



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira



LARISSA CASTRO NOBRE

AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
Aspergillus sclerotiorum

MACAÉ, 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira



LARISSA CASTRO NOBRE

AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
Aspergillus sclerotiorum

Trabalho de conclusão de curso (TCC)
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio de Janeiro –
Campus Macaé, como requisito para obtenção do
título de farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Willian Jonis Andrioli

MACAÉ, 2022

Verso da folha de rosto

CIP - Catalogação na Publicação (biblioteca@macae.ufrj.br)

N754

Nobre, Larissa Castro

Avaliação química e biológica de metabólitos secundários de *Aspergillus sclerotiorum* / Larissa Castro Nobre - Macaé, 2022.

70 f.

Orientador(a): Willian Jones Andrioli.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. Fungos endofíticos . 2. Metabólitos secundários. 3. Produtos naturais.
I. Andrioli, Willian Jones, orient. II. Título.

CDD 615

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Biblioteca Central do Centro Multidisciplinar UFRJ-Macaé

Bibliotecário: Anderson dos Santos Guarino CRB7 – 5280

LARISSA CASTRO NOBRE

AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
Aspergillus sclerotiorum

Trabalho de conclusão de curso (TCC) defendido e aprovado como requisito para
obtenção do título de farmacêutico.

Macaé, 07 de abril de 2022.

Comissão avaliadora:

Prof.^a Dr.^a Michelle Frazão Muzitano
UFRJ/Macaé

<http://lattes.cnpq.br/6637126351943749>

Prof.^a Dr.^a Denise Oliveira Guimarães
UFRJ/ Macaé

<http://lattes.cnpq.br/3655111598408217>

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, que me deu oportunidades, coragem e esperança para concluir essa etapa muito importante da minha vida. Obrigada por todo amor, por ser meu guia e me iluminar em todas as minhas escolhas.

Aos meus pais, José Carlos e Maria Benta, que sempre estiveram ao meu lado, fornecendo o apoio, amor e compreensão em todos os momentos.

Aos meus Pastores, Elias e Idalina, por todo o amor, interseção, dedicação e suporte nos momentos difíceis. É muito bom saber que sempre posso contar com vocês.

As minhas primas Thayná, Thayane e Leila, que mesmo distantes me apoiaram, me deram força e ânimo para prosseguir. Meus dias são mais felizes com a motivação de vocês.

Aos meus amigos da faculdade, em especial a Chayanne, que me acolheu com muito amor e carinho. Agradeço por sempre me fazer acreditar que tudo daria certo, mesmo quando eu não acreditava nisso.

Ao Gabriel Pietro, meu grande amigo inesquecível.

Ao meu namorado Carlos, por todo apoio, paciência e carinho.

As minhas amigas, Layllana, Lorena, Juliana, Maria e Layla, por me apoiarem e comemorarem comigo cada conquista. Obrigada pelas conversas e orações, vocês tornam minha vida mais leve.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Willian Jonis Andrioli, por sempre me ensinar com muita paciência, dedicação e compreensão. Por me acolher no Laboratório de Produtos Bioativos. Sou muito grata, pois mesmo em meio às dificuldades da pandemia da Covid 19 e por ocupar o cargo de coordenador do curso, continuou me orientando e me dando toda atenção e suporte.

A minha amiga de laboratório Paula, pela companhia e por sempre me ajudar.

À UFRJ/Macaé e a cada professor do curso de farmácia, por toda sabedoria e ensino de forma, sem vocês eu não chegaria até aqui.

À PIBIC-UFRJ pelo apoio através da concessão da bolsa de iniciação científica.

Muito obrigada a todos.

RESUMO

Os produtos naturais possuem muitas substâncias ativas com grande variedade química. Endófitos são micro-organismos que vivem em simbiose com as plantas, sendo capazes de produzir metabólitos secundários de grande diversidade estrutural, com substâncias que podem vir a ser possíveis candidatos a fármacos. Esse trabalho tem como objetivo investigar o potencial químico-biológico do micro-organismo endofítico *Aspergillus sclerotiorum*, associado à *Stachytarpheta schottiana* Schauer (Verbenaceae), espécie vegetal da Restinga de Jurubatiba. Diante disso, o fungo foi inicialmente cultivado em placas de Petri, contendo o meio BDA (Batata Dextrose Ágar), por período de 7 dias a 30 °C. Na pré-fermentação, o fungo foi então incubado em meio líquido de caldo batata dextrose, por 48 horas em um shaker a 120 rpm e 30 °C. Para o cultivo dos micro-organismos, os pré-inóculos foram vertidos no meio fermentativo de arroz. As culturas foram incubadas a 30 °C por 60 dias. Após o processo fermentativo em meio sólido, os metabólitos fúngicos foram extraídos por meio de maceração com etanol. Os extratos etanólicos foram particionados com hexano e acetato de etila. Essas frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e submetidas à separação cromatográfica em coluna (CC). Foram realizados testes de atividade biológica em colaboração com o Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFCE) e Laboratório de Produtos Bioativos (LPBIO) – UFRJ – Campus Macaé, contra as linhagens tumorais PC-3 (câncer de próstata - humano), HCT-116 (câncer de cólon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e HL60 (leucemia promielocítica), utilizando o método MTT. Nos testes para verificação da citotoxicidade, os resultados foram satisfatórios, convém mencionar que as frações em acetato de etila se mostraram mais promissoras em relação ao nível de inibição, com valores de $7,37 \pm 0,27$ e $10,15 \pm 1,00$, para as linhagens SF295 e HCT116, respectivamente. A partir do resultado satisfatório em relação ao potencial citotóxico para todas as linhagens celulares testada, optou-se pela produção de extrato e frações em quantidades maiores, de modo, a possibilitar o isolamento via técnicas cromatográficas, para posterior identificação dos metabólitos via técnicas espectrais e realização de ensaios biológicos.

