-32-01 identified as bis-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), and SS-XL-20-1 identified as phenol 2.2 methylenobis [6 - (1,1-dimethylethyl) - 4-ethyl], both with anticancer activity to Hela cells with a percentage of up to 98% and 71%, of death, respectively. In addition, modified by methylation reaction of the compound SS-XL-32-1 resulted in the break of the aromatic ring and product formation of 4, were seem the loss of activity being indicative of the active site of the molecule responsible for the observed activity.

Keywords: *Aspergillus oryzae*; Anticancer; *Combretum leprosum*; Caatinga; Biomoleculare; Bis-(2-etilhexil)ftalato; Fenol 2.2metilylenobis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-ethyl]

7.1 Introdução

Existe uma chamada geral de novos antibióticos, agentes quimioterapêuticos e agroquímicos que são altamente eficazes, possuem baixa toxicidade, e terá um menor impacto ambiental. Esta procura é impulsionada pelo desenvolvimento de multi-resistência em microorganismos infecciosos (por exemplo, *Staphylococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Cândida* e *Criptococcus*) para os compostos existentes e pela presença ameaçadora de organismos resistentes naturalmente (VALDÉS, 2005; ODDS, 2005). Por outro lado, existe um aumento absurda na incidência em novas doenças pela população humana, tais como, câncer, infecções oportunistas, infecções virais (HIV, HTLV, Influenza, H_1N_1), exigindo a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos para combatê-los (NIH, 2001; NEWMAN et al., 2003; BUTLER, 2004) Novos produtos naturais e os organismos produtores oferecem oportunidades para a inovação na descoberta de medicamentos.

A descoberta de medicamentos é uma atividade complexa e interdisciplinar da química, farmacologia, clínica e biológica, que tem beneficiado a humanidade imensamente nos últimos 100 anos (DREWS, 2000; BUTLER, 2004) Apesar de a descoberta da droga tem sido tradicionalmente um processo difícil e dispendioso, a quantidade de dinheiro sendo investido em P&D e desenvolvimento clínico disparou, entretanto, a saída de medicamentos recém-lançados diminuiu (*Pharmaceutical*

Industry Profile 2003, GERSHELL; ATKINS 2003), isto porque, de cada 10.000 prototipos de droga que são encaminhada aos bancos de framaprojetos apenas 1 entra no mercado industrial farmacêutico. Apesar de a cada ano ocorre o depósito em número record de novos produtos não se sabe como afetará o futuro da industria (DREWS, 1999; PHARMA, 2010; WESS et al., 2001).

A razão para a falta de compostos lideres a partir de bibliotecas sintéticos em algumas áreas terapêuticas, tais como anti-infecciosos, imunossupressão, oncologia e doenças metabólicas pode ser devido a necessidade de um composto com amplo e efetivos mecanismos de ações em diferentes níveis de bioatividade (HENKEL et al., 1999; STAHURA et al., 2000; LEE; SCHNEIBER 2001; FEHER; SCHMIDT 2003). Diante disto, o isolamento de compostos apartir de fontes nao comuns (endófito) são consideradas atraentes alternativas para as bibliotecas de farmacos naturais e quimico-sintéticas, especialmente em áreas terapêuticas. Interessante ressaltar que, grupos e empresas começaram a sintetizar estruturas mais complexas combinadas e/ou modificando suas estruturas, com intuito de geração de novas moléculas mais ativas, direcionada pelas quimicia de produtos naturais descrita como "síntese orientada pela diversidade e bioatividade" (DOS) por Schreiber (LEE; SCHNEIBER 2001; ARYA et al., 2002; KINGSTON; NEWMAN 2002; ABREU; BRANCO, 2003; BURKE et al., 2003).

Nos dias atuais, as ferramentas biotecnológicas tem contribuído para o avanço da metodologia de triagens para descobertas de novas drogas, denominadas como triagem em alto rendimento (HTS, *High Throughput Screening*). Tal método consiste em testar cerca de cem mil amostras (extrato brutos e frações) por semana em bioensaios de rotina, utilizando a robóticos e sistemas de manipulação de dados simplificando e potencializando em escala exponencial, as chances de rastrear potentes produtos em potenciais para aplicação biotecnológica (ENTZEROTH, 2003; VASCHETTO; WEISSBROD, 2007). Contudo, uma das barreiras para a implantação destas estratégias é o alto custo de investimento inicial em equipamentos, insumos, mão de obra qualificada por parte dos grupos de pesquisas.

Segundo estimativas da Convenção da Diversidade Biológica (CDB), o Brasil hospeda entre 15 a 20% de toda a biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas (MITTERMEIER et al., 2004;

MELO, 2002). Dentre destas espécies, os endofíticos (micro-organismos que habitam no interior dos tecidos vegetais sem causar danos aparente) são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas (AZEVEDO, 1998, 2000; MELO, 2002). Diante disto, o acesso a endofíticos associados a plantas medicinais encontradas em biomas com alta taxa de biodiversidade e endemismo como a caatinga, encontrada na região do semiárido brasileiro e a avaliação do potencial dos compostos, têm sido o enfoque do nosso grupo de trabalho. Este trabalho teve como objetivo o isolamento e elucidação química de biomoléculas com interessante atividades anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidante e antimicobacteriana, obtidas do metabolismo secundário da linhagem endofítica *Aspergillus oryzae* CFE108 isolada previamente de *Combretum leprosum*, uma planta medicinal e endêmica da região de caatinga. Vale ressaltar, que este é o primeiro trabalho sobre o estudo de biomoléculas de endofíticos associados a plantas do gênero *Combretum*.

7.2 Material e Métodos

Neste estudo foi utilizado a linhagem fúngica endofítica CFE108, previamente isolada de folhas de *Combretum leprosum* planta endêmica do semiárido brasileiro, identificada através do sequenciamento da região 18S rDNA como *Aspergillus oryzae*, no Laboratório de Microbiologia Ambiental, EMBRAPA Meio Ambiente.

De acordo com os ensaios de avaliação de atividades biológicas dos compostos presentes no extrato bruto (capítulo 03), apresentou alto potencial para bioprospecção de suas biomoléculas com possível aplicação biotecnológica.

7.2.1 Obtenção dos metabolitos secundários: cultivo, filtração e obtenção dos extratos brutos da linhagem CFE108

A linhagem CFE108 foi fermentada em 5L de caldo de cultura Czapek modificado (3g de Nitrato de sódio (NaNO_3), 1g de Fosfato Dipotássico (KH_2PO_4), 0.5g de Sulfato de Magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.5g de Cloreto de Potássio (KCl), 0.01g de Sulfato Ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 8g de extrato de levedura, 15,0g de dextrose, pH 7.3), incubada a 28°C, em cultivo estacionária, por 30 dias, para maior concentração das biomoléculas de interesse. Após o crescimento fúngico, os caldos

de culturas foram submetidos ao sistema de filtração a vácuo (Sartorius), com membrana de celulose de 0.45 μ m (Milipore), e centrifugação a 9000rpm por 30min a 4°C para retirada das células fúngicas. Os filtrados foram submetidos, por três vezes, ao processo de extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas (SDFA), com o solvente diclorometano na proporção de 1:1(v/v) em pH (ácido 3,0) onde houve a formação de duas camadas: uma aquosa, na parte inferior e outra orgânica, na parte superior. Foi adicionado à fase orgânica 5% de sulfato de sódio anidro, filtrada em papel Whatman nº4 e concentrada no evaporador rotativo (Quimis) a temperatura de 45°C, à pressão reduzida (KILIKIAN; PESSOA Jr., 2001). O extrato bruto obtido foi pesado em balança analítica e armazenado a -20°C. O extrato bruto seco do controle negativo foi obtido através da extração do caldo de cultura sem inóculo.

7.2.2 Biomonitoramento do extrato em potencial para produção de biomoléculas antitumorais

O extrato bruto (580mg) foi submetido à partição em coluna cromatográfica, utilizando como fase estacionária sílica gel (60-200 nm, Merck) contida em coluna de vidro e a fase móvel em gradiente crescente de polaridade, partindo de hexano (100%), clorofórmio (100%), hexano/clorofórmio (1/9), hexano/clorofórmio/metanol (v/v/v, 1000 mL), clorofórmio/metanol (v/v, 1000 mL) e até metanol 100% (500 mL). As frações obtidas foram coletadas, concentradas em rotaevaporador e os seus constituintes foram avaliada usando por cromatografia de camada delgada (CCD), visualizada com UV (254, 305 e 363 nm). Baseado no perfil de CCD, as frações que continham mesmas distribuições de compostos foram reunidas. Um total de 10 combinações majoritárias foram obtidas a partir do extrato bruto de CFE108, figura 7.1.

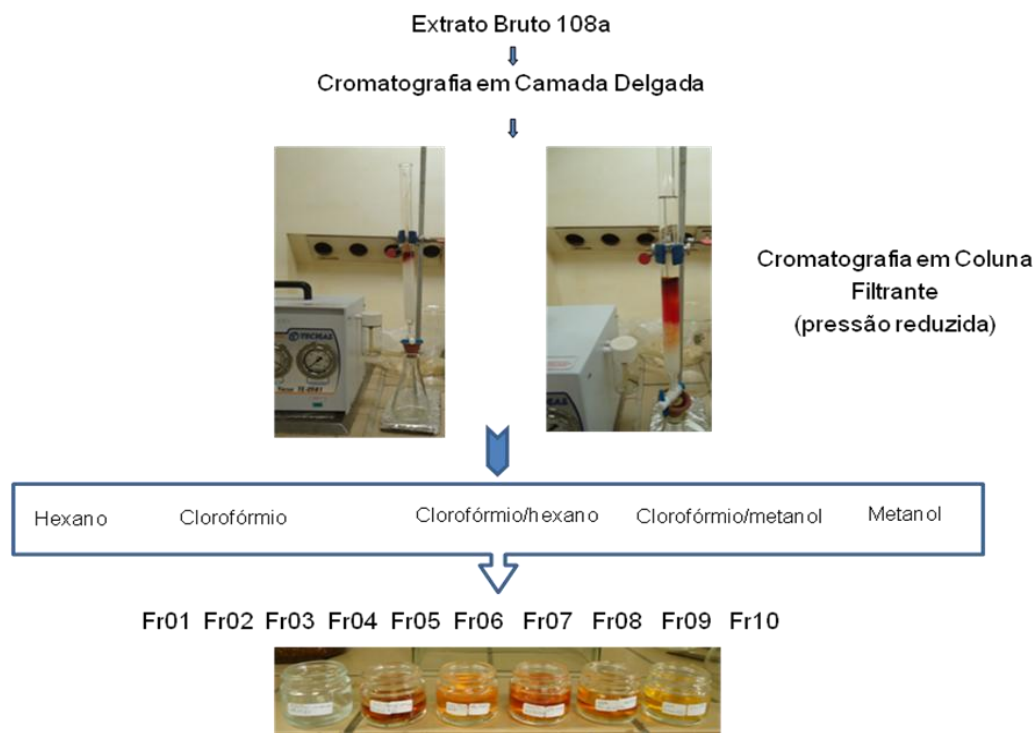


Figura 7.1 - Esquema da partição do extrato bruto em coluna cromatográfica, utilizando sequencias de solvente em gradiente crescente de polaridade

As frações obtidas foram solubilizadas em DMSO (Sigma, St. Louis, USA) e diluídas para as concentrações de trabalho ($1-1.10^{-4}$ mg/mL⁻¹) nos bioensaio.

Foram realizadas a avaliação do potencial antioxidante (de acordo com o item 6.2.2.2), antimicrobiano utilizando a técnica de difusão em disco contra as mesmas linhagens bacterianas patogênicas humanas e fúngicas fitopatogênicas, de acordo com o item 5.2.4.3, para monitoramento da atividade biológica e verificar quais das frações possui as biomoléculas ativas. As frações que apresentaram atividades biológicas foram encaminhadas ao ensaio de citotoxicidade (de acordo com item 6.2.2.3) frente às células tumorais ECV304, B16F10, CEM, K562 e J774 e células T.END1 como controle de célula normal. Além disso, foram utilizadas mais duas frações com polaridades diferentes para certificação separação dos compostos contido no extrato bruto inicial. Os quimioterápicos comerciais Pirarubicina (Sigma, St. Louis, USA) e combretastatin A4 (Sigma, St. Louis, USA) foram utilizados como drogas padrões. Este bioensaio de citotoxicidade foi realizado no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Farmanguinhos, Fiocruz, RJ.

7.2.2.1 Avaliação do efeito de transformação morfológica em células T.End1

Para verificar os efeitos dos compostos presentes nas frações na alteração morfológica em células endoteliais, foram utilizadas linhagens de células T.End.1, derivadas de células endoteliais derivadas do Timo de murino.

Em microplacas de 24 poços foram inoculadas 500 μ L da suspensão celular em meio de RPMI nas concentrações de $2.5 \cdot 10^4$ cél/mL para adesão células sem confluência, incubadas a 37°C, 5% CO₂. Depois de 24h que as células foram incubadas, retirou-se todo meio de cultura em suspensão, lavou-se com 1mL de PBS (1x pH 7,4), acrescentou 300 μ L as frações (Fr03, Fr05 e Fr08) solubilizadas em RPMI e DMSO (1%) na concentração de 1mg/mL⁻¹, incubando novamente por 2h a 37°C e 5% CO₂. A leitura foi realizada e fotografias digitais foram tiradas em microscópio óptico com contraste de fase (Nikon, Japão) com 100x de aumento. Foram utilizados como controle negativo meio de cultura e a suspensão celular, para controles positivos foram utilizados os fármacos padrões combretastatin CA4 (Sigma, St. Louis, USA) e pirarrubicina (Sigma, St. Louis, USA) nas concentrações de 1mg/mL⁻¹ que alteram a morfologia celular como já registrado em literatura (NANCY, 2008).

7.2.3 Isolamento, Purificação e Elucidação química dos compostos presente no extrato bruto responsável pelas atividades biológicas

A fim de obter maior massa de compostos para isolamento, purificação e elucidação química das biomoléculas com potencial biotecnológico, a linhagem CFE108 foi submetida novamente a cultivo em larga escala, em 10L de caldo de cultura Czapek modificado, sob as mesmas condições de cultivo descrita no item 7.2.1. A prioridade para início do processo de isolamento e purificação do extrato bruto (1g) foi definir a fidelidade das condições de partição em coluna cromatográfica (item 7.2.3), e as subfrações foram purificados de acordo com bioatividade frente ao ensaio citotóxico utilizando as linhagens cancerígenas K562 e HeLa (item 6.2.2.3). As subfrações de interesse foram submetidas a cromatografia de camada delgada em placa preparativa, separando os spots presente e enfim isolando os compostos. Todos os experimentos de isolamento, purificação e elucidação estrutural das biomoléculas de interesse foram realizados em colaboração com a Dra. Agnes

Rimando no Laboratório de Química de Produtos Naturais, USDA, Oxford, MS, Estados Unidos da América.

7.2.3.1 Instrumentos

Os compostos foram preparados nas concentrações entre 1000, 500, 100, 50, 20, 1 ($\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) para injeção nos aparelhos.

7.2.3.1.1 UV; Infravermelho

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em um aparelho FT-IR Bruker TENSOR™, em pastilha de sílica utilizando o software OPUS™. Para as medidas de rotação específica foi utilizada o polarímetro 241 Perkin-Elmer UV-3101, utilizando 0.5 mL dos compostos diluídos em metanol na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

7.2.3.1.2 Ressonância Magnética Nuclear

As amostras analisadas por ressonância magnética nuclear (RMN) foram preparadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Aldrich) na concentração de 8 mg/mL^{-1} (SS-XL-32-1) e 5 mg/mL^{-1} (SS-XL-20-01), contendo TMS (tetrametilsilano) como referência interna. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de 1D (^1H , ^{13}C , DEPT 45) e 2D (HMBC, HMQC, COSY) foram registrados em espectrômetro Bruker Avance 400 MHz.