Palavras-chave: Produtos naturais, micro-organismo endofítico, metabólitos secundários, técnicas cromatográficas.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Distribuição dos fármacos derivados de produtos naturais. Fonte: Adaptado NEWMAN e CRAGG (2020). 13
- Figura 2: Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações. Fonte: Adaptado de Lázaro E. P. Peres (2015). 16
- Figura 3: Estrutura química da penicilina (A) e da ciclosporina (B). Fonte: Adaptado de Silva e Coelho (2006). 17
- Figura 4: Localização da área de estudo no Parque Nacional da restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. 18
- Figura 5: A: O mapa do PNRJ Jurubatiba/ B: Uma das lagoas do Parque Nacional. Fonte: Modificado de João Lara Mesquita (2015). 19
- Figura 6: Espécie vegetal *Stachytarpheta schottiana* Schauer na Restinga de Jurubatiba-RJ (Acervo pessoal). Fonte: Acervo pessoal. 22
- Figura 7: *Aspergillus sclerotiorum*. Conidióforo, conídio e fiálide (a. x102; b. x512; c. x560; d. x840; e. x1600; f. x1150; g. x8900). Fonte: HOOG (2000). 25
- Figura 8: *Aspergillus sclerotiorum*. A-Colônias: fila superior da esquerda para a direita, meios (CYA, MEA, DG18 e OA); inferior da esquerda para a direita, meios (CYA, MEA, DG18 e CREA). B-Escleródios. C-F. Conidióforos. G. Conídio. Fonte: VISAGIE (2014). 25
- Figura 9: Estruturas dos compostos 1-7 isolados de *Aspergillus sclerotiorum*. Fonte: PHAINUFONG et al., (2016). 27
- Figura 10: Distribuição dos fármacos anticancerígenos derivados de produtos naturais lançados no mercado, nos anos de 1981 a 2019. Fonte: Adaptado NEWMAN e CRAGG (2020) 29
- Figura 11: Fungo *Aspergillus sclerotiorum* – SSF3 (meio BDA) 35
- Figura 12: A - Processo pré-fermentativo. B - Tubos Falcon incubados em shaker (48 h; °C; 120 rpm). 35
- Figura 13: Fermentação em meio sólido. A - Primeiro dia do cultivo. B – 7 dias após o cultivo. C – 60 dias após o cultivo. 36
- Figura 14: Processo de extração dos metabólitos com etanol. 37
- Figura 15: A - Partição dos extratos brutos. B - Obtenção das frações em evaporador rotativo. C - Fração em acetato e fração em hexano. 37
- Figura 16: Coluna de exclusão (Sephadex). 42
- Figura 17: Cromatografia em fase normal da fração. 43
- Figura 18: Efeito citotóxico em linhagem tumoral U937 (leucemia de origem linfóide) tratadas com as amostras dos fungos endofíticos da espécie vegetal *Stachytarpheta schottiana*. O

tratamento foi realizado com as amostras na concentração de 100 µg/mL por 48 horas. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados obtidos através do método com MTT. Controle positivo (+), células U937 tratadas com Triton X100 para lise máxima. Controle negativo (-), células U937 sem tratamento. 45

Figura 19: Cromatografias em camada delgada das frações acetato de etila (placas da coluna 1) e hexano (placas coluna 2). Eluente 7:3 (Hex: AcOEt) - (A): Revelação com anisaldeído sulfúrico; (B): Visualização em câmara de luz UV longo (365 nm) e (C) curto (254 nm). 48

Figura 20: Perfil cromatográfico em CLAE - DAD, fração em acetato de etila. (254 nm). 49

Figura 21: Perfil cromatográfico em CG-EM da fração hexânica. 50

Figura 22: (a) Fórmula estrutural do ácido hexadecanóico, vulgarmente conhecido como ácido palmítico; (b) ácido linoleico e (c) oleato de etila. 50

Figura 23: Coluna de exclusão (Sephadex). Eluente: Metanol – (A) Tempo 0 min; (B) Após 30 minutos; (C) Após 50 minutos; (D) Após 1 hora e 50 minutos; (E) Após 3 horas. 52

Figura 24: CCD das 7 frações da 1ª coluna de Sephadex (Da esquerda para direita) - Eluente 6:4 (Hex: AcOEt) - (A): Comprimento curto (254 nm) e (B): Comprimento longo (365 nm). 53

Figura 25: CCD das 10 frações da 2ª coluna de Sephadex (Da esquerda para direita) - Eluente 6:4 (Hex: AcOEt) - Comprimento curto (254 nm). 53

Figura 26: Cromatografia em fase normal da fração FRX. 55

Figura 27: Cromatografia em fase normal das sub-frações da fração FRX. 55

Figura 28: CCD das frações da cromatografia clássica em fase normal - Eluente 7:3 (Hex:AcOEt) - (A): Placa sob UV 254 nm; (B): Placa sob UV 365 nm e (C) Placa revelada com Anisaldeído sulfúrico. 56

Figura 29: CCD das frações da cromatografia clássica em fase normal - Eluente 7:3 (Hex:ACOEt) - (A) Placa sob UV 254 nm; (B) Placa sob UV 365 nm e (C) Placa revelada com Anisaldeído sulfúrico. 56

Figura 30: CCD das frações da cromatografia clássica em fase normal agrupadas - Eluente 7:3 (Hex:ACOEt) - (A) Placa sob UV 254 nm; (B) Placa sob UV 365 nm e (C) Placa revelada com Anisaldeído sulfúrico. 57

Figura 31: Fluxograma do isolamento 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gradiente de eluição de amostra em CLAE - DAD	40
Tabela 2: Tabela contendo as massas das frações de acetato de etila e hexânica do endófito de <i>Aspergillus sclerotiorum</i> .	44
Tabela 3: Ensaio de atividade citotóxica para linhagens tumorais, frações em acetato de etila e hexano do cultivo do endófito <i>Aspergillus sclerotium</i> de <i>Stachytarpheta schottiana</i> .	46
Tabela 4 - Massas das frações reunidas.	54

LISTA DE ABREVIACES

AcOEt - Acetato de Etila

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CG-EM - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

CLAE - DAD - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EM - Espectrmetro de massas