7.2.3.1.3 LC-MS: Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Forma utilizados alíquotas dos compostos nas concentrações de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e os espectros de massas em alta resolução foram obtidos usando Agilent 1100HPLC para JEOL AccuTOF (JMS-T100LC), (Peabody, MA).

7.2.3.1.4 CG-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

As análises por cromatografia gasosa fora realizadas em cromatógrafo Varian CP-3800 GC acoplado a um Varian Saturn 2000 MS/MS, injetando alíquotas das amostras a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. O GC esta equipado com coluna DB-5 (30m x 0,25mm, contendo com espessura de 0,25 μm), as condições empregadas nos experimentos foram: bloco injetor 240°C, temperaturas da coluna 60–240°C a 3°C/min e mantida a

240°C por 5 min, gás de arraste: He, com volume de injeção 1µl com energia de ionização a 70 eV.

7.2.4 Modificação Molecular por reação de metilação do composto isolado

Após o isolamento dos compostos, com o objetivo de conhecer quais sítios das moléculas eram responsáveis pela bioatividade foi realizada a reação de metilação de acordo com a tabela 7.1, como tentativa de modificação de geração de moléculas novas mais potentes com que a anterior. Para a reação de metilação adicionou-se ao composto SS-XL-32-1 carbonato de potássio, iodeto de metila e acetona em placa quente a 50°C, homogeneizando com “stir” por 24 horas. A reação foi monitorada em placas de CCD no sistema de eluente Hex (23,5%) DCM (75%) MeOH (0,5%) ácido acético (1 %) tendo como padrão o composto puro. Após a reação acrescentou-se água, ressuspendendo e realizada partição em acetato de etila (3x). As frações obtidas em acetato de etila foram transferidas para vial, secas em Nitrogênio, submetidas a CCD 10x10 para separação, e extrações dos compostos produtores em acetato de etila/metanol (9/1). Os compostos resultantes da reação de metilação foram submetidos à atividade citotóxica em células cancerígenas HeLa e k562 (item 6.2.2.3) e a análise de ¹H-RMN.

Tabela 7.1 - Reação de metilação para modificação molecular do composto em estudo

Procedimento	Solução estoque	Quantidade de uso
Composto SS-XL-32-1	-	1.5 mg/mL ⁻¹
Carbonato de Potássio (K₂CO₃)	145.9 mg em 2 mL de H ₂ O	2.2 mg/mL ⁻¹
Iodeto de metila (CH₃I)	260 µL	3.9 µL
Acetona (PA)	10 mL	150 µL
Água ultrapura	2 mL	30 µL
Acetato de etila (PA)	5 mL	75 µL

7.3 Resultados e Discussão

7.3.1 Fracionamento guiado pela bioatividade dos compostos

O fracionamento do extrato bruto 108a (560mg) resultou na obtenção de 10 frações majoritárias, como apresentadas na tabela 7.2.

Tabela 7.2 - As frações obtidas da partição do extrato bruto fúngico 108a, com a sequência do sistema de solventes em gradiente crescente de polaridade e as massas moleculares de cada fração obtida

Fração	Sistema de solventes	Massa (mg/mL ⁻¹)
1	Hexano	21.7
2	Clorofórmio	37.7
3	Clorofórmio/Hexano (1:9)	102.4
4	Clorofórmio/Hexano (1:9)	60
5	Clorofórmio/Metanol (9:1)	77
6	Clorofórmio/Metanol (8:2)	57,9
7	Clorofórmio/Metanol (7,5:2,5)	17
8	Clorofórmio/Metanol (6:4)	148
9	Clorofórmio/Metanol (5:5)	12
10	Metanol	25

7.3.1.1 Atividade antimicrobiana

Os resultados obtidos a partir do teste de atividade antimicrobiana, como apresentado na tabela 7.3, mostram que os princípios ativos estão presentes em diferentes concentrações nas frações FR04, Fr05 e Fr06. Estas frações foram adquiridas pelas eluição de solventes de mediana polaridade e com semelhantes proporções de volume, o que indica que pode se tratar dos mesmos compostos químicos. A fração Fr05 foi a que apresentou as maiores atividades antimicrobianas, então submetidas aos testes subsequentes.

Tabela 7.3 - Atividade Antimicrobiana das frações obtidas do extrato bruto da linhagem endofítica *Aspergillus oryzae* CFE108

Frações	linhagens fúngicas					Linhagens bacterianas						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Fr01	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fr02	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fr03	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fr04	(++)	(+)	(++)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Fr05	(++)	(+)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
Fr06	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fr07	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fr08	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fr09	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fr10	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

¹*P. aphanidermatum* ²*R. solani* ³*S. rolfis* ⁴*Phytophthora* ⁵*S. sclerotium* ⁶*S. thyfe* ⁷*B. cepaceae* ⁸*P.aeruginosa* ⁹*E. coli* ¹⁰*S. schelfer* ¹¹*K. pneumoniae* ¹²*B. pumillus*.

7.3.1.2 Atividade antioxidante

Dados da atividade antioxidante estão demonstrados na tabela 7.4, o potencial redutor da fração Fr05 foi observado como no extrato bruto 108a, de onde a mesma foi particionada. O valor de EC_{50} 6,67 foi maior ao do extrato original devido a concentração e quantidade de massa molecular envolvida.

Tabela 7.4 - Atividade antioxidante das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto da linhagem endofítica *Aspergillus oryzae* CFE108

Frações	% de Redução do DPP				
	mg/L ⁻¹				
	0.312	0.625	1.25	2.5	5
Fr01	5.00	6.00	6.00	7.00	7.71
Fr02	0.04	0.06	0.07	9.08	12.40
Fr03	9.00	11.70	16.10	22.50	35.00
Fr04	5.00	8.00	13.00	24.00	41.00
Fr05	5.80	10.70	16.60	25.00	40.00
Fr06	1.40	1.50	1.80	3.40	4.50
Fr07	0.20	0.30	1.50	3.00	5.60
Fr08	0.20	0.30	0.60	2.60	3.60
Fr09	-13.00	-1.60	-3.70	-1.50	2.80
Fr10	-2.40	1.20	-5.10	-3.67	-4.10

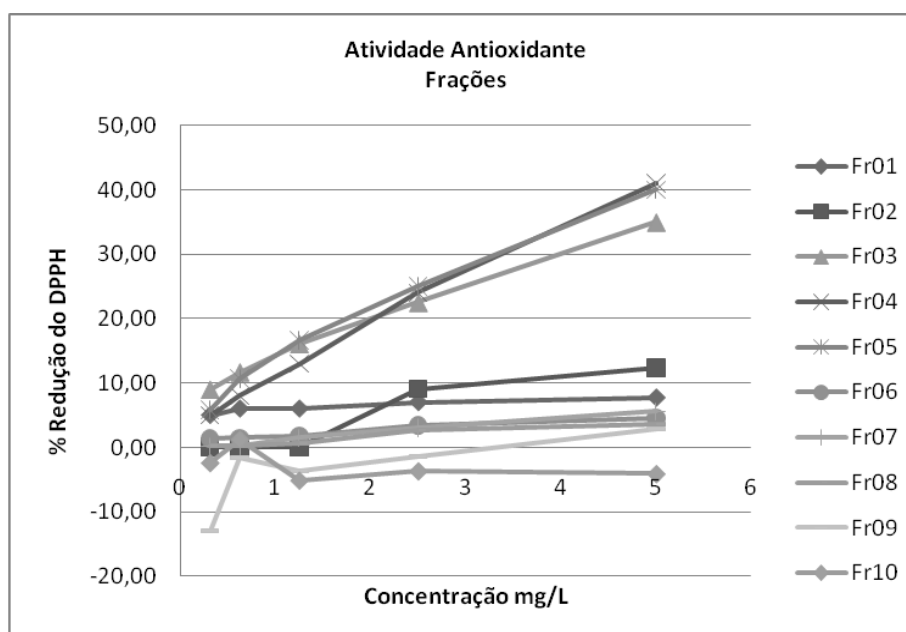


Figura 7.2 - Gráfico com atividade antioxidante das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato

bruto do endofítico *A. oryzae* CFE108

7.3.1.3 Atividade citotóxica em linhagens celulares cancerígenas

Os testes de citotóxicidade das frações em linhagens tumorais estão apresentados na figura 7.2. Foram utilizadas três frações obtidas da partição do 108a: fração 03 (presença de compostos mais apolares do extrato 108a), Fr05 (presença de compostos com polaridade mediana do extrato 108a) e Fr08 (presença de compostos mais polares do extrato), para assegurar que o processo de separação dos compostos foi eficaz e que os princípios ativos responsáveis pela atividade antimicrobiana podem ser os mesmos responsáveis pela atividade antitumoral.

A análise dos resultados demonstra que os compostos ativos, para os ensaios realizados estão agrupado na fração 05, assim como os outros ensaios já realizados. As maiores atividades foram observadas na primeira concentração testada de 1mg/mL^{-1} , contra as linhagens linfoma histiocística (J744), mieloma murino (B16F10) e baixa citotóxicidade para carcinoma de bexiga (ECV304) e leucemia eritroblástica humana (k562).

A linhagem de célula endotelial normal (T.end.1) foi utilizada para observar ação dos princípios ativos em estudos em células normais. A fração Fr05 assim como os fármacos padrões apresentaram atividades citotóxicas nestas células, sendo que a pirarrubicina apresentou a maior citotóxicidade, seguindo de Fr05 e combretastatin A4.

Este evento mostra que os quimioterápicos padrões utilizados neste trabalho apresentam alta taxa de citotóxicidade para linhagens celulares gerais e pouca especificidade para as cancerígenas. A ação das biomoléculas presentes na fração Fr05, aparentemente possuem amplo mecanismo de ação, tanto para células de tumores sólidos como para os não sólidos. Além disso, a baixa atividade da combretastatin (CA4) pode esta relacionada ao seu mecanismo de ação que é apenas para tumores não sólidos, como escrito por Nancy et al. (2008) e Pettit et al. (1988).

Diante deste estudo, os princípios ativos presentes na fração Fr05 obtido da linhagem 108 pode não ser um derivado do estilbeno, como a CA4 devido à diferença dos seus mecanismos de ação quando comparados, além da ausência de detecção do composto químico nos extratos.

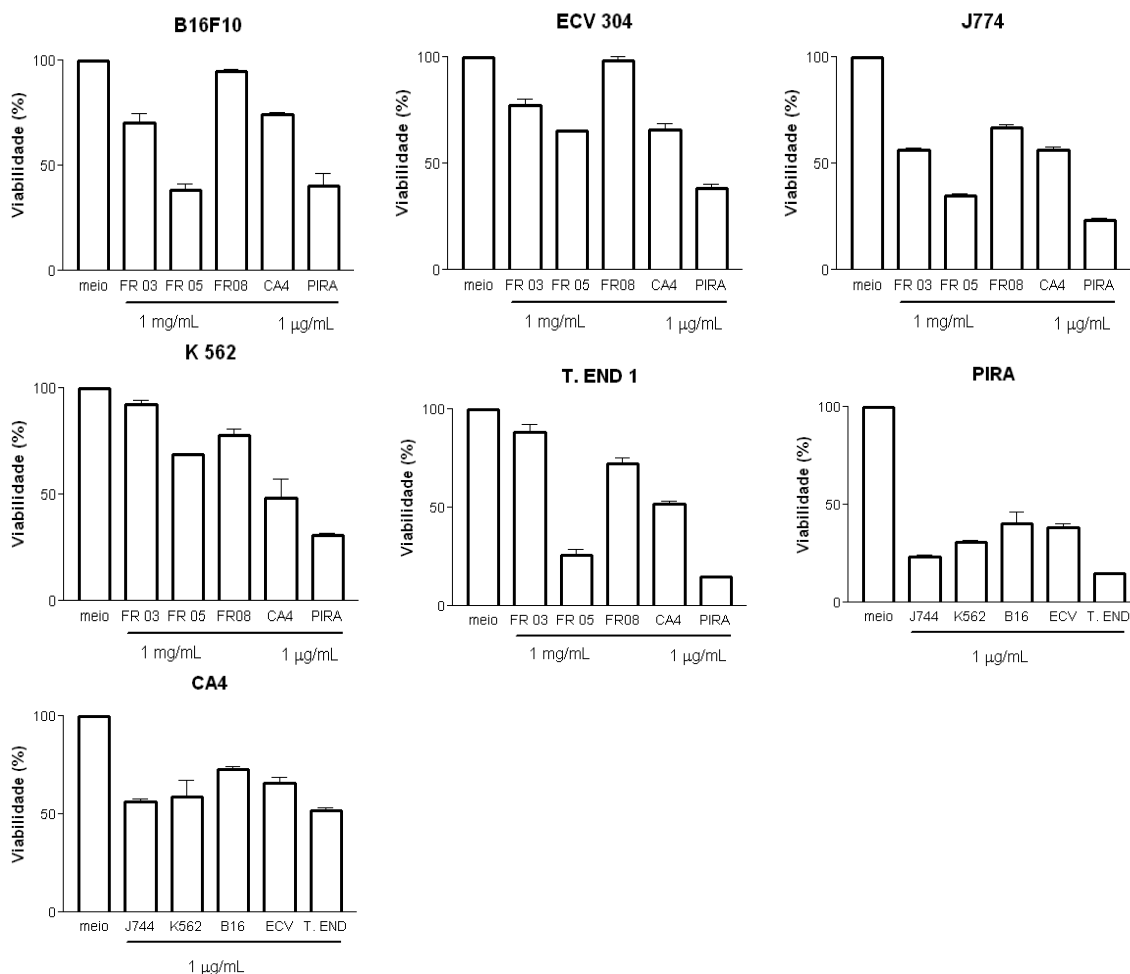


Figura 7.3 - Gráficos dos resultados de citotóxicidade das frações obtidas a partir do fracionamento do extrato bruto da linhagem endofítica *Aspergillus oryzae* CFE108 e dos fármacos padrões, na concentração de 1mg/mL^{-1} para os extratos e para de $1\mu\text{g/mL}^{-1}$ para as drogas padrão

7.3.1.4 Avaliação da transformação morfológica

Trabalhos realizados com compostos potenciais a novos quimioterápicos anticancerígenos avaliam o potencial para atividade antivasculares, ou seja, capacidade dos mesmos na mudança morfológica de grupos celulares específicos (tecidos endoteliais) importantes na formação de vasos irrigadores (NANCY et al., 2008; SRIVASTAVA et al., 2010). Diante disso, foram avaliados a ação da fração e dos quimioterápicos padrões em células Tend.1 para transformação da morfologia células frente aos compostos testes.

Na figura 7.3 estão apresentados os resultados das alterações morfológicas obtidas. Nas fotomicroscopias dos padrões negativo (células e meio de cultura) observam-se as células em formato estrelados e aderidos ao fundo da placas. Quando

as mesmas tratadas com CA4 apresentam total alteração morfológica induzindo a perda total da adesão, impedindo possivelmente a formação de futuros vasos em tumores. A pirarrubicina e a fração Fr05 causaram o arredondamento das células e diminuição do formato estrelado impedindo também possivelmente a não formação de vasos tumorais, em proporções diferentes da CA4.

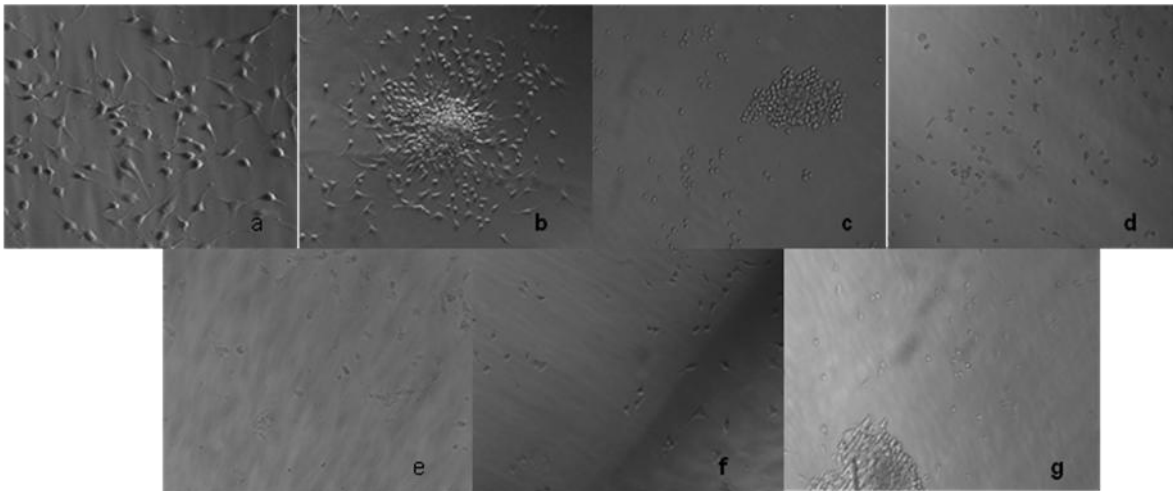


Figura 7.4 - Fotomicroscopia (100 x aumento) do ensaio de transformação morfológica causada pela exposição de células T. End.1 à fração teste, Fr05, a e b controle negativos (meio de cultura com células T.end.1); c) ação da combretastatin CA4; d) ação da pirarrubicina; e, f e g) ação da fração FR05.

7.3.2 Isolamento, purificação e elucidação estrutural dos metabólitos fúngicos

Foram isolados dois compostos SS-XL-32-01 e SS-XL-20-1 do extrato diclorometano obtidos a partir de metabólitos da linhagem *Aspergillus oryzae* CFE108. Por apresentarem a mesma coloração e quase os mesmo *R_f*, a principio parecia que eram os mesmos compostos, mas com diferentes sinais nos espectro se diferentes resultados nos bioensaios, concluímos que no esmo extrato bruto diclorometano da linhagem CFE108 foram isolados dois diferentes compostos e com diferentes níveis de ação citotóxica, como visualizados neste estudo.

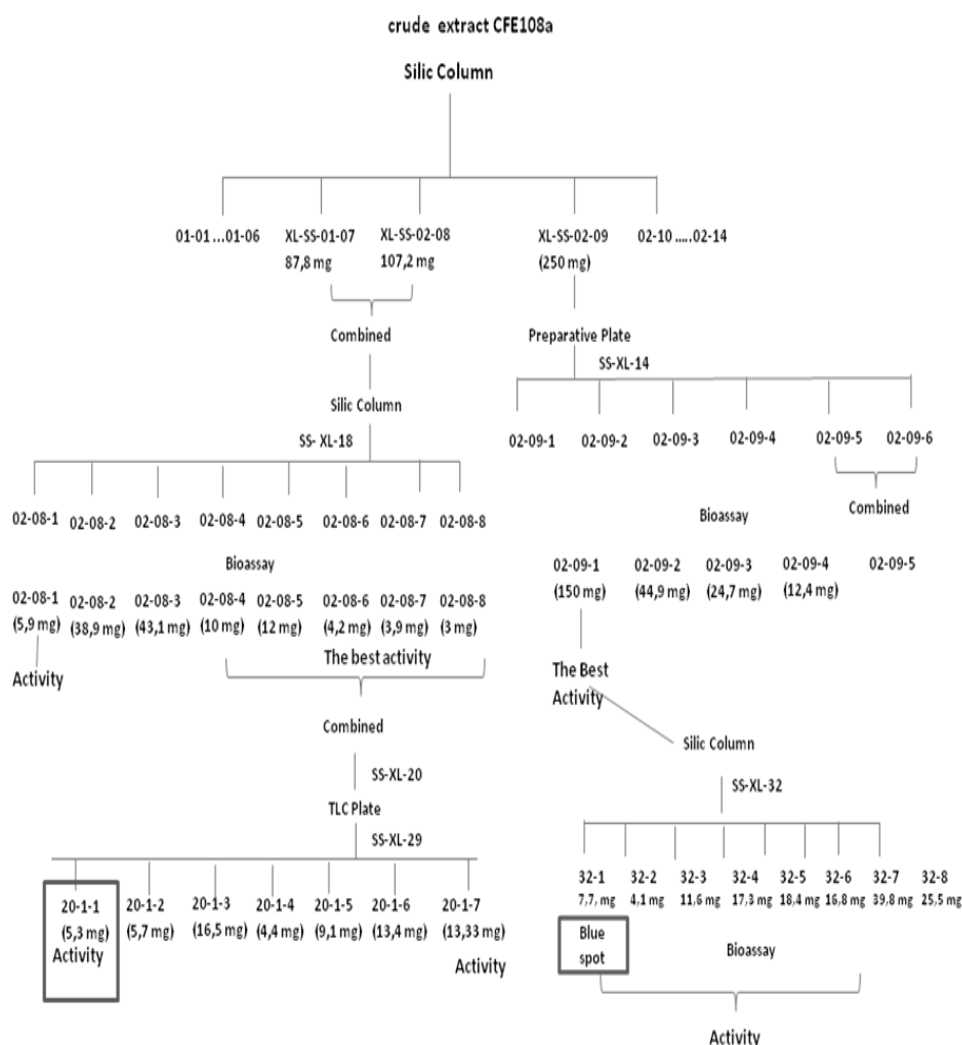


Figura 7.5 - Fluxograma metodológico que expõem os procedimentos utilizados para o isolamento dos compostos SS-XL-32.1 e SS-XL-20-1 a partir do extrato bruto da linhagem endofítica *Aspergillus oryzae* CFE108 de *Combretum leprosum*

7.3.3 Identificação e elucidação química do composto SS-XL-32-1

O composto SS-XL-32-1 apresenta valor de R_f (fator de retenção) de 0,65 (em placa de CCD Merck Kieselgel 60 F₂₅₄.) solução eluente: Hexano (23,5%): diclorometano (75%): metanol (0,5%) ácido acético (1%), não apresenta odor aparente e submetida a radiação ultravioleta UV (305 e 365 nm) apresentam coloração azul fluorescente.

O espectrômetro de massas exibiu um espectro com a presença de íons de massa m/z 413 [M+Na] e m/z 803 [2.M+ Na], observando a adição e sódio, encontrando a massa molecular do composto SS-XL-32-1 de $m/z = 390.26678$, apresentando fórmula molecular de C₂₄H₃₈O₄. De maneira geral, dentre os processos químicos que os íons gasosos de uma amostra podem ser gerados em espectrometria de massa, a cationização processo pelo qual resulta em moléculas cationizadas, ou seja, inclusão de íons, neste caso de Na⁺ no composto em questão, foi observada neste estudo, apresentado no espectro de massas íons com m/z de 413 [M+Na⁺], massa molecular real de 390 (VESSECCCHIO; GALEMBECK, 2008). Além disso, existe indicativo que o composto SS-XL-32-1, possivelmente apresenta tendência de formação de dímeros, isto porque a presença de íon molecular com m/z de 803 [2.M+ Na], resultante da ligação de duas moléculas de m/z 390 e mais um íon de sódio (Na). Todos os espectros aqui relatados estão presentes nos anexos.

A espectrometria de absorção nas regiões do infravermelho (IV) revelou bandas nas regiões: 2918.45, 2848.21, 1727.91, 1054.79, 1033.0, 1012.24, sendo que as bandas carbonilas observadas a 1727,91 cm⁻¹, e fortes bandas C-O na região entre 1012,24 - 1054,79. De acordo com os espectros de UV o composto pode ser visualizado no comprimento máximo de 200 nm. A presença de ftalato foi inferida pela detecção de fragmento no CG-MS de $m/z = 149$ e de $m/z = 167$.

Em relação aos espectros de prótons obtidos pela ressonância magnética nuclear ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃), O espectro de ¹H-RMN exibiu sinais típicos de estrutura de éster ftalato: 4 prótons aromáticos a δ 7.64 (2H dd, J = 8 Hz), δ 7.46 (2H dd, J = 8 Hz), 12 prótons de 4 grupos metil a δ 0.93 (m), 12 prótons de 6 metileno a δ 1.34 (m), 4 prótons de 2 metileno a δ 1.45 (m), 4 prótons de 2 metino a δ 4.21 (m). De acordo com a espectrometria de RMN em ¹³C foram observados os seguintes sinais: δ 167.76 (C-1', C-2''), 132.6 (C-1, C-6), 130.87 (C-3, C-4), 128.78 (C-2, C-5), 68.15 (C-2', C-2''), 38.72 (C-3', C-3''), 30.35 (C-8', C-8''), 28.91 (C5', C5''), 23.73 (C-4', C-4''), 22.96

(C-6', C-6''), 14.03 (C-7', C-7''), 10.94 (C-9', C-9''). Este espectro apresenta apenas 12 carbonos, metade do número indicado no espectrômetro de massas, isto consiste que o composto possui duas partes idênticas, ocorrendo simetria, como imagem espelhada uma da outra. Além disso, o espectro obtido no DEPT 45 do ^{13}C revela o desaparecimento dos sinais 167.76 correspondente ao C-1', C-2'' e 132.6, correspondente o ao C-1, C-6, indicando que os mesmos são carbonos quaternários, não protonados, ou seja, não apresentam ligação a prótons; outro ponto importante é que em espectro de DEPT 135 os sinais detectados no campo inferior correspondem ao CH_2 e os sinais presente no campo superior do espectro são correspondentes a CH_3 e CH , tais dados colaboração a construção da molécula. A presença de apenas dois grupos aromáticos na molécula sugere que o composto deverá ter uma distribuição orto- no anel benzênico, tendo os mesmos substituintes em ambas as posições, tabela 7.5.

Tabela 7.5 - ^1H -RMN (CDCl_3) e ^{13}C -NMR dados BRUKER AV400

Posição	RMN Próton	RMN Carbono
C 1, C6	-	132
C2, C5	7,74	128
C3, C4	7,9	131
C1', C1''	-	168
C3', C3''	4,21	66,5
C4', C4''	1,66	38,9
C5', C5''	1,40	23,9
C6', C6''	1,22 – 1,23	30
C7', C7''	1,29	23,2
C8', C8''	0,89	14,3
C9', C9''	1,40	30,6
C10', C10''	0,91	11,2

Estudos de correlação bidimensionais de RMN entre os núcleos de próton-próton (COSY), próton-carbono (HMBC, HMQS, HSQS), completa e confirmam a elucidação estrutural da molécula. O próton aromático d 7.64 (H-2/H-5) apresenta acoplamento direto para o carbono 128.78 nos experimento de HMQC, enquanto, os espectros de HMBC apresenta as correlacionam os carbonos de d 132.6 (^2J), 130.87 (^2J) e o grupo carbonilo 167.76 (^3J). Similarmente, H-3/H-4 (d 7.64) revela direta, ^2J e ^3J correlação para os carbonos 130.87, 128.78 e 132.6, respectivamente. A cerca das correlações dos carbonos quaternários d 132.6 foi designado como C-1/C-6 e carbonos metino 128.78 e 130.87 para C-2/C-5 e C-3/C-4, respectivamente. Os dois prótons multipletos de 4.19 apresenta acoplamento direta ao carbono oxigenado d

68.15 (C-2'/C2'') e correlação 3J com o grupo carbonilo. Assim esses prótons foram designados como H-2'/H-2''. O próton multiplete 1.66 designado como H-3'/H-3'' no espectro de COSY, além de apresentando acoplamento direto com C-3'/C-3'' na correlação de HMQC. Os radicais metil detectados em 0.69 e 0.87 exibiu acoplamento direto aos carbonos 10.94 e 14.03, respectivamente, como podem ser observados na tabela 7.5. Assim com bases nas análises espectrométricas realizados neste estudo apresentados nos anexos, comparação dos bancos de dados (sciencefinder, spiderchemistry) o composto SS-XL-32-1 foi identificado como bis-(2-etilhexil) ftalato (DEHP), figura 7.5 corroborando com os achados na elucidação química nos trabalhos de Amade et al. (1993), Al-Bari et al. (2006), Ramalakshmi e Muthuchelian (2011) e Du et al. (2006).

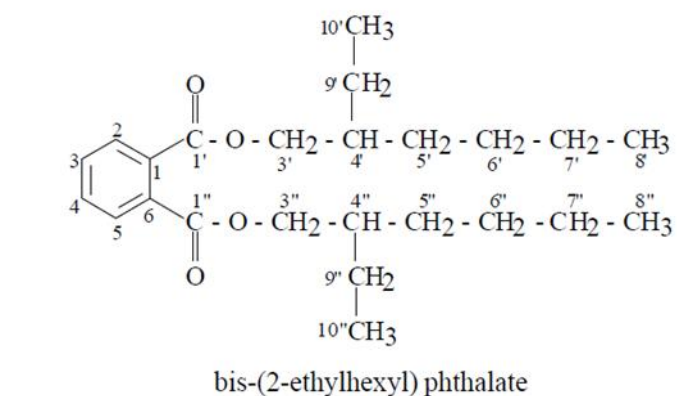


Figura 7.6 - Estrutura do composto isolado da linhagem fúngica *Aspergillus oryzae* CFE108, bis- (2-ethylhexyl) ftalato

7.3.3.1 Avaliação citotóxica do composto SS-XL-32-1 em linhagens cancerígenas HeLa e K562

O composto SS-XL-32-1 foi submetido a avaliação da atividade antiproliferativa em células cancerígenas para confirma que era ele o responsável pela ação antiproliferativa em células cancerígenas assim como observados no extrato bruto. Como exposto na figura 7.6, a atividade anticâncer pode ser observada em linhagens de células cancerígenas HeLa, ocasionando cerca de 98% e 79% de morte das células cancerígenas nas concentrações de $250\mu\text{g/mL}^{-1}$ e $25\mu\text{g/mL}^{-1}$, respectivamente. Para a linhagem cancerígena k562, apresentou inibição apenas na maior concentração utilizada $250\mu\text{g/mL}^{-1}$, com porcentagem de 80%,

para as concentrações 25 a $2.5\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ a taxa de morte das linhagem foi inferior a 14%.