EtOH - Etanol

Hex - Hexano/ Hexânica

IV - Infravermelho

LPBio - Laboratório de Produtos Bioativos

MeOH - lcool metlico

MOs - Micro-organismos

MTT - Brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio

NEQ - Nova entidade química

PN - Produtos naturais

PNRJ - Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

RMN - Ressonância magnética nuclear

Rt - Tempo de retenção

UV - Ultravioleta

UFCE - Universidade Federal do Ceará

UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Produtos naturais	13
1.2	Micro-organismos endofíticos	14
1.3	Metabolismo primário e secundário	16
1.4	Espécies vegetais da Restinga de Jurubatiba	18
1.5	Família Verbenaceae	20
1.6	Gênero <i>Stachytarpheta</i> vahl	21
1.7	Espécie vegetal <i>Stachytarpheta schottiana</i> Schauer	22
1.8	Gênero <i>Aspergillus</i>	23
1.9	Espécie <i>Aspergillus sclerotiorum</i>	25
2.0	Atividade antimicrobiana	29
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVO	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Materiais	33
4.1.1	Equipamentos	33
4.1.2	Solventes, reagentes e meios de cultivo	33
4.1.3	Meios de Cultivo	34
4.1.4	Fases Estacionárias	34
4.1.5	Vidrarias e outros	35
4.2	Cultivo dos fungos	35
4.2.1	Pré- fermentação	35
4.2.2	Fermentação	36
4.2.3	Obtenção dos extratos e das frações fúngicas	37
4.3	Testes de atividade biológica	38
4.4	Avaliação da atividade citotóxica	38
4.4.1	Avaliação da viabilidade/citotoxicidade celular pelo método de MTT	39
4.4.2	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> - Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará	40
4.5	Análises Cromatográficas	40
4.5.1	Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	40

4.5.2	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE - DAD) - DAD- UV	40
4.5.3	Análise em Cromatografia Gasosa (CG)- EM	41
4.5.4	Cromatografia de Exclusão Molecular (Sephadex)	42
4.5.5	Cromatografia Clássica em Fase Normal	43
4.5.6	Cromatográfica em CCD das frações em acetato de etila	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Obtenção das frações orgânicas	45
5.2	Testes para verificação de atividade biológica	45
5.2.1	Avaliação da atividade citotóxica	45
5.2.2	Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT	45
5.2.3	Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> – Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará	47
5.3	Análise cromatográfica – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	48
5.4	Análise cromatográfica-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE - DAD)-DADUV	49
5.5	Análise por Cromatografia gasosa CG-EM	50
5.6	Cromatografia de Exclusão Molecular (Sephadex)	52
5.7	Análise cromatográfica por CCD das frações obtidas no método em gel de exclusão	54
5.8	Cromatografia Clássica em Fase Normal	55
5.9	Análise cromatográfica por CCD das frações obtidas no método de cromatografia em fase normal	57
6	CONCLUSÃO	60
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Produtos naturais

O estudo dos compostos químicos sintetizados pelas plantas tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos e os seus usos como agentes terapêuticos datam de milhares de anos (FOWLER, 2006).

Provavelmente, as primeiras utilizações dos mesmos, como ingestão de folhas e ervas, foram realizadas com propósito de buscar o alívio das dores e cura de doenças (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). No início, os químicos estudavam plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporadas às farmacopeias da época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de substâncias ativas (YUNES e CECHINEL, 2001).

À medida que os avanços da química surgiram, as substâncias ativas puderam ser identificadas, isoladas e usadas como moléculas sinteticamente elaboradas, com atividade terapêutica ainda maior (AURICCHIO; BACCHI, 2003).

Atualmente, a maior parte dos fármacos usados pela indústria farmacêutica, bem como outros compostos naturais provenientes das plantas, apresentam diversas aplicações, tanto na área farmacêutica e cosmética, como também nas áreas das indústrias alimentar e química (BREWER, 2011; GYAWALI; IBRAHIM, 2014).

Os micro-organismos (MOs) estão recebendo atenção especial por parte da indústria e dos pesquisadores em produtos naturais, no decorrer dos anos. Os avanços obtidos no campo da biotecnologia, aliado ao emprego de técnicas modernas de fracionamento químico e elucidação estrutural na busca por novos protótipos bioativos, têm revelado seu enorme potencial em fornecer substâncias ativas e com padrões moleculares novos e originais (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

De acordo com a revisão bibliográfica “Produtos naturais como fontes de novas drogas ao longo de quase quatro décadas, de 01/1981 a 09/2019” realizada por Newman e Cragg, os produtos naturais, e as estruturas derivadas destes, desempenharam e continuam a desempenhar um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos. Os autores analisaram a origem de fármacos desenvolvidos e aprovados entre 1981 a 2019 e concluíram que 38,5% das novas

Entidades Químicas lançadas no mercado apresentavam alguma correlação com produtos naturais. Destes fármacos (Figura 1), 11,2% eram totalmente originários de produtos naturais, 46,4% de derivados semissintéticos, 1,3% de produto natural botânico, 31,7% de derivados miméticos e 9,4% de droga sintética com grupos farmacofóricos de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020).

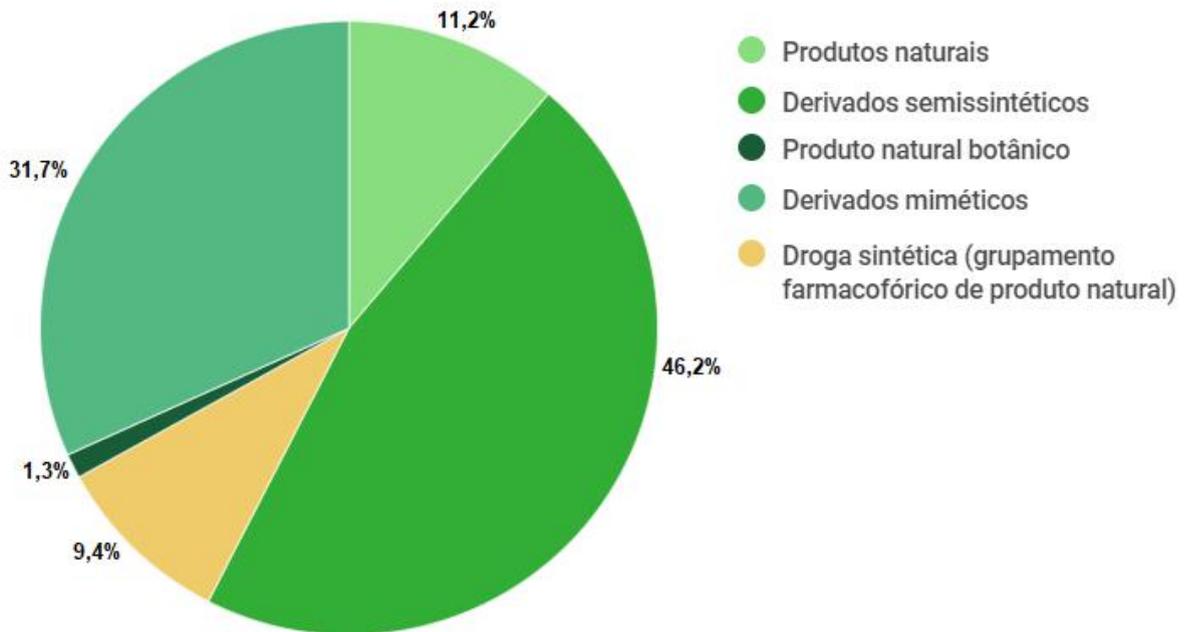


Figura 1: Distribuição dos fármacos derivados de produtos naturais. Fonte: Adaptado NEWMAN e CRAGG (2020).