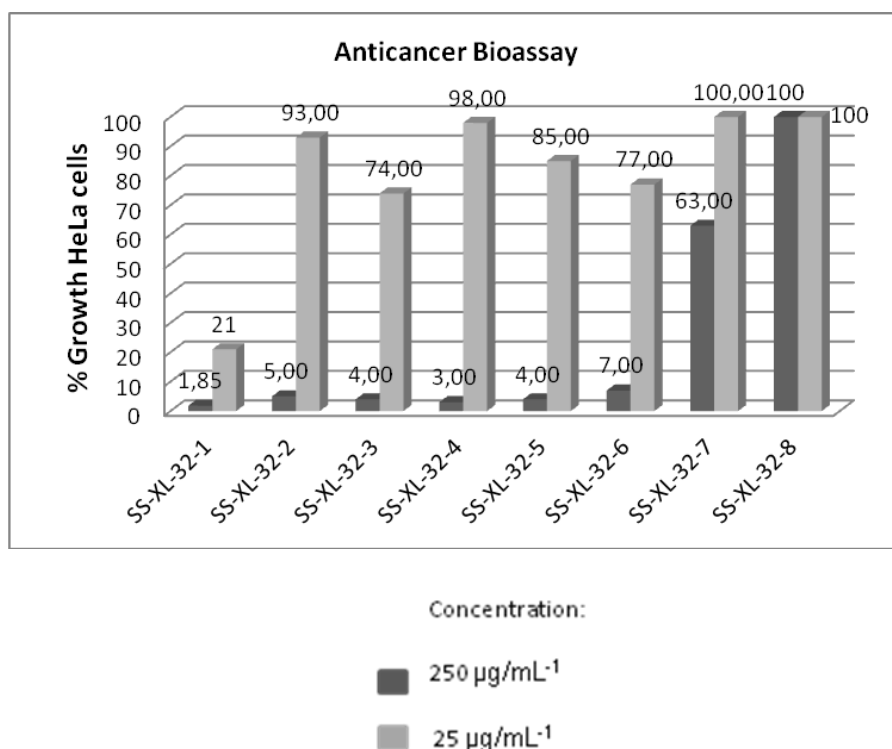


Figura 7.7 - Gráficos dos resultados de citotóxicidade do composto SS-XL-32-1 obtida da linhagem *Aspergillus oryzae* CFE108 na concentração de $250\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e $25\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$

Vários estudos tem demonstrado o isolamento do Bis (2-ethyl hexyl) phthalate, em diferentes organismos tais como, o primeiro registro foi em raízes de *Euphorbia hylonoma* Mazz (RUAN et al., 2006), com atividades biológicas contra bactérias patogênicas, isolado de *Streptomyces bangladeshiensis* com atividade antimicrobiana para Gram positiva e alguns fungos patogênicos (Al-BARI et al., 2006), em *Alchornea cordifolia* reportaram baixa atividade anti-inflamatória (MAVAR et al., 2008), isolados de *Nigela glandulifera* Freyn identificado como inibidor de melanomas (NGUYEN et al., 2007), extratos de *Gongronema latifolium* que continham ácido ftalato apresentaram atividade contra bactérias isoladas de pacientes infectados com vírus HIV (ADELEYE; OMADINE; DANIELS, 2011). Óleos essenciais de folhas que apresentaram entre os componentes majoritários éster ácido ftalato (95.6%), boa atividade antimicrobiana (SRINIVASAN et al., 2009). Amade et al. (1993), isolaram uma linhagem de *Penicillium olsonii* associados a organismo marinhos e também isolaram de seu extrato DEHP e avaliaram seu

potencial no fator de agregação de células e no uso de estudos de fosforilação oxidativa mitocondrial.

7.3.3.2 Modificação estrutural do composto SS-XL-32-1

O composto SS-XL-32-1 foi submetido a reação de metilação e como produto desta reação foram originados 4 subprodutos diferentes, como exposto na figura 7.7a, denominados aqui como bluespot01 de $R_f = 0.75$, bluespot2 de $R_f = 0.58$, bluespot3 de $R_f = 0.42$ e bluespot4 de $R_f = 0.3$. Todos os subprodutos foram submetidos ao ensaio para avaliar se a atividade anticâncer observada pelo composto SS-XL-32-1 foi mantida, aumentada ou anulada. Diante dos resultados expostos na figura 7.8, nenhum dos subprodutos mantiveram a bioatividade anticâncer e de acordo com os espectros de prótons ^1H RMN, ocorreu a quebra do anel aromático e dos ésteres resultando em formação possivelmente de radicais alifático com ligação possivelmente de radical hidroxilas. Devido a mínima quantidade de massa, não foi possível realizar espectros de ^{13}C RMN para possível elucidação dos subprodutos. Em outra mão, pode-se afirmar que o possível sítio ativo responsável pela bioatividade do composto SS-XL-32-1 seria o anel benzeno.

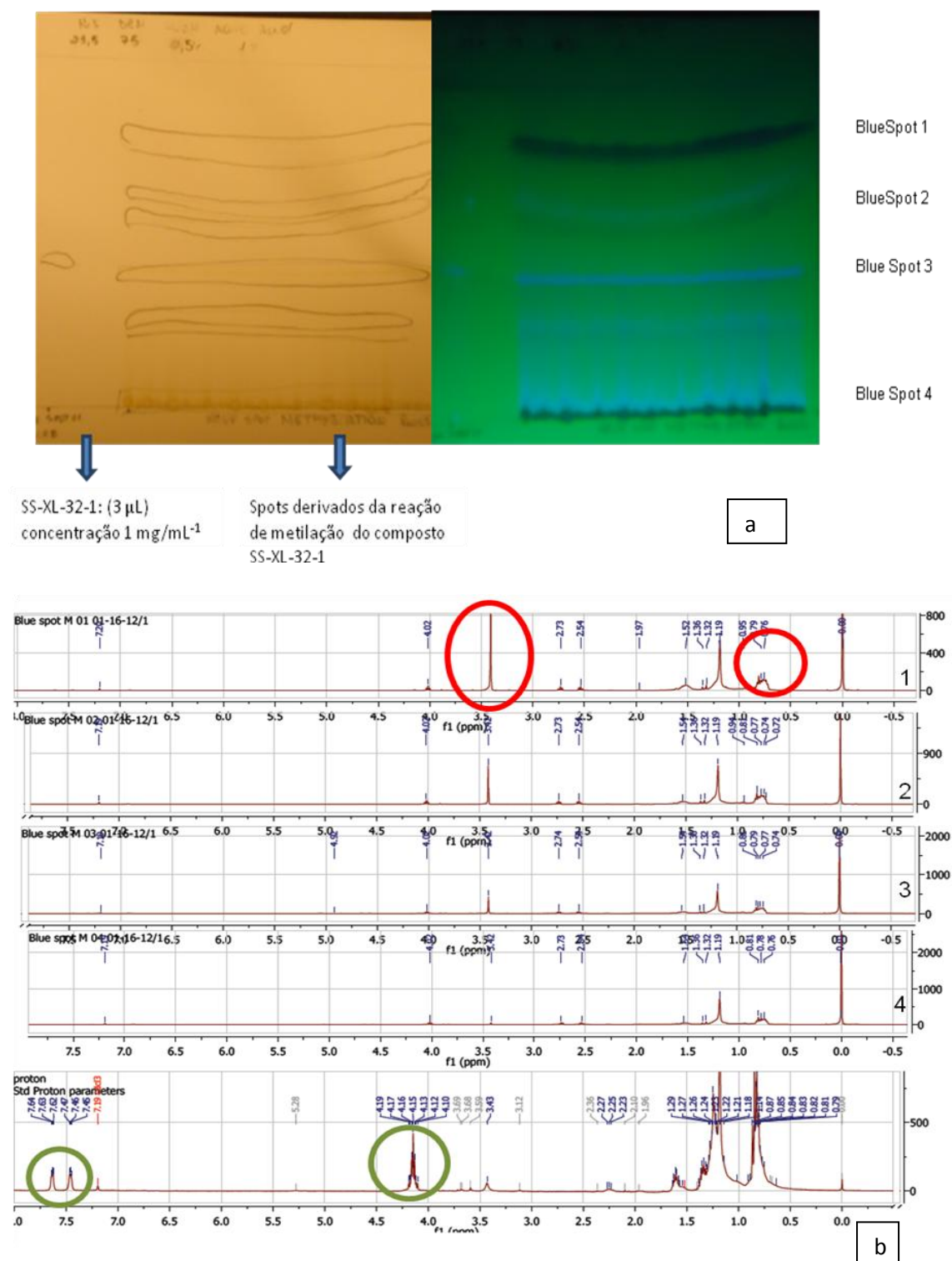


Figura 7.8 - a) Cromatograma das placas de CCD eluídas pelo sistema de solvente: Hex (23,5%) DCM (75 %) MeOH (0,5%) ácido acético (1%) visualizados através de luz UV (254; 366nm), os “spots” visualizados são as subfrações produto da reação de metilação do composto SS-XL-32-1. b) Espectro de RMN-¹H dos quatro subprodutos resultantes da reação de metilação utilizando como padrão o espectro de próton do composto original SS-XL-32-1

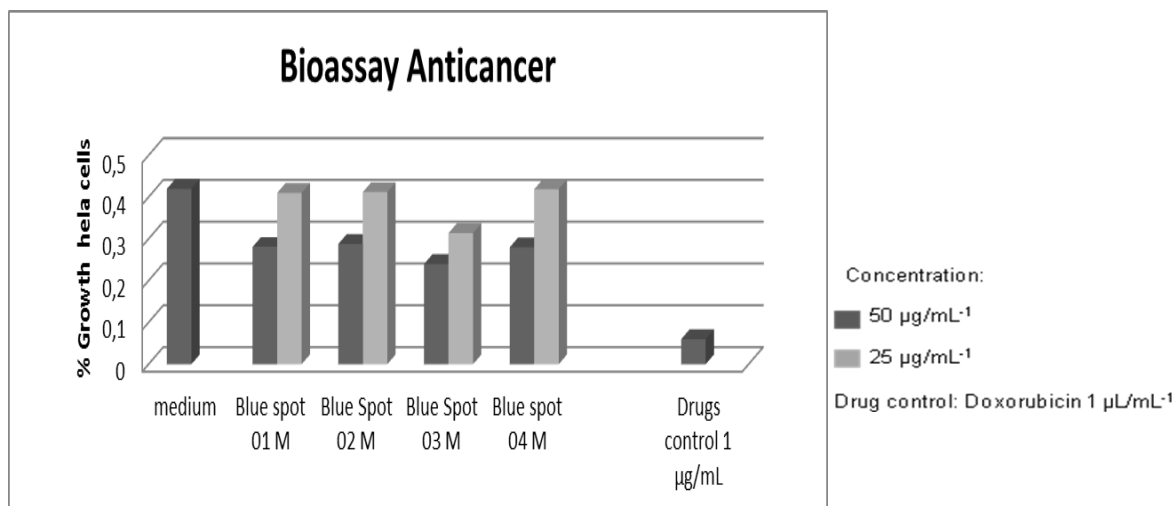


Figura 7.9 - Bioensaio de citotóxicidade dos quatros subprodutos resultantes da reação de metilação utilizando como padrão a droga comercial doxorubicina na concentração de $1\mu\text{g/mL}^{-1}$

7.3.4 Isolamento do composto SS-XL-20-1

O composto SS-XL-20-1 apresenta valor de R_f de 0,63 (em placa de CCD Merck Kieselgel 60 F_{254} .) solução eluente: Hexano (23,5%): diclorometano (75%): metanol (0,5%) ácido acético (1%), não apresenta odor aparente e submetida a radiação ultravioleta UV (305 e 365 nm) apresentam coloração azul fluorescente. Inicialmente, diante dos dados obtidos nós indicamos que seria o mesmo composto SS-XL-32-1, mas quando comparados os perfis espectrométricos de ambos notou-se que eram diferentes compostos. Como exposto na figura 7.9, a atividade anticâncer pode ser observada em linhagens de células cancerígenas HeLa (tumor de colón uterino), ocasionando cerca de 71% e 40% de morte das células cancerígenas nas concentrações de $250\mu\text{g/mL}^{-1}$ e $25\mu\text{g/mL}^{-1}$, respectivamente. Não apresentou nenhuma atividade citotóxica as linhagens celulares cancerígenas k562 (leucemia mieloide crônica) observa-se que a atividade anticâncer é inferior a observada na molécula SS-XL-20-1, mais um indicativo de não serem os mesmos compostos.

O espectrômetro de massas exibiu um espectro com a presença de íons de massa m/z 367.2663, a análise elemental das massas dos íons, apresentando fórmula molecular de $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_2$. A espectrometria de absorção nas regiões do infravermelho (IV) revelou bandas nas regiões: 2918.77, 1054.77, 1033.03, 1013.09. De acordo com os espectros de UV o composto pode ser visualizado no comprimento máximo de 194.10 nm. No espectro de CG-MS apresentou m/z =

163.00, 191.10, 312.20, 368.20 que equivalem ao mesmo espectro do composto denominado fenol, 2.2 metileno-bis[6-(1,1-dimetiletil)-4-etil] (figura 7.10), de acordo com o bando de dados de estrutura química chemspider e sciencefinder. Entretanto, devido a pouca quantidade do composto puro (< 1mg), não foi possível realizar análises espectrométricas de RMN-¹H, RMN-¹³C confiáveis e conclusivas para finalização da elucidação química deste composto, futuramente serão produzidos mais metabólitos pela linhagem *Aspergillus oryzae* CFE108 para finalizar a identificação deste composto, espectros presentes nos anexos.

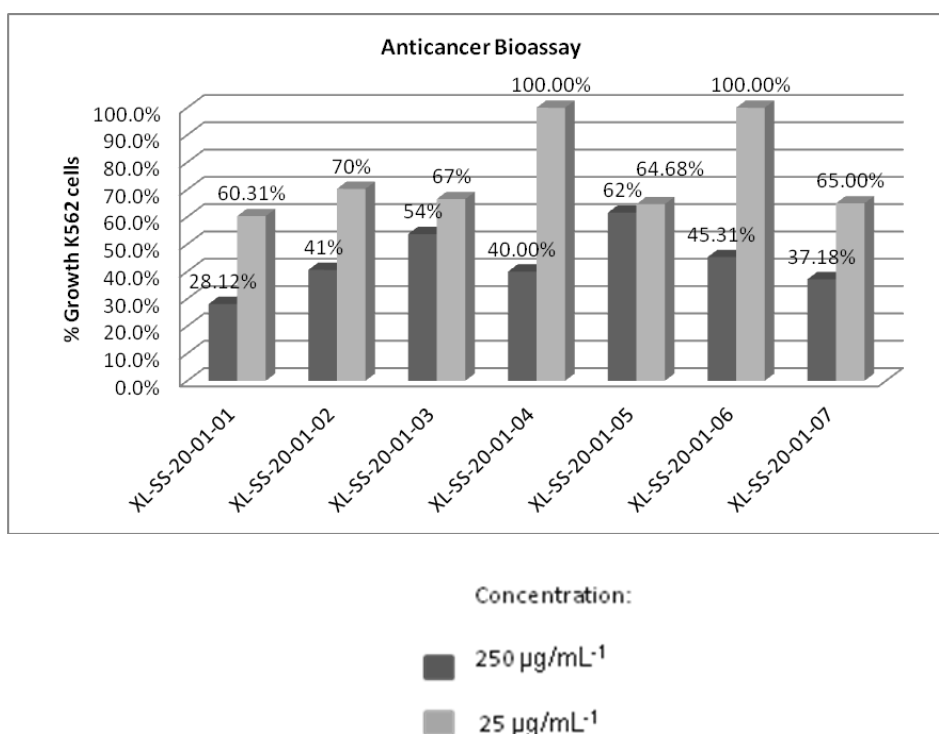


Figura 7.10 - Gráficos dos resultados de citotóxicidade do composto SS-XL-20-1 obtida da linhagem *Aspergillus oryzae* CFE108 na concentração de 250 µg/mL⁻¹ e 25 µg/mL⁻¹

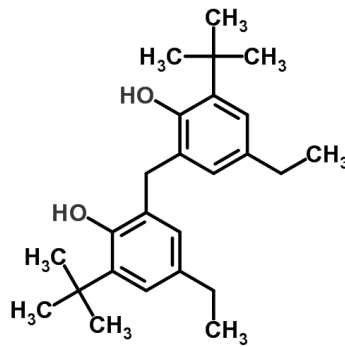


Figura 7.11 - Sugestão da estrutura química como composto SS-XL-20-1 fenol, 2,2 methilenobis [6-(1,1-dimethylethyl)-4-ethyl]

As linhagens fungicas de *Aspergillus oryzae* são amplamente utilizado na indústrias de fermentação tradicional japonesas, incluindo na produção de molho de soja, saquê, tofu, temperos e vinagre. Além disso, é conhecido por ter potencial para a produção de secreção de várias enzimas, biomoléculas interessantes como ácido ciclopiazônico, ácido b-nitropropionico, e MAPA (agregado protéico de fosfolinoleato-palmitoleato de amônio e magnésio) com significativa atividade antitumorais contra carcinoma renal RENCA), carcinoma pulmonar de Lewis (3LL), tumores renais leucemia mielocítica humana (HL60) (KITAMOTO et al., 1994; DURAN et al., 1997, GOMI; ABE 2007).