Dessa forma, os produtos naturais atuam como fontes importantes na obtenção de novos fármacos.

1.2 Micro-organismos endofíticos

O termo 'endofítico' foi originalmente descrito por De Bary em 1866. Os micro-organismos endofíticos são principalmente bactérias e fungos, que habitam no interior das plantas, e diferem dos micro-organismos fitopatogênicos por viverem sem causar aparentemente nenhum dano aos seus hospedeiros. (AZEVEDO, 1998)

Normalmente, a relação estabelecida entre endófitos e plantas é de mutualismo. Eles recebem nutrientes e proteção, e em troca tornam a planta mais competitiva em ambientes de estresse (PEIXOTO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Estudos têm demonstrado que, em muitos casos, existe uma importante interação simbiótica do micro-organismo endofítico com o seu hospedeiro, a qual envolve a produção de compostos que diminuem a herbivoria sobre os tecidos vegetais ou conferem resistência a fitopatógenos, além da produção de fitorreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal (PEIXOTO; AZEVEDO; CAETANO, 2004).

Por estarem em íntima associação com os vegetais, esses micro-organismos são considerados fonte de grande potencial biotecnológico ainda não totalmente conhecido. Entre as possíveis aplicações biotecnológicas dos produtos naturais provenientes desses micro-organismos estão a utilização em medicina, indústria farmacêutica e agricultura (STROBEL; DAISY, 2003).

Algumas plantas produzem os mesmos produtos bioativos naturais que seus endófitos (TAN; ZOU, 2001). Isso se deve ao fato dos endófitos terem se adaptado aos seus microambientes pela variação genética gradual, absorvendo alguns segmentos de DNA de planta para o seu próprio genoma, bem como inserindo segmentos de seu DNA no genoma hospedeiro (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993.) Essa troca de material genético é denominada “transferência genética horizontal” (BROWN, 2003), e a seleção natural pode ter favorecido a evolução de linhagens endofíticas benéficas (SAIKKONEN et al., 2004). Um exemplo desse fenômeno, é o endófito *Taxomyces andreanae* isolado a partir de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) conhecida como teixo do Pacífico, que é capaz de produzir o complexo diterpenoide taxol, utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Estudos com o intuito de avaliar a atividade biológica de micro-organismos endofíticos, a fim de se obter novos compostos bioativos vêm sendo conduzidos e resultados muito promissores têm sido alcançados (CHANG., 2016; FELIPHE, 2015; FUCHS; KRAUSS, 2018; KUMAR., 2013; SEBASTIANES; LACAVA; AZEVEDO, 2013, 2014; LOPES, 2008; RATH; MITCHELL; GOLD, 2018).

Neste contexto, os fungos endofíticos apresentam-se como uma fonte alternativa para a produção de novos agentes bioativos (FERNANDES et al., 2009).

1.3 Metabolismo primário e secundário

Todos os seres vivos, animais e vegetais, possuem um metabolismo geral comum designado metabolismo primário. O metabolismo primário tem como objetivo a síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies (DE SOUZA, 2010).

Os metabólitos secundários, por sua vez, desempenham um importante papel como moléculas de defesa. Eles têm origem no processo de conversão da energia luminosa em energia química, permitindo que a planta responda aos diferentes fatores ambientais, quer físicos, quer biológicos, permitindo comunicar e interagir com diferentes organismos, ou seja, eles agem principalmente como moléculas de adaptação, auxiliando na sobrevivência dos organismos produtores (PERES; CASTRO, 2005; MARASCHIN; VERPOORTE, 1999).

Assim como as plantas, os micro-organismos também possuem metabolismo primário, relacionado ao funcionamento e crescimento; e secundário, relacionado com a produção de substâncias específicas de diversas classes químicas (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Biólogos e fisiologistas usam alguns metabólitos secundários como ferramentas experimentais para modular funções celulares. Além disso, seu estudo está presente no campo da microbiologia e da farmácia na forma de antibióticos contra patógenos e parasitas (FIRN; JONES, 2003).

Os fungos endofíticos que já foram investigados química e biologicamente são excelentes produtores de metabólitos secundários com significativa diversidade química e atividade biológica (TAN; ZOU, 2001). Entre os grupos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos podemos citar terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (Figura 2).

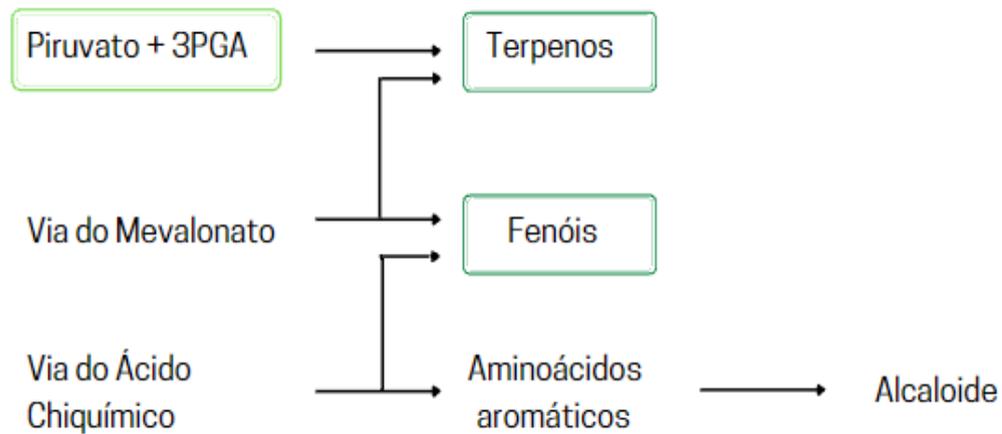


Figura 2: Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações. Fonte: Adaptado de Lázaro E. P. Peres (2015).

Os terpenos são feitos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Por fim, os alcaloides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e, também, de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). (PERES, 2015).