Machida et al. (2005) publicaram em seu estudo o sequenciamento completo do genoma de *A. oryzae* e em análise comparativa com outras espécies do gênero *Aspergillus* foi observado um significativo aumento no número de genes que sintetizam a produção de metabólitos secundário quando comparados ao genoma do *A. fumigatus* e *A. nidulans*. A exemplo disto tem-se a presença de mais receptores para transdução da cascata de sinais, genes relacionados ao citocromo P450 em *A. oryzae* foram encontrado 149, comparado com *A. nidulans*, 102 e *A. fumigatus*, 65, além da presença aumentada de genes de síntese para "policetídeo sintases (PKS), serinas proteinases, proteolíticas, β -galactosidase, variedades homologas de hidroxilases, oxigenases, contudo em relação aos genes envolvidos na síntese de aflotoxinas estão com presença diminuída quando comparado ao *A. flavus*, devido a mínima produção de micotoxinas ao longo da historia foi apoiado a sua aplicada na industrias a fim de obter um produto com alta qualidade e sem problems de risco a saúde e/ou ambiente (ARCHER; DYER, 2004; MACHIDA et al., 2005).

Os compostos isolados e identificado neste trabalho ate então não se tem registro de produzidos por linhagens do gênero *Aspergillus*, sendo este estudo o primeiro registro a cerca desses compostos por linhagem endofítica *Aspergillus oryzae* CFE108 isolada de *Combretum leprosum*, planta endêmica do semiárido brasileiro. Portanto, pode-se aqui reafirmar que linhagens fúngicas endofíticas de plantas endêmicas da caatinga evidencia uma fonte em potencial para bioprospecção de compostos com atividades biológicas, principalmente, antitumoral como vistos nestes resultados prévios.

Referências

- ABREU, P.M.; BRANCO, P.S. Natural product-like combinatorial libraries **Journal of Brazilian Chemistry Society**, São Paulo, v. 14, p. 675-712, 2003.
- ADELEYE, I.A.; OMADIME, M.E.; DANIELS, F.V. Antimicrobial activity of essential oils and extracts of *Gongronema latifolium* Decne on bacterial isolates from blood stream of HIV infected patients. **Journal of Pharmacology and Toxicology**, Nigeria, v. 3, p. 312-320, 2011.
- AL-BARI, M.A.A.; SAYEED, M.A.; RAHMAN, M.S.; MOSSADIK, M.A. Characterization and antimicrobial activities of a phthalic acid derivative produced by *Streptomyces bangladeshiensis*: a novel species in Bangladesh. Res **Journal of Medicine and Medical Science**, Sapele, v. 1, p. 77-81, 2006.
- AMADE, P.; MALLEA, M.; BOUAICHA, N. Isolation, structural indentification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartory. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 47, p. 201-207, 1993.
- ARCHER, D.B.; DYER, P.S. From genomics to post-genomics in *Aspergillus*. **Current Opinion of Microbiology**, London, v. 7, p. 499--504, 2004.
- ARYA, P.; JOSEPH, R.; CHOU, D.T.H. Toward high-throughput synthesis of complex natural product-like compounds in the genomics and proteomics age **Chemistry and Biology**. London, v. 9, p. 145-156, 2002.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Editora da Embrapa, 1998. p. 117-137.
- AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, Jr.; PEREIRA, J.O.; ARAUJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 40-65, 2000.
- BREINBAUER, R.; VETTER, I.R.; WALDMANN, H. *ANGEW*. From protein domains to drug candidates -- natural products as guiding principles in compound library design and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, New York, v. 41, p. 2878-2890, 2002.

BURKE, M.D.; BERGER, E.M.; SCHREIBER, S.L. Generating diverse skeletons of small molecules combinatorially. **Science**, New York, v. 302, p. 613-618, 2003.

BUTLER, M.S. The rule of natural products chemistry in drugs discovery. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

DREWS, J. **In quest of tomorrow's medicines**. New York: Springer-Verlag, 1999. v. 2.

_____. Drug discovery: a historical perspective. **Science**, New York, v. 287, p. 1960-1964, 2000.

DU, Q.; SHEN, L.; XIU, L.; JERZ, G.; WINTERHALTER, P. Di-ethyl hexyl phthalate in the fruits of *Benincasa hispida*, **Food Additives & Contaminants**, London, v. 23, p. 552-555, 2006.

DÚRAN, N.; JUSTO, G.Z.; SOUZA-BRITO, A.R.M.; RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A.N. SB-73/MAPA: protein magnesium phospholipid-palmitoleate anhydride. **Drugs of the Future**, Barcelona, v. 22, p. 454-457, 1997.

ENTZEROTH, M. Emerging trends in high-throughput screening. **Current Opinion Pharmacology**, Oxford, v. 3, 522-529, 2003.

FEHER, M.; SCHMIDT, J.M. Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry, **Journal Chemical Information Computer Science**, Washington, v. 43, p. 218-227, 2003.

GERSHELL, L.J.; ATKINS, J.H. A brief history of novel drug discovery technologies. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 2, p. 321-327, 2003.

GOMI, K.; ABE, K. **The Aspergilli: genomics, medical applications, biotechnology, and research methods (mycology)**. Boca Raton: CRC Press, Florida, 2007. v. 6, p. 427-437.

HENKEL, T.; BRUNNE, R.M.; MULLER, H.; REICHEL, F. Statistical investigation into the structural of natural products and synthetic compounds **Angewandte Chemie International Edition**, New York, v. 38, p. 643-647, 1999.

KINGSTON, D.G.I.; NEWMAN, D.J. Mother nature's combinatorial libraries; their influence on the synthesis of drugs. **Current Opinion Drug Discovery and Development**, London, v. 5, p. 304-316, 2002.

KILIKIAN, B.V.; PESSOA JR., A.P. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMILDELL, W.; BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. (Org.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. v. 2, p. 201-215.

KITAMOTO, K.; KIMURA, K.; GOMI, K.; KUMAGAI, C. Electrophoretic karyotype and gene assignment to chromosomes of *Aspergillus oryzae*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemical**, Tokyo, v. 58, p. 1467--1470, 1994.

LEE, M.L.; SCHNEIBER, G. Scaffold architecture and pharmacophoric properties of natural products and trade drugs: Application in the design of natural product-based combinatorial libraries, **Journal of Combinatorial Chemistry**, Washington, v. 3, p. 284-289, 2001.

MACHIDA, M.; ASAI, K.; SANO, M.; TANAKA, T.; KUMAGAI, T.; TERAJ, G.; KUSUMOTO, K.; ARIMA, T.; AKITA, O.; KASHIWAGI, Y.; ABE, K.; GOMI, K.; HORIUCHI, H.; KITAMOTO, K.; KOBAYASHI, T.; TAKEUCHI, M.; DENNING, D. W.; GALAGAN, J. E.; NIERMAN, W. C.; YU, J.; ARCHER, D. B.; BENNETT, J. W.; BHATNAGAR, D.; CLEVELAND, T. E.; FEDOROVA, N. D.; GOTOH, O.; HORIKAWA, H.; HOSOYAMA, A.; ICHINOMIYA, M.; IGARASHI, R.; WASHITA, K.; JUUVADI, P. R.; KATO, M.; KATO, Y.; KIN, T.; KOKUBUN, A.; MAEDA, H.; MAEYAMA, N.; MARUYAMA, J.; NAGASAKI, H.; NAKAJIMA, T.; ODA, K.; OKADA, K.; PAULSEN, I.; SAKAMOTO, K.; SAWANO, T.; TAKAHASHI, M.; TAKASE, K.; TERABAYASHI, Y.; WORTMAN, J. R.; YAMADA, O.; AMAGATA, Y.; ANAZAWA, H.; HATA, Y.; KOIDE, Y.; KOMORI, T.; KOYAMA, Y.; INETOKI, T.; SUHARNAN, S.; TANAKA, A.; ISONO, K.; KUHARA, S.; OGASAWARA, N.; KIKUCHI, H. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*, **Nature**, London, v. 438, p. 22-29, 2005.

MAVAR, M.H.; HADDAD, M.; PIETERS, L.; BACCELI, C.; PENGE, A.; QUETIN, L.J. Anti-inflammatory compounds from leaves and root bark of *Alchornea cordifolia* (Schum and Thonn.) Muell.-Arg. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 115, p. 25-29, 2008.

MELO, I.S. Recursos genéticos microbianos. In: MELO, I.S.; VALADARE-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C. **Recursos genéticos e melhoramento: microrganismos**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2002. p. 2-70.

MITTERMEIER, R.; GIL, P. R.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J.D.; BROOKS, T.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B. **Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Ecoregions**. Mexico City: CEMEX & Agrupacion Sierra Madre, 2004. v. 1. 640 p.

NANCY, T.; DUPEYRE, G.; CHABOT G.G.; SEGUIN, J.; TILLEQUIN, F.; SCHERMAN, D.; MICHEL, S.; CACHET, X. Synthesis and biological evaluation of new disubstituted analogues of 6-methoxy-3-(3',4',5'-trimethoxybenzyl)-1*H*-indole (BPR0L075), as potential antivasular agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 16, p. 7494-7503, 2008.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NG, R. **Drugs: from discovery to approval**. Hoboken: Wiley-Liss, 2004. 355 p.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. **NIAID global health research plan for HIV/AIDS, malaria and tuberculosis**. Bethesda: U.S. Department of Health and Human Services, 2001, 103 p.

NGUYEN, D.T.; NYUGEN, D.H.; LYUN, H.L.; LEE, H.B.; SHIN, J.H.; KIM, E.K. Inhibition of melanogenesis by diocyl phthalate isolated from *Nigella glandulifera* Freyn. **Journal of Microbial Biotechnology**, Kanpur, v. 17, p. 1585-1590, 2007.

ODDS, F.C. Genomics, molecular targets and the discovery of antifungal drugs. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 22, p. 229-237, 2005.

PETTIT, G.R.; SINGH, S.B.; SCHMIDT, J.M.; NIXEN, M.L.; HAMEL, E.; LIN C.M. Isolation, structure, synthesis, and antimitotic properties of combretastatins B-3 and B-4 from *Combretum caffrum*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 51, p. 517-527, 1988.

PHARMA 2010: the threshold of innovation. IBM Consulting Services, 2002. Disponível em: <http://www-1.ibm.com/services/strategy/files2/pharma_es.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2011.

PHARMACEUTICAL industry profile. PHARMA, 2003. p. 1-19. Disponível em: <<http://www.phrma.org/publications/publications/profile02/index.cfm>>. Acesso em: 29 nov. 2011.

RAMALAKSHMI, S.; MUTHUCHELIAN, K. Analysis of bioactive constituents from the leaves of *Mallotus tetraococcus* (ROXB.) KURZ, by gas chromatography - mass spectrometry. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Jhansi, v. 2, p. 1449-1454, 2011.

RAWLINS, M.D. Cutting the cost of drug development? **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 3, p. 360-364, 2004.

ROUHI, A.M. Moving beyond natural products. **Chemical and Engineering News**, Washington, v. 13, p. 104-107, 2003.

RUAN, H.L.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.H.; PI, H.F.; WU, J.Z. Studies on constituents from roots of *Euphorbia hylonoma*, **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, Beijing, v. 31, p. 742-744, 2006.

SRINIVASAN, G.V.; SHARANAPPA, P.; LEELA, N.K.; SADASHIVA, C.T.; VIJAYAN, K.K. Chemical composition and Antimicrobial activity of *Leea indica* (Burm. F) Merr flowers. **Natural Product Radiance**, New Delhi, v. 8, p. 5, 2009.

SRIVASTAVA, R.; SALUJA, D.; DWARAKANATH, B.S.; CHOPRA, M. Inhibition of human cervical cancer cell growth by ethanolic extract of *Boerhaavia diffusa* Linn. (Punarnava) root, **Evidence Based Complementary Alternative Medicine**, Oxford, v. 2, p. 1-13, 2010.

STAHURA, F.; GODDEN, J. W.; XUE, L.; BAJORATH, J. Distinguishing between natural products and synthetic molecules by descriptor Shannon entropy analysis and binary QSAR calculations, **Journal of Chemical Information and Modeling**, Washington, v. 40, p. 1245-1252, 2000.

VALDÉS, B.S.G. Estructura y actividad de los antifúngicos. **Revista Cubana de Farmacia**, Habana, v. 39, n. 2, 2005.

VASCHETTO, M.; WEISSBROD, T.; BROLE, D.; GUNER, O. **Current Opinion Drug Discovery and Development**, London, v. 6, p. 377-383, 2003.

VESSECCHIO, R.; GALEMBECK, S.E. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 840-853, 2008.

WESS, G.; URMANN, M.; SICKENBERGER, B. Medicinal chemistry: challenges and opportunities. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 40, p. 3341-3350, 2001.

WESSJOHANN, L.A. Synthesis of natural-product-based compound libraries, **Current Opinion Chemistry and Biology**, London, v. 4, p. 303-309, 2000.

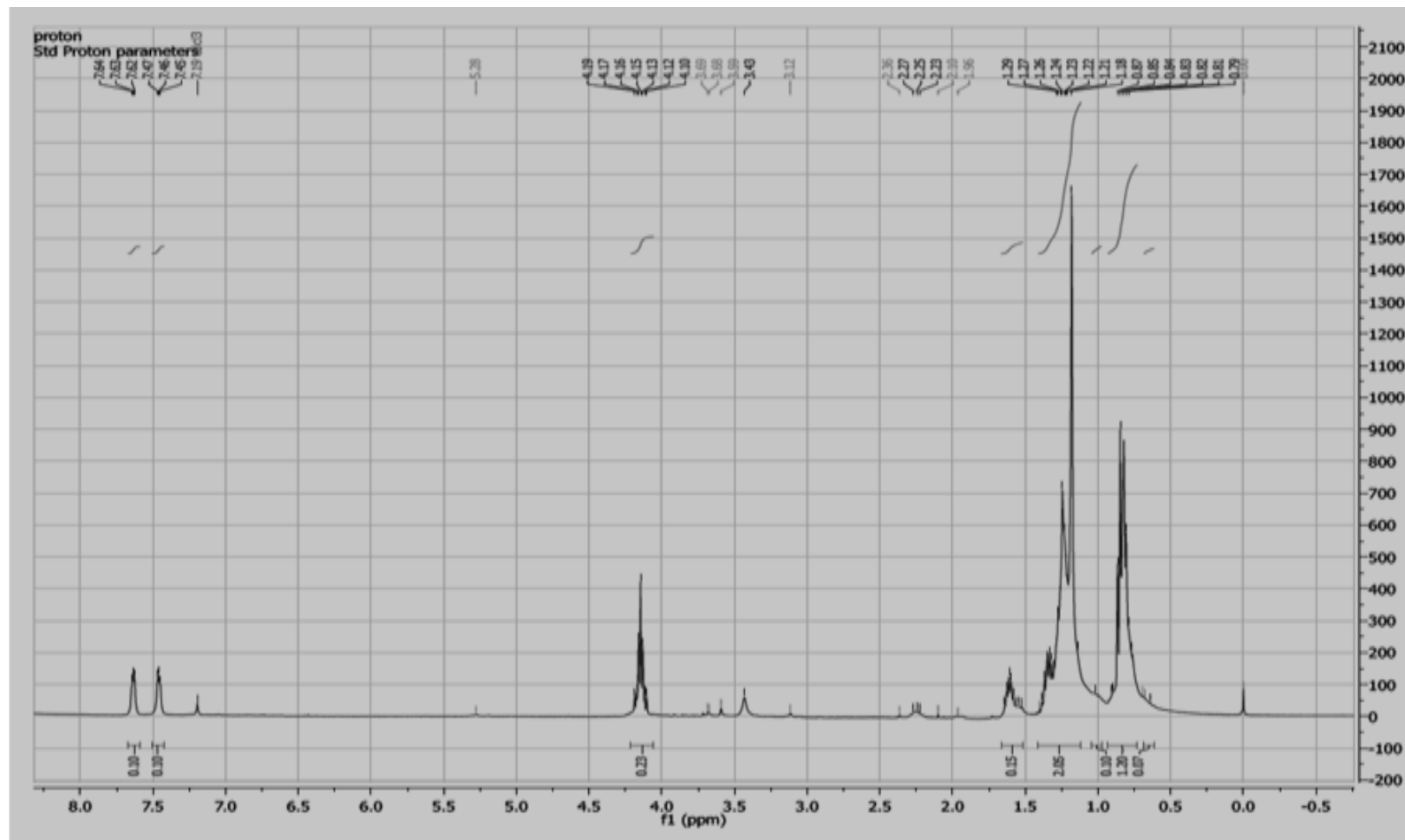
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Indicativo da presença do composto combretastatin (CA4), pertencente ao grupo estilbeno, nos extratos brutos de partes vegetais (folhas, galhos e frutos) de *Combretum leprosum*, por apresentarem composto com mesma massa e tempo de retenção que ao padrão;
- Alteração de pH no meio aquoso potencializou a extração e separação de composto do meio, além disso, os compostos extraídos em meio aquoso ácido apresentaram maior quantidade moléculas ativas
- Diante das técnicas utilizadas não pode se observar a presença de grupos estilbeno nos extratos fúngicos;
- Os extratos fúngicos que apresentaram as maiores atividades antibacteriana não foram os que apresentaram as maiores citotoxicidade nas linhagens tumorais; entretanto, os extratos que apresentaram atividade com linhagens fúngicas específica do grupo Oomycota, foram as mais potentes contra as linhagens celulares tumorais.
- A atividade antioxidante nos extratos fúngico pode ser sugestivo de presença de flavonóides, taninos e fenóis nestes extratos;
- Linhagens de células de tumores não sólidos foram mais susceptíveis aos compostos testes do que as células formadoras de tumores sólidos. Isto, pode ser um indicativo no mecanismo de ação e especificidade dos compostos;
- O antagonismo químico, pode demonstrar a presença de compostos que competem entre si, pelos mesmos sítios de ação e/ou quando diluídos, a atividade de um composto é potencializado pela diminuição da concentração do outro, como observado na ação dos compostos presente do extrato 177a;
- A capacidade de promover a transformação celular pelos compostos fúngicos presente na fração Fr05 resultante do fracionamento do extrato 108a, demonstra possível atividade antivascolar podendo impedir a formação de novos vasos que alimentam os tumores, assim como os quimioterápicos padrões;

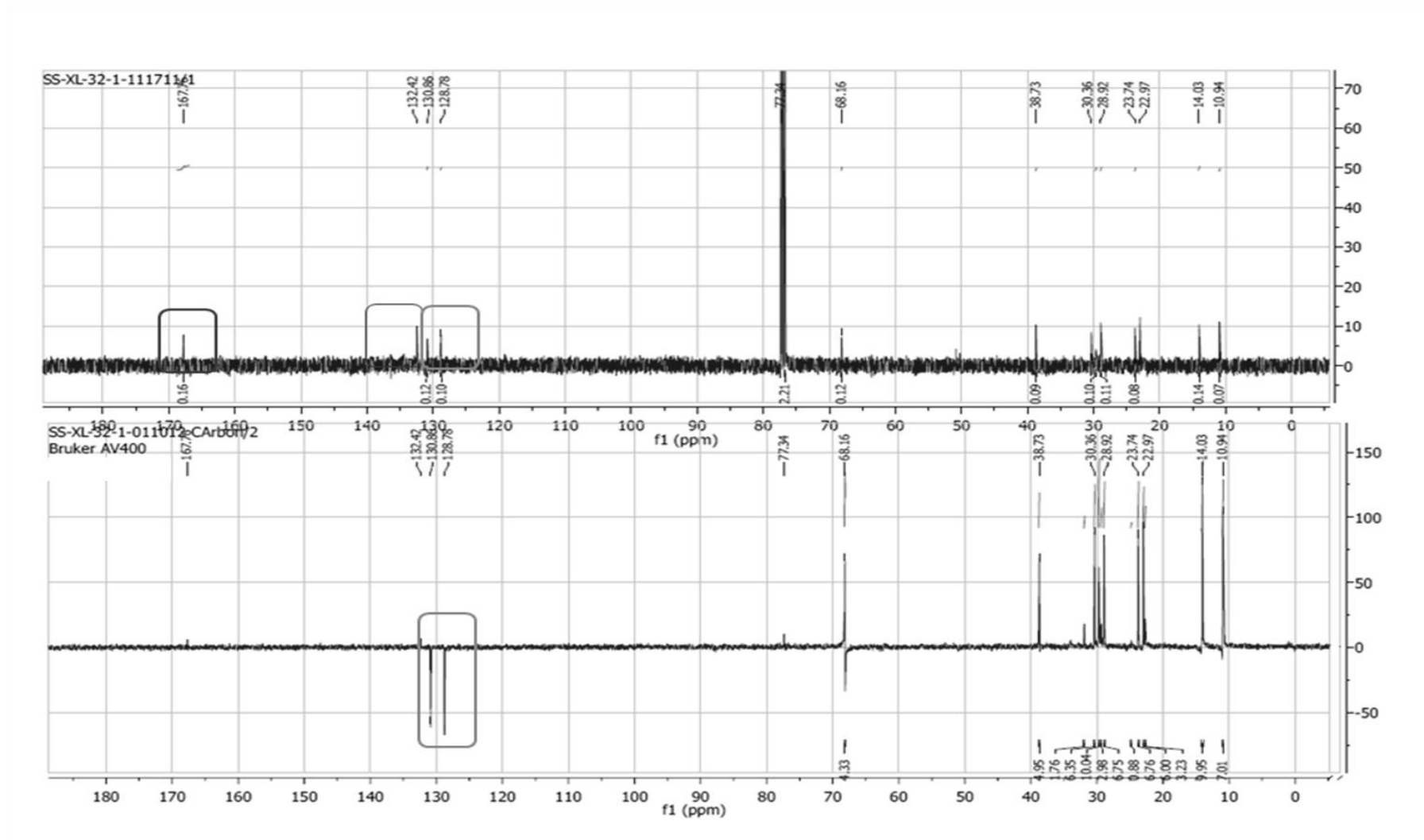
- Os quimioterápicos padrões utilizados apresentaram citotoxicidade tanto quanto os princípios ativos presentes nas fração Fr05;
- Dentro das perspectivas para trabalhos futuros, a continuidade da investigação dos mecanismos envolvidos no processo envolvidos nos mecanismos de ação que desencadeiam das atividades biológicas observadas;
- Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os estudos de atividade antitumoral dos compostos SS-XL- 32-1 e SS-XL-20-1 utilizando o modelo *in vitro* de citotóxicidade MTT merecem atenção, ale do aprofundamento dos mecanismos envolvidos na ação dos compostos deve ser conhecido;
- A utilização do composto SS-XL-32-1 como um aditivo na interação com outras drogas podem potencializar a atividade dos quimioterápicos atuais;
- O potencial antitumoral demonstrado nesta tese para os metabólitos estudados reforça a possibilidade de aplicação na terapêutica contra o câncer, sendo ainda promissor considerar em estudos futuros de terapia combinada;
- Embora estudos específicos relacionados à estabilidade das biomoléculas não tenham sido realizados, foi observado que o extrato bruto e os compostos isolados quando mantido sob refrigeração (durante aproximadamente seis mese a -4°C) permaneceu com atividade antifúngica, demonstrando serem compostos estáveis sob estas condições;
- Considerando os resultados aqui apresentados e os encontrados na literatura, a busca de compostos em endofíticos é promissora e potencial para produção de protótipos de importância biotecnológica.

ANEXOS

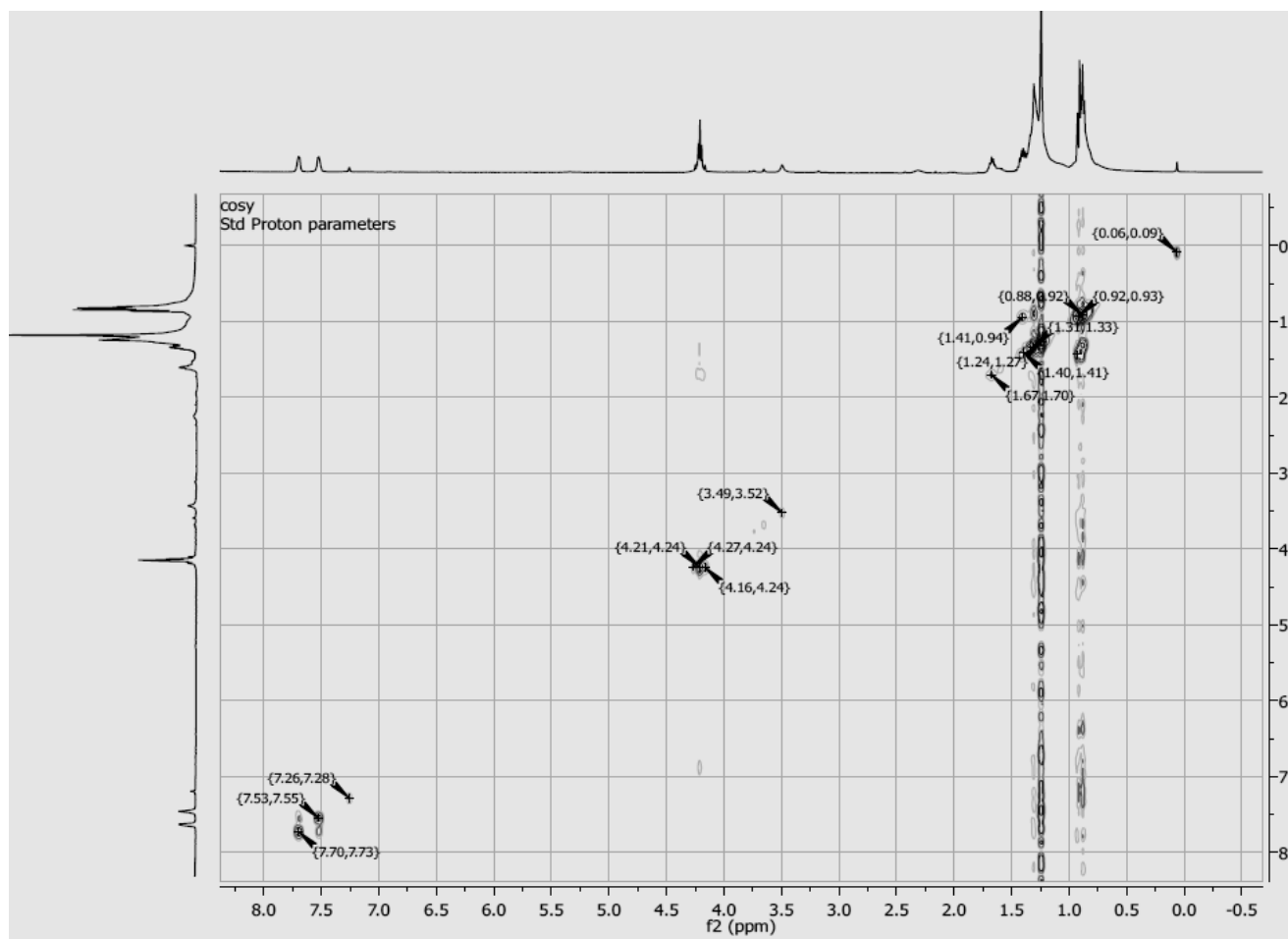
Espectros do composto SS-XL-32-1



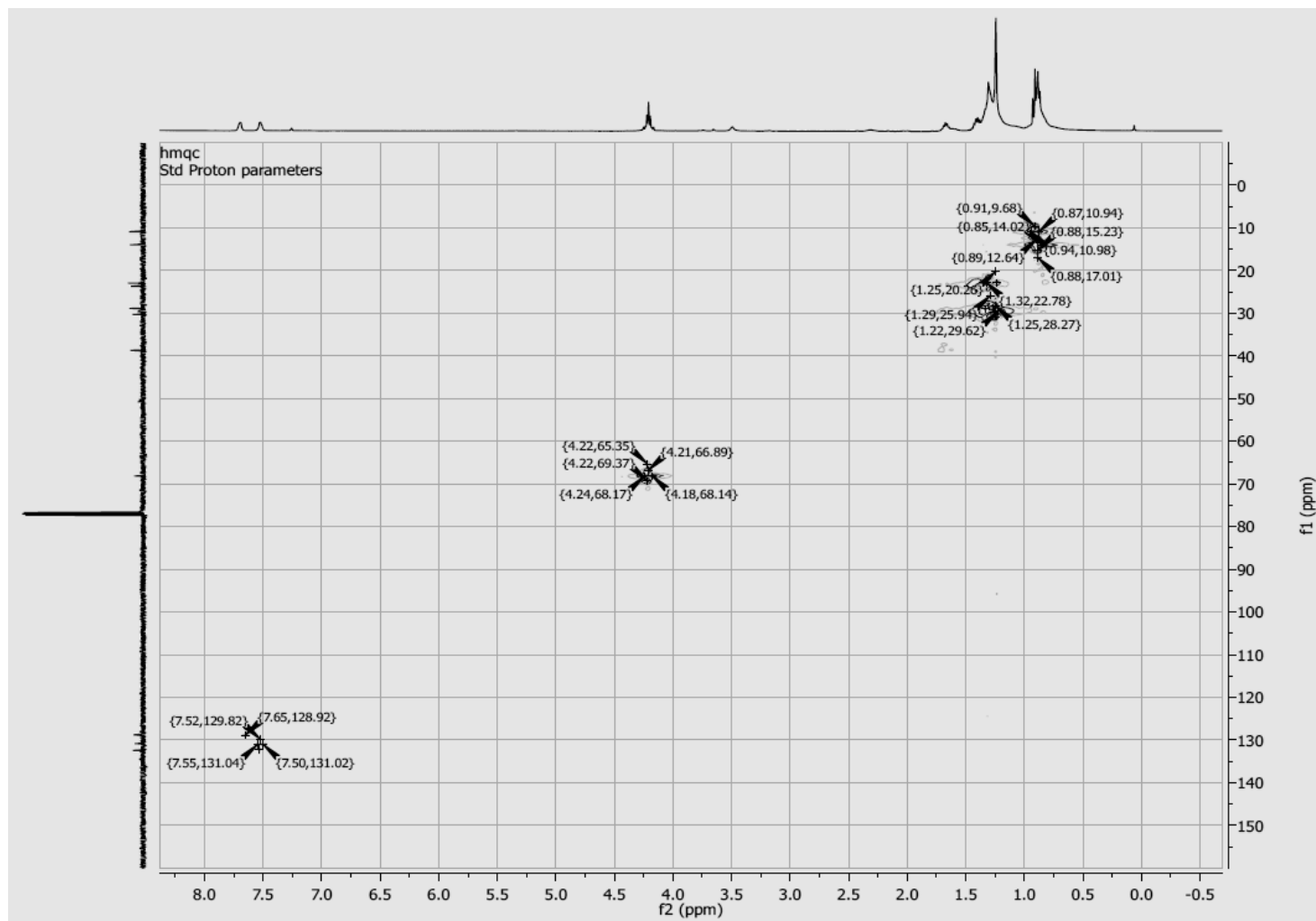
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3) registrados em espectrômetro Bruker Avance 400 MHz .