Alguns eventos importantes no estudo de metabólitos secundários de fungos foram o desenvolvimento de antibióticos como por exemplo a penicilina (Figura 3.A) a qual foi descoberta em 1928 sendo sintetizada por uma espécie de *Penicillium* (na época identificada como *P. chrysogenum*, mas hoje, por meio de análises moleculares, sabe-se que é *P. rubens*) (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2011) e a ciclosporina (Figura 3.B), um imunossupressor utilizado em pessoas transplantadas. A ciclosporina foi primeiramente isolada por volta de 1970 a partir dos fungos de solo *Tolypocladium inflatum* e *Cylindrocarpon lucidum* (SILVA; COELHO, 2006).

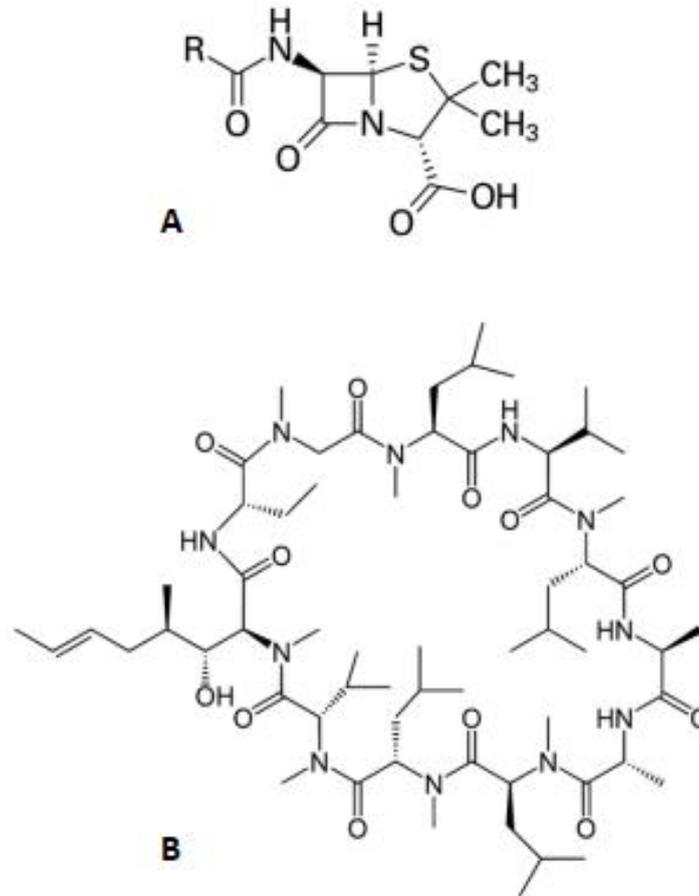


Figura 3: Estrutura química da penicilina (A) e da ciclosporina (B). Fonte: Adaptado de Silva e Coelho (2006).

1.4 Espécies vegetais da Restinga de Jurubatiba

A restinga brasileira é um conjunto de ecossistemas costeiros com comunidades florística e fisionomicamente distintas, as quais colonizam terrenos arenosos de origens muito variadas, e ocupam locais tão diversos como praias, dunas e depressões associadas, cordões arenosos, terraços e planícies (FALKENBERG, 1999).

As restingas recobrem cerca de 79% da costa brasileira (LACERDA et al., 1993), onde se estendem desde estreitas até extensas faixas de areia, como no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro (MARTIN et al., 1993). O bioma de restinga possui uma vegetação característica devido a uma combinação de fatores físicos e químicos destas regiões, tais como elevadas temperaturas, salinidade e alta exposição à luminosidade (ORMOND 1960, FRANCO et al., 1984). Todos esses

fatores propiciam a produção de metabólitos secundários pelas espécies vegetais e micro-organismos existentes nas mesmas.

O Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PNRJ), foi criado em 29 de abril de 1998 e constitui-se de uma unidade de conservação federal, com objetivo de salvaguardar a biodiversidade de fauna e flora local, para fins científicos, educacionais, paisagísticos e recreativos (ARAÚJO; MACIEL, 1998). Assim como, foi o primeiro Parque Nacional no Brasil a compreender exclusivamente o ecossistema de restinga, além disso é a área de restinga mais bem preservada do país (ROCHA., 2004).

O PNRJ localizado no nordeste do estado do Rio de Janeiro, representa a maior área de restinga do Estado do Rio de Janeiro (Figura 4), e abriga uma das 12 áreas do Programa Brasileiro de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração (PELD/MCT-CNPq) (IMBASSAHY; COSTA; ARAÚJO, 2009).

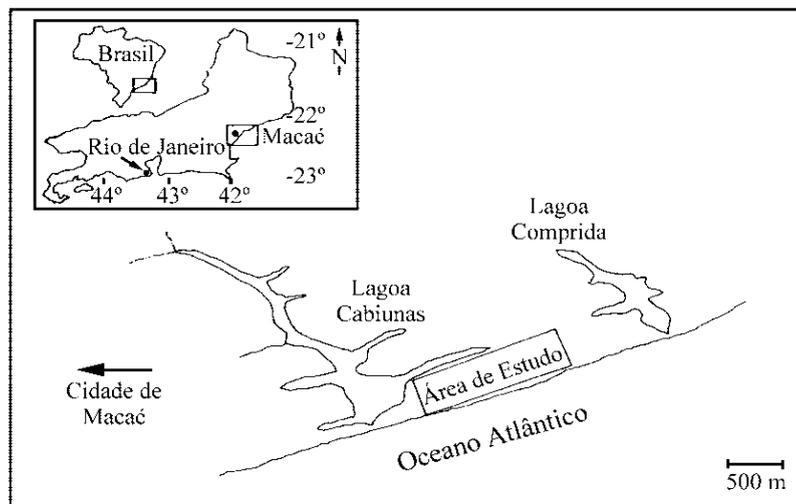


Figura 4: Localização da área de estudo no Parque Nacional da restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. Fonte: Modificado de Petrucio & Faria (1998).

O Parque Nacional, conta com uma área litorânea de 14.860 hectares (Figura 5), abrangendo os municípios de Quissamã (65%), Carapebus (34%) e Macaé (1%) (VAINER, 2010). Além disso, possui uma faixa de areia de 44 km, com grande número de lagoas costeiras (SANTOS, 2008).



Figura 5: A: O mapa do PNRJ Jurubatiba/ B: Uma das lagoas do Parque Nacional. Fonte: Modificado de João Lara Mesquita (2015).

1.5 Família Verbenaceae

A família Verbenaceae reúne 34 gêneros e cerca de 1.200 espécies amplamente distribuídas na Região Neotropical, com poucos representantes na Europa, Ásia, África e Madagascar (ATKINS 2004).