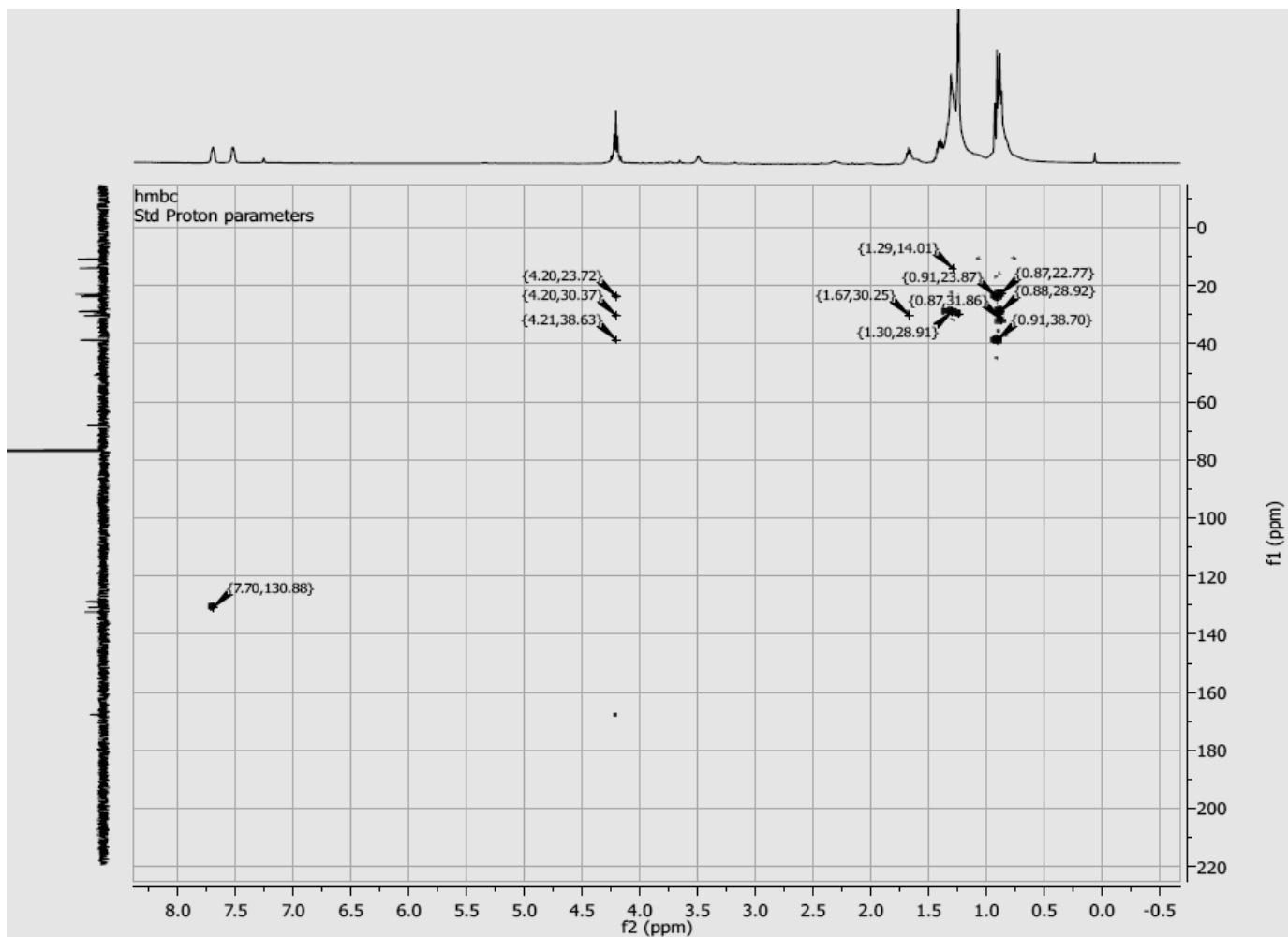
Comparação entre espectro de ^{13}C -RMN (400 MHz, CDCl_3) e o espectro de DEPT, sinais no campo superior corresponde aos carbonos CH e CH_3 e os sinais detectados no campo inferior correspondente ao CH_2 .



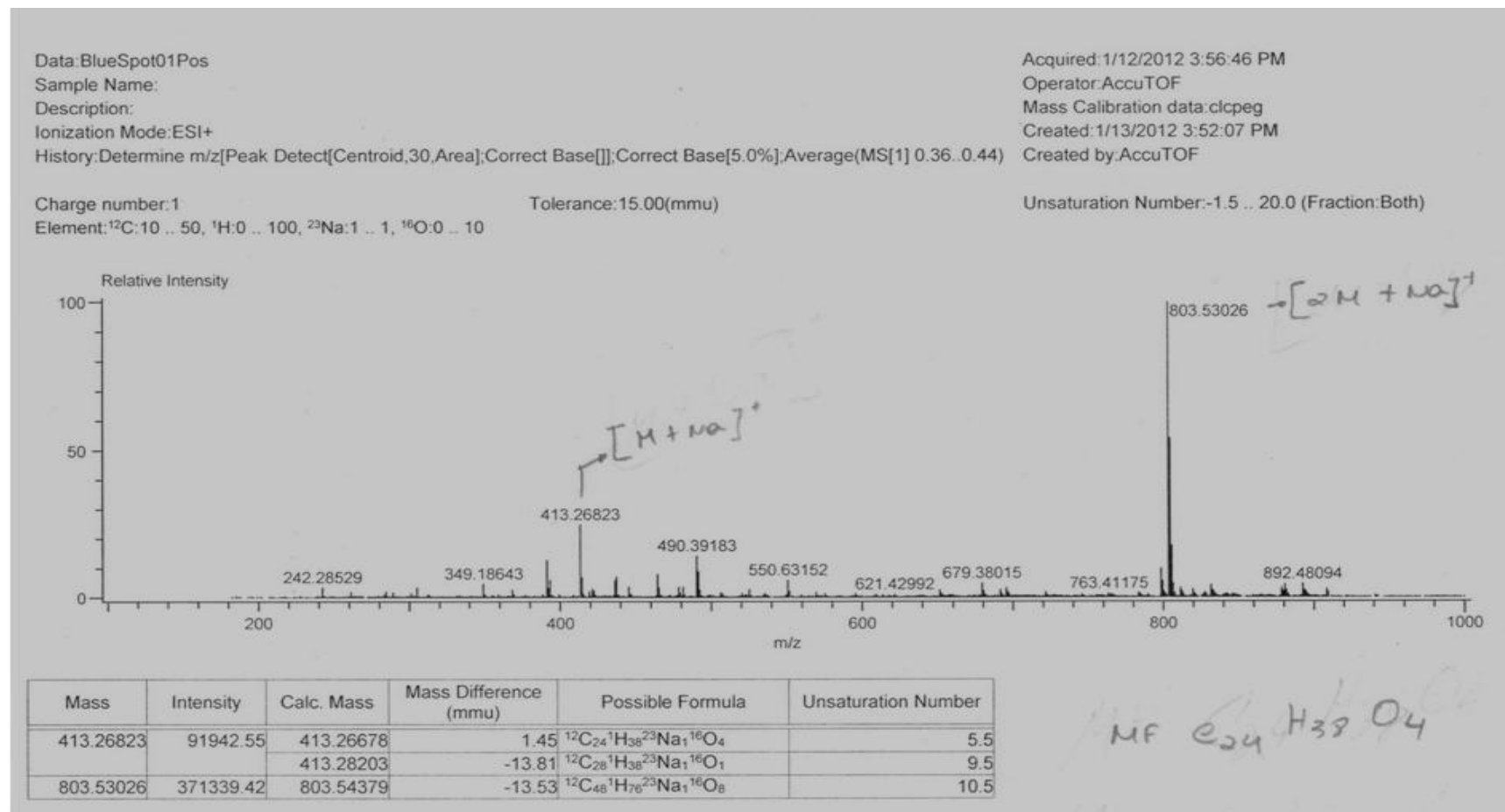
Espectro de COSY, correlação entre ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3), utilizando como padrão para os dois campos ^1H -RMN, sendo os pontos em intersecção os núcleos dos sinais correspondentes.



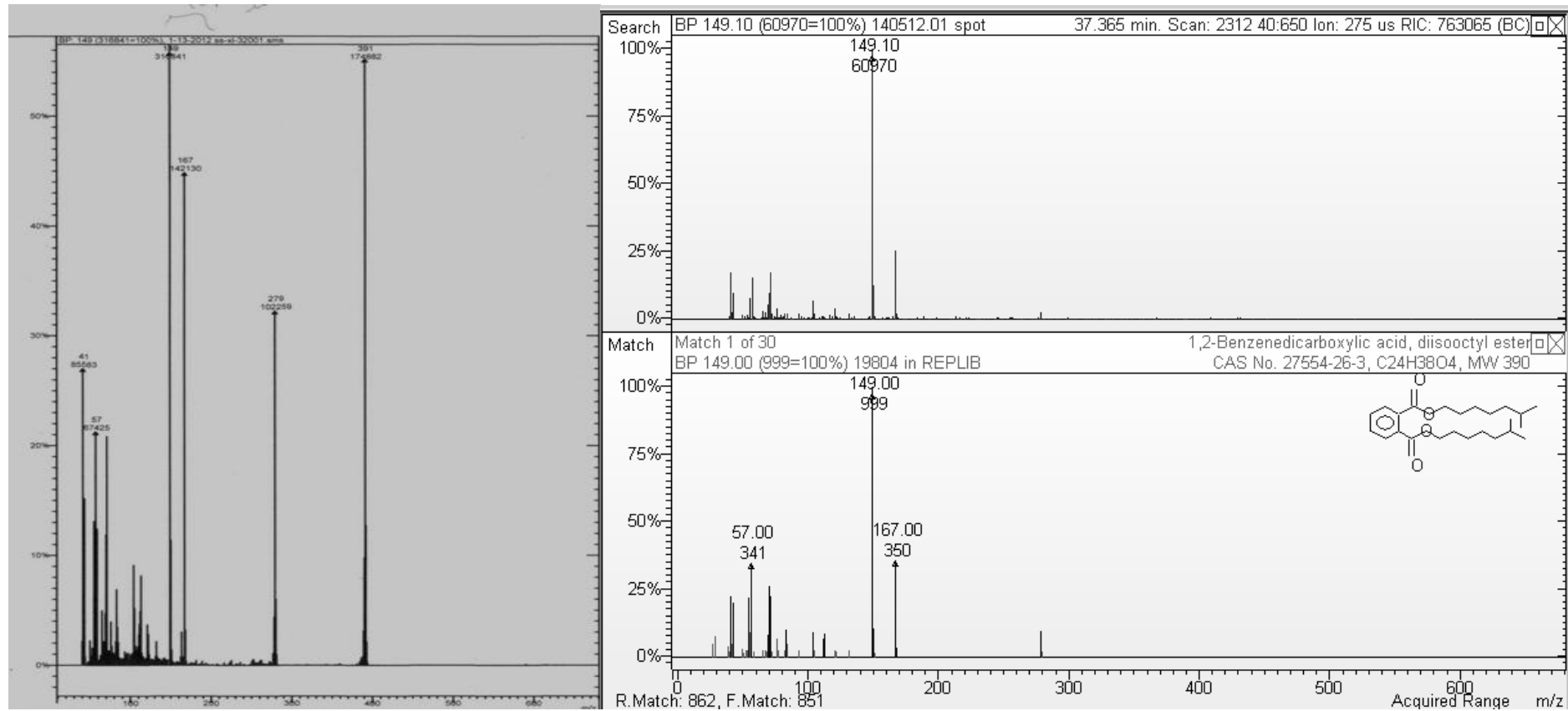
Espectro de HMQC, correlação heteronuclear entre ^1H -RMN e ^{13}C -RMN (400 MHz, CDCl_3), utilizando como padrão para os campos o ^1H -RMN (f2) e ^{13}C -RMN (f1).



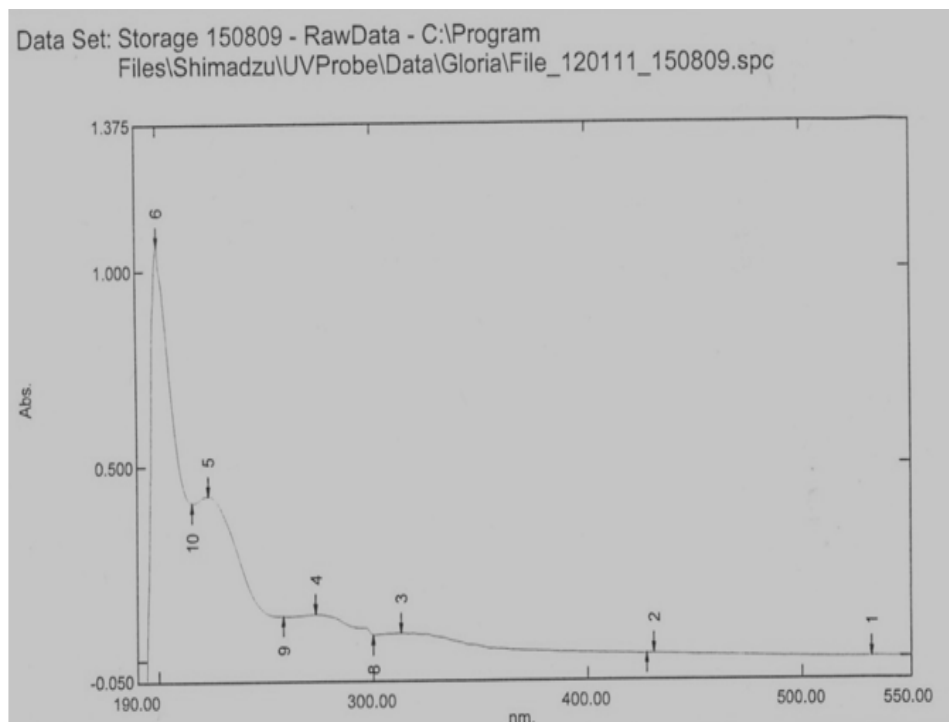
Espectro de HMBC, correlação heteronuclear entre ^1H -RMN e ^{13}C -RMN (400 MHz, CDCl_3), utilizando como padrão para os campos o ^1H -RMN (f2) e ^{13}C -RMN (f1).



Análise de espectro de massa em LC/MC (massas em alta resolução foram obtidos usando Agilent 1100HPLC para JEOL AccuTOF (JMS-T100LC), com sinais do polo positivo, expondo a massa molecular, fórmula molecular e os sinais correspondente da cationização e dos dímeros formados.

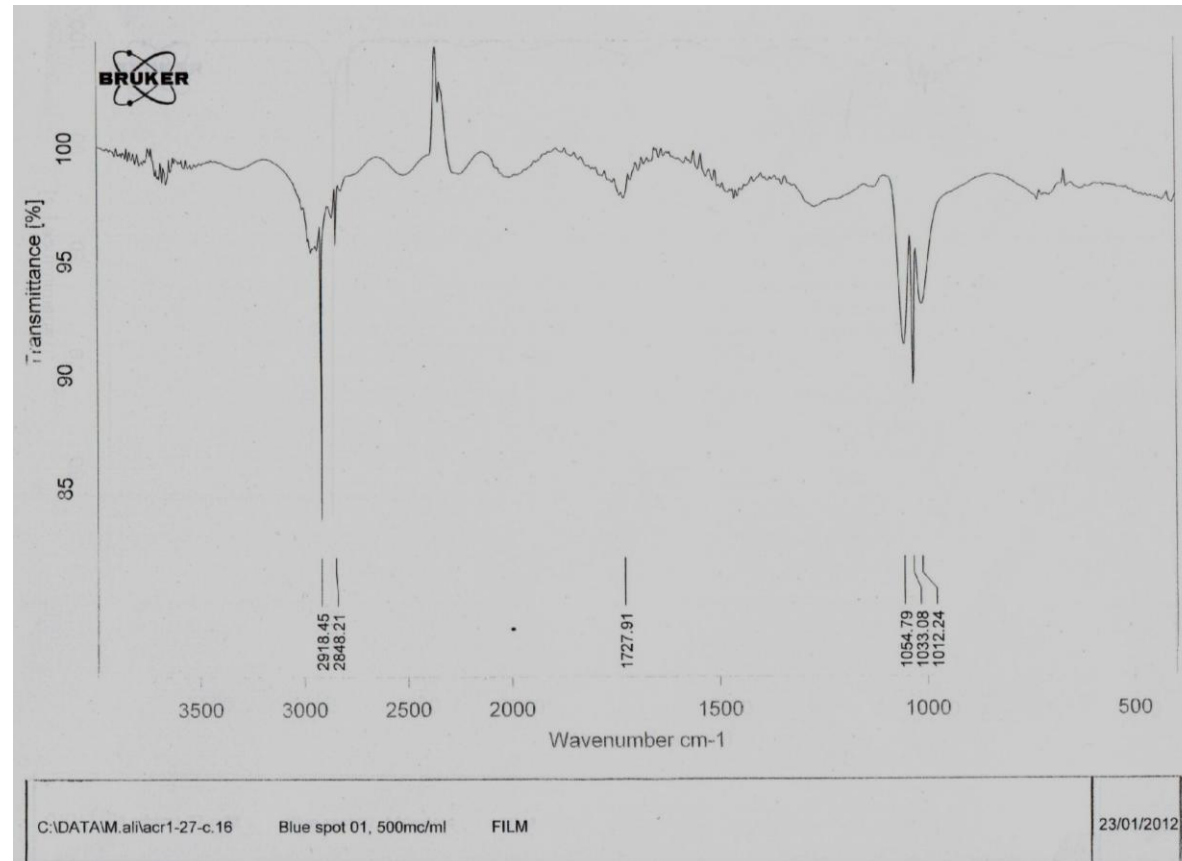


Espectro de CG/LM, campo superior corresponde aos espectro do composto isolado SS-XL-32-1, e o espectro inferior os sinais correspondente ao padrão (Bis-etil-ftalato) presente no banco de dados do aparelho Varian Saturn 2000 MS/MS.

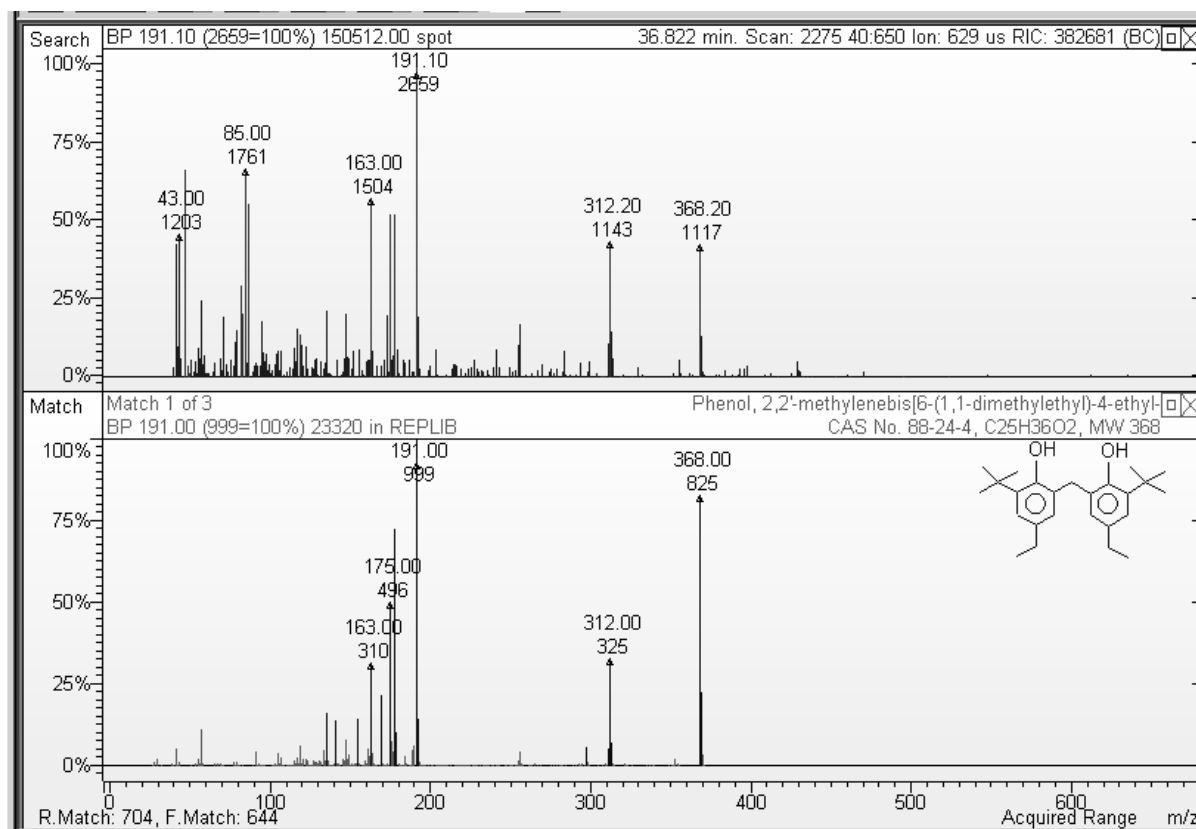


No.	P/V	Wavelength	Abs.
1	⬆	532.50	0.002
2	⬆	431.50	0.013
3	⬆	313.00	0.068
4	⬆	273.50	0.118
5	⬆	223.50	0.424
6	⬆	200.50	1.064
7	⬆	428.50	0.012
8	⬆	300.50	0.064
9	⬆	259.00	0.113
10	⬆	216.00	0.404

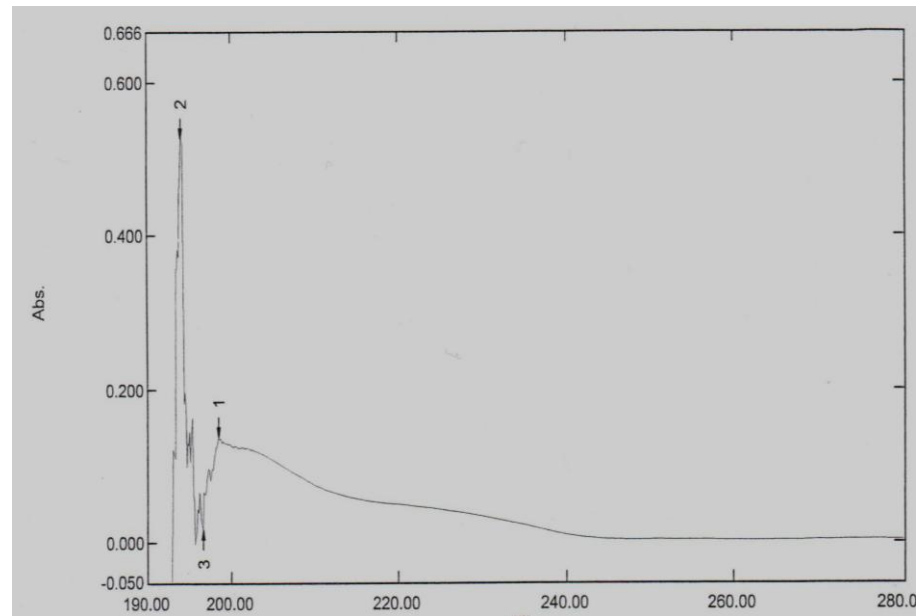
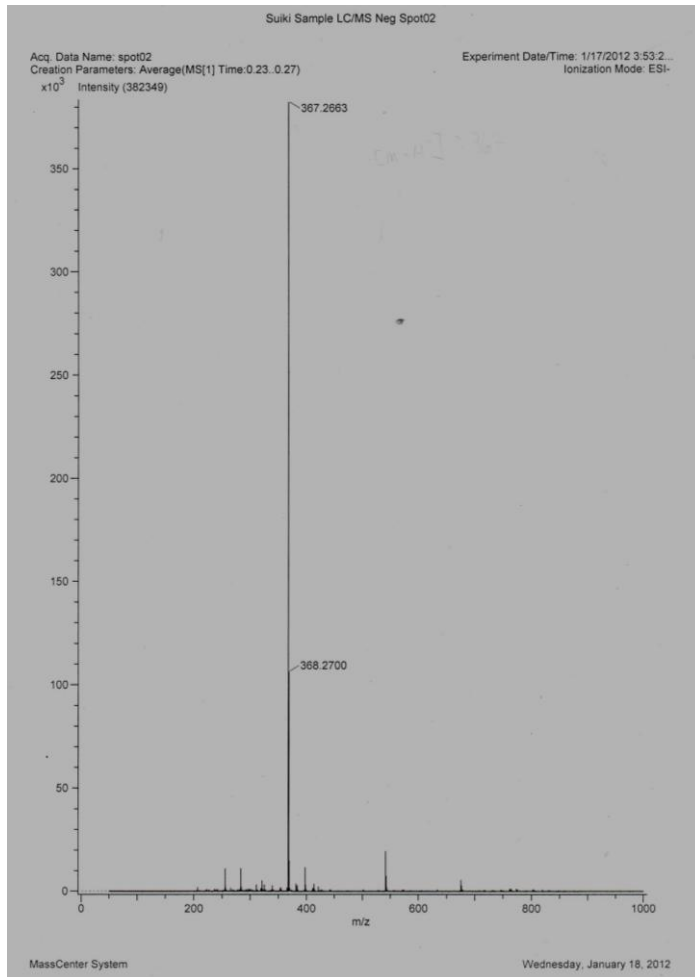
Espectro de UV (nm) polarímetro 241 Perkin-Elmer UV-3101 apresentando o ponto máximo de absorção a 200.50 nm.



Espectros obtidos por absorção na região de infravermelho, aparelho FT-IR Bruker TENSOR™, em pastilha de sílica utilizando o software OPUS™ do compostos SS-XL-32-01, revelou bandas nas regiões: 2918.45, 2848.21, 1727.91, 1054.79, 1033.0, 1012.24.

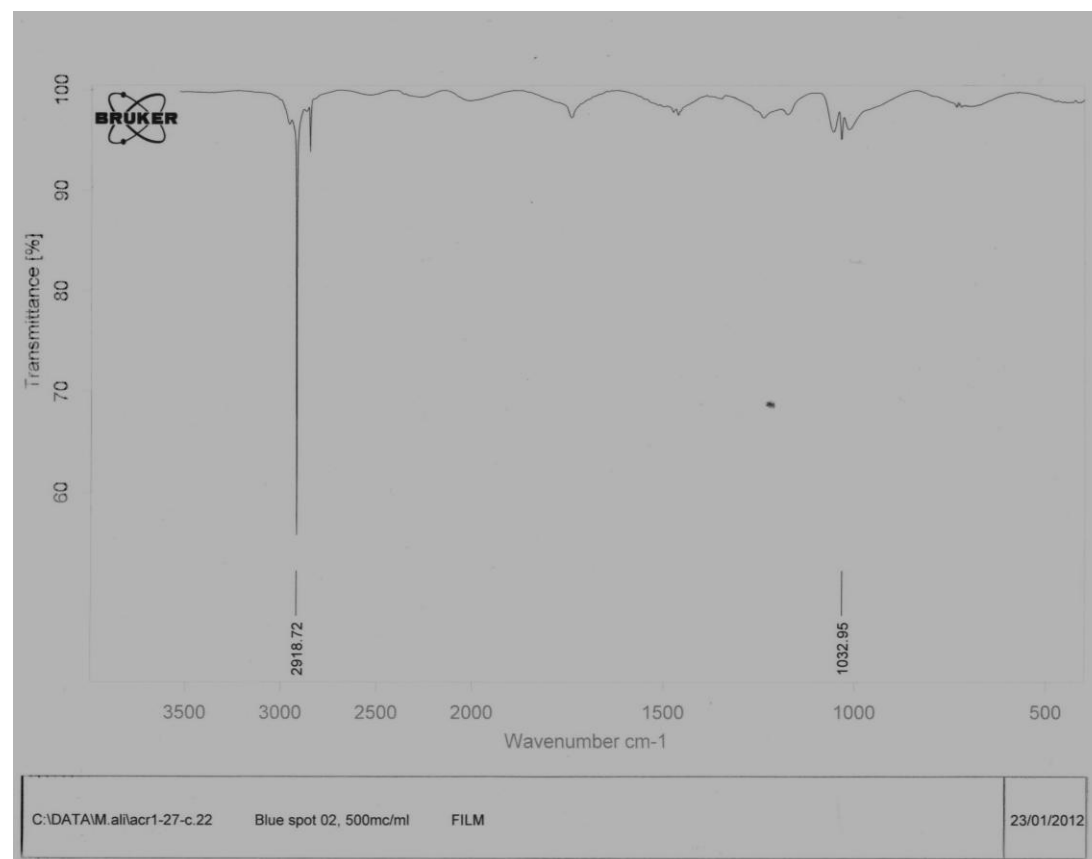
Espectros do composto SS-XL-20-01

Espectro de CG/LM, exibindo dois compôs paralelos, em que o campo superior corresponde aos espectro do composto isolado SS-XL-20-1, e o espectro inferior os sinais correspondente ao padrão (fenol, 2.2 methylenobis [6-(1,1-dimethylethyl)-4-ethyl],) presente no banco de dados do aparelho.



No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	⊗	198.50	0.138	
2	⊗	194.10	0.529	
3	⊕	196.60	0.017	

(A) Espectro de massa em LC/MC (massas em alta resolução foram obtidos usando Agilent 1100HPLC para JEOL AccuTOF (JMS-T100LC), com sinais do polo positivo, expondo a massa molecular e os sinais correspondente da cationização e dos dímeros formados; (B) Espectro de UV (nm) polarímetro 241 Perkin-Elmer UV-3101 apresentando o ponto máximo de absorção a 194.10 nm.



Espectros obtidos por absorção na região de infravermelho, aparelho FT-IR Bruker TENSOR™, em pastilha de sílica utilizando o software OPUS™ do compostos SS-XL-20-01, revelou bandas nas regiões: 2918.77, 1054.77, 1033.03, 1013.09.