As espécies de Verbenaceae apresentam grande diversidade de hábitos, desde herbáceo até arbóreo, sendo mais frequentes espécies arbustivas, e mais raramente lianas (ATKINS 2004; MARX, 2010); possuem ramos cilíndricos ou tetragonais e fruto do tipo drupa ou esquizocarpo (ATKINS 2004).

O Brasil constitui um importante centro de diversidade da família, onde são conhecidos 16 gêneros e 276 espécies. Os gêneros mais representativos na flora brasileira são *Lippia* L. e *Stachytarpheta* Vahl. (ATKINS, 2004, 2005). Ambos encontrados com maior riqueza nos cerrados e campos rupestres do Planalto Central e Cadeia do Espinhaço (SALIMENA 2014).

As espécies de Verbenaceae têm seu potencial econômico amplamente explorado, tanto como ornamentais, quanto terapêuticas, devido aos diferentes usos dos óleos essenciais, sendo de grande importância na medicina popular, na preparação de alimentos e no fornecimento de substratos para as indústrias de fármacos e de cosméticos. (LORENZI; SOUZA 2001; PASCUAL, 2001; STASHENKO, 2003). Muitos estudos atestam atividades analgésicas, antiespasmódicas, calmantes, sedativas, citostáticas, antimicrobianas, antitumorais, hepatoprotetoras, anti-inflamatórias e laxativas de algumas de suas espécies (STEFANINI et al., 2002).

1.6 Gênero *Stachytarpheta* vahl

Stachytarpheta foi descrita e publicada pela primeira vez por Vahl (1804) com 12 espécies, que passou desde então por diversas modificações da composição do gênero *Stachytarpheta* de acordo com os principais tratamentos taxonômicos. Em 1847, Schauer teve acesso a muitas coleções do Brasil, com isso ele propôs uma nova classificação para *Stachytarpheta*, com 43 espécies, das quais 34 foram descritas com ocorrência no Brasil, sendo 16 inéditas, dentre elas, *Stachytarpheta schottiana* Schauer (ATKINS, 2005).

O gênero *Stachytarpheta* (Verbenaceae), pode ser encontrada em vegetação de campo rochoso aberto em altitudes acima de 800 m, que é considerado um *hotspot* de preservação (BARRETO; SANTOS; GARCIA, 2016), sendo frequentemente encontrado em ambientes úmidos e sombreados (ATKINS, 2005).

No Brasil são encontradas 82 espécies, das quais 75 são endêmicas, principalmente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás. (BFG 2015). Por conta do alto grau de endemismo, estes estados têm sido o destino de muitas expedições botânicas (GIULIETTI et al., 1987; GIULIETTI; PIRANI, 1988, 1997; HARLEY, SIMMONS, 1986; ZAPPI, 2003).

A forma mais comum no gênero é um arbusto ou subarbusto ramificado, normalmente de 1 a 1,5 m de altura. Suas flores ficam arranjadas de forma espiralada ao longo do eixo da inflorescência de maneira muito compacta, atingindo até 60 cm de comprimento. Apresentam corolas bastante vistosas e facilmente localizadas à distância no campo, sendo comumente azuis. (GIULIETTI 1998; ATKINS 2005).

Muitas espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular para tratamento de alergias, tosse, resfriado, febre, prisão de ventre, complicações digestivas, além de apresentar atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica, antipirética, hipolipemiante e hepatoprotetora. No entanto, em relação às pesquisas científicas algumas espécies foram estudadas quimicamente e relataram a ocorrência de diversos metabólitos secundários. (ATKINS, 2005).

Na espécie *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl conhecida como gervão-azul, estudos demonstraram extensivamente que essas plantas medicinais contêm metabólitos secundários e relataram seu papel em várias propriedades medicinais, incluindo analgésica, antidiarreica, antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva,

antinociceptiva, antifúngica, hipolipemiante e anti-inflamatória. Existem vários grupos principais de metabólitos secundários que estão presentes na planta, incluindo alcaloides, flavonoides, fenóis, esteroides e terpenoides. Esses compostos bioativos podem ser encontrados em abundância em todas as partes da planta. (LIEW e YONG, 2016).

A atividade antifúngica de *S. jamaicensis* foi avaliada contra fungos isolados usando o bioensaio de difusão em ágar. Os resultados revelaram que o extrato de éter de petróleo de *S. jamaicensis* exibiu sua atividade fungicida contra dois dos fungos testados, a saber, *Curvularia* sp. e *Penicillium* sp. Por outro lado, o extrato metanólico mostrou eficácia contra *Curvularia* sp., *Penicillium* sp. E *Fusarium* sp. (THOMAS et al., 2013).

Na atividade antimicrobiana do extrato da folha de *S. jamaicensis*, os resultados sugerem que o extrato aquoso de *S. jamaicensis* (L.) Vahl inibe o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella aerogenes* e *Proteus mirabilis*. Já o extrato etanólico de *S. jamaicensis* (L.) Vahl apresentou atividade sobre *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* (IDU et al., 2007).

No caso da *Stachytarpheta cayennensis* Vahl conhecida como gervão-roxo, por exemplo, tem sido utilizada na medicina tradicional como anti-inflamatória, analgésica, antipirética, hepatoprotetora, laxante e no tratamento de distúrbios gástricos (MATTHIAS; EMILY, 1993; VELA, 2004). A aplicação de folhas e raízes trituradas também é usada no tratamento de lesões de pele (CARIBE e CAMPOS, 1991) inclusive, em lesões ulceradas causadas por *Leishmania* sp. (MOREIRA et al., 2002).

1.7 Espécie vegetal *Stachytarpheta schottiana* Schauer

A espécie *S. schottiana* (Figura 6), conhecida popularmente como gervão-da-praia possui distribuição geográfica, com ocorrência, no sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro), possui domínios fitogeográficos em Mata Atlântica e tipo de vegetação restinga (FORZZA, 2010; SALIMENA, 2015). A espécie é encontrada na Restinga de Jurubatiba e suas raízes são utilizadas na medicina popular para tratamentos de diabetes (SANTOS et al. 2009), fígado e de verminoses (BOSCOLO;

SENNA, 2008). Estudos realizados no LPBio com a espécie *S. schottiana*, apresentou, mostraram que a espécie possui atividade antioxidante (ARAUJO et al., 2021), vasodilatadora, anti-inflamatória, leishmanicida e anti-hipertensiva (DE SOUZA, M. N. R. 2019).

S. schottiana Schauer possui arbusto com cerca de 1 metro de altura, dicotomicamente ramificado; ramos tetragonais. Folhas pecioladas, elípticas a ovaladas, agudas a obtusas no ápice, glabras, subcoriáceas. Flores com corola lilás (ATKINS, 2005; SALIMENA, 2015).



Figura 6: Espécie vegetal *Stachytarpheta schottiana* Schauer na Restinga de Jurubatiba-RJ (Acervo pessoal). Fonte: Acervo pessoal.

1.8 Gênero *Aspergillus*

Os micro-organismos, em especial fungos, constituem uma parte importante da biomassa do solo, processos como agregação do solo, decomposição de resíduos orgânicos, mineralização de nutrientes, estabelecimento de relações simbióticas e controle de pragas e doenças são realizados com a participação efetiva dos fungos (MONTEIRO, 2012). Esses micro-organismos produzem variadas micromoléculas bioativas, algumas com elevada toxidez, conhecidas como micotoxinas, nocivas para a saúde humana e animal (PINTO et al., 2002). Em contrapartida, algumas espécies desse gênero são utilizadas em biotecnologia, sendo fontes de diversas enzimas, produtoras de diversos compostos interessantes, dentre estes destacam-se a produção de compostos orgânicos e antibióticos (MONTEIRO, 2012).

O gênero *Aspergillus* foi descrito pela primeira vez em 1729 por Micheli, um sacerdote e biólogo italiano que foi a primeira pessoa a tentar o estudo científico de

fungos. Em 1926, os autores Tom e Church, publicaram a primeira monografia sobre o gênero, a partir disso as espécies pertencentes a esse gênero ficaram cada vez mais conhecidas (DAMBROS, 2015). Uma descrição completa sobre o gênero foi realizada por Raper e Fennel em 1965, onde foi reconhecido cerca de 132 espécies e 18 variedades, comumente encontradas em solo, matérias orgânicas em decomposição, grãos estocados, alimentos, rações e outros. Atualmente o gênero *Aspergillus* compreende mais de 260 espécies (BENNETT, 2010; GEISER, 2007).

Entre os fungos filamentosos, *Aspergillus* representa um grande gênero (MEYER, 2008), sendo considerado cosmopolita e amplamente distribuído na natureza, possuindo uma abundância maior nas regiões de climas tropicais e subtropicais (KLICH, 2002).

O *Aspergillus* sp. possui reprodução assexuada e por isso, produz esporos assexuais, chamados de conídios (células haploides, geneticamente semelhantes aos progenitores). As fiálides, são células especializadas em produzir conídios. Sua forma de reprodução é de esporulação, em que os corpos de frutificação sintetizam por mitose células abundantes, que na fase adulta são disseminadas pelo meio (CHALFOUN; BATISTA, 2003; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Em relação à morfologia do gênero, as colônias apresentam uma ampla variação na coloração, sendo então principal característica macroscópica utilizada para classificação, são encontradas colônias com coloração em tons de verde, amarelo, cinza, marrons, preto e branco (KLICH, 2002; VARGA, 2004).

Algumas espécies do gênero *Aspergillus* têm uma longa história como fábricas de células para produção de enzimas com aplicações em bioetanol, papel e celulose, têxteis, indústrias alimentícias e na produção de medicamentos (MEYER, 2008). Dentre elas destacam-se *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*.

Várias espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir L-asparaginase, que é um composto utilizado no tratamento da doença de Hodgkin e leucemia (VARALAKSHMI, RAJU, 2013). Além disso, foi relatada a produção de altos níveis de L-asparaginase através de *Aspergillus niger* em fermentação de estado sólido (MISHRA, 2006).

Em 2009, dois novos alcaloides, 9-desacetilfumigaclavina C e 9-desacetoxifumigaclavina C, foram identificados a partir de *Aspergillus fumigatus* (Ge et al., 2009). Quando esses compostos foram testados quanto às suas atividades citotóxicas contra linhagem celular tumoral humana de carcinoma

epidermoide de boca (KB), leucemia mieloide crônica (K-562) e linhagem tumoral mamária (MCF-7), elas exibiram inibição seletiva para células K-562 com valores de IC_{50} variando de $41 \pm 4,6$ a $3,1 \pm 0,9$ μM para 9-desacetilfumigaclavina C e 9-desacetoxifumigaclavina C, respectivamente. Especialmente a atividade de 9-desacetilfumigaclavina C foi relatada como muito próximo ao do cloridrato de doxorrubicina ($1,2 \pm 0,2$ μM), que atualmente está sendo prescrito para o tratamento da leucemia (NADUMANE, 2016).

1.9 Espécie *Aspergillus sclerotiorum*

A espécie, *Aspergillus sclerotiorum*, encontra-se no gênero *Aspergillus*, subgênero *Circumdati*, seção *Circumdati*. Foi descrito primeiramente por Huber em 1933 (HUBER, 1933). Posteriormente, Raper e Fennell (1965) fizeram um tratamento taxonômico da seção *Circumdati*, e o incluíram na categoria (VISAGIE, 2014).

Aspergillus sclerotiorum (Figuras 7 e 8) possui vesícula globosa, conídio é globoso a subgloboso, e produz escleródios. Há relatos da espécie produzir: aspergamida, ácido penicílico, asperidina, aspocracina, ciclopenol, pouca ocratoxina A, xantomegnina e outros. (FRISVAD et al., 2004; KANG, 2007; VISAGIE, 2014).

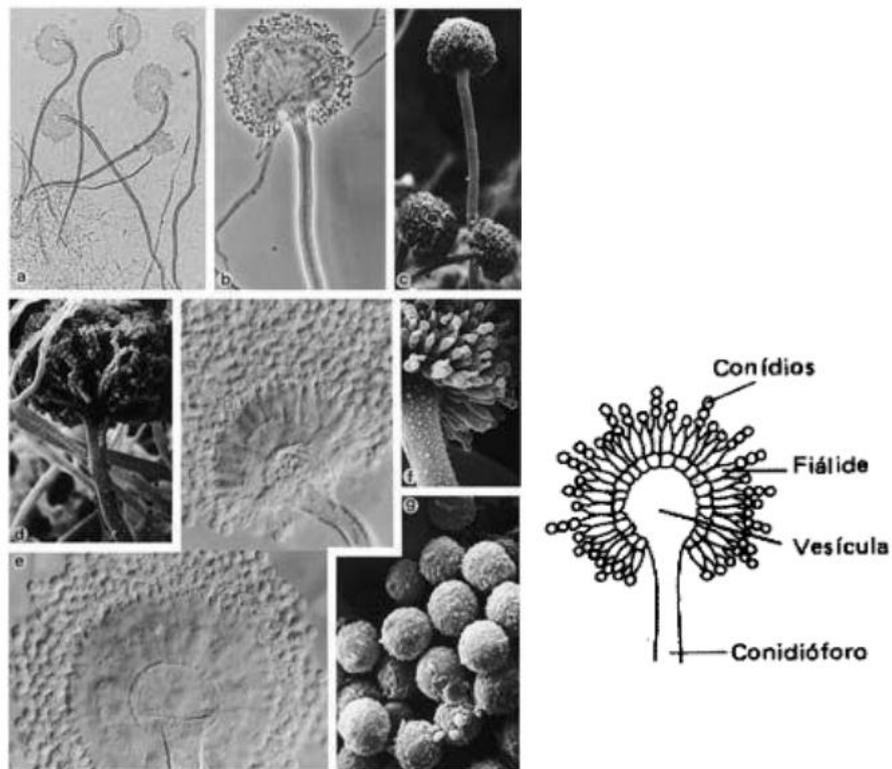


Figura 7: *Aspergillus sclerotiorum*. Conidióforo, conídio e fiálide. Fonte: HOOG (2000).

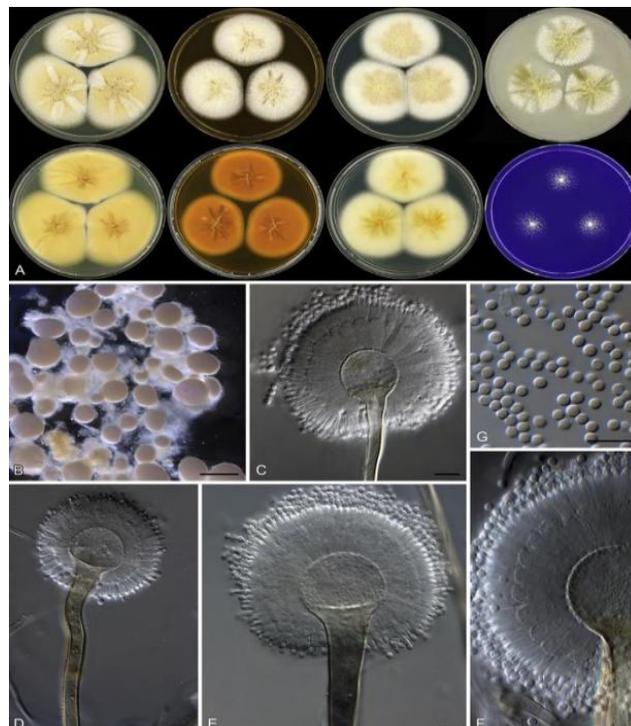


Figura 8: *Aspergillus sclerotiorum*. A-Colônias: fila superior da esquerda para a direita, meios (CYA, MEA, DG18 e OA); inferior da esquerda para a direita, meios (CYA, MEA, DG18 e CREA). B-Escleródios. C-F. Conidióforos. G. Conídio. Fonte: VISAGIE (2014).

Nos últimos anos os fungos do gênero *Aspergillus* foram reconhecidos como abundantes fontes de novos metabólitos secundários bioativos. A partir disso, novos metabólitos foram isolados da espécie *Aspergillus Sclerotiorum*, dentre eles: Derivados de aspocracina, análogos de lovastatinas, butenolídeos, ciclopeptídeos, ácidos hidroxâmicos, ocratoxina, ácido penicílico, ácido dihidropenicílico e asperidina (MA et al., 2019). Alguns deles exibiram atividades biológicas interessantes, como atividade citotóxica contra linhagem celular HepG2 (hepatocarcinoma humano), atividade inibitória de HMG-CoA redutase e atividade antiproliferativa contra linhagem celular H460 (carcinoma de pulmão) (PHAINUPHONG et al., 2018).

Em 2021, um estudo foi realizado a fim de avaliar o efeito inibitório na atividade espasmódica do derivado pirrolidina, asperidina B, isolado do fungo *Aspergillus sclerotiorum*. Os resultados apontaram que a asperidina B possui atividades antiespasmódicas mediadas predominantemente pelo bloqueio do canal de Ca^{2+} tipo L e dos canais de K^{+} . Além disso, seu mecanismo antiespasmódico também está associado a receptores colinérgicos, provavelmente por inibir o influxo de Ca^{2+} e diminuir o Ca^{2+} intracelular (DUANGJAI, et al., 2021).

Com o objetivo de encontrar novos metabólitos fúngicos bioativos, em 2016 PHAINUPHONG e colaboradores, isolaram e avaliaram metabólitos secundários produzidos por *Aspergillus sclerotiorum*. Como resultado, os extratos brutos de acetato de etila de *Aspergillus sclerotiorum*, apresentaram efeitos antimaláricos (*Plasmodium falciparum*, cepa) e citotóxicos (células tumorais de cavidade oral (KB), células de câncer de mama (MCF-7) e células de fibroblastos de rim de macaco verde (vero-africano)), com valores de IC_{50} de 2,39, 6,70, 11,30 e 5,37 mg/mL para o extrato de acetato de etila em caldo e 3,17, 12,05, 41,19 e 14,73 mg/mL para o extrato de acetato de etila micelial, respectivamente. Uma investigação química dos extratos brutos de acetato de etila levou ao isolamento de três novos análogos de lovastatina (1, 4 e 5) juntamente com quatro derivados conhecidos de lovastatina, a saber, lovastatina (2); alfa, beta-desidrolvastatina (3); beta-desidrodihidromonacolina K (6) e alfa, beta-desidro-4 a,5-dihidromonacolina L (7) (Figura 9). Os compostos isolados 2, 3, 5 e 6 foram avaliados quanto à atividade antibacteriana (*Mycobacterium tuberculosis*, cepa H37Ra), antimalárica (*Plasmodium falciparu*, cepa K1) e citotóxica (células KB, MCF-7 e Vero). Porém apenas os compostos 2, 3 e 5 mostraram atividade citotóxica em relação às células Vero com valores de IC_{50} na faixa de 2,2 a 8,4 μ M. Devido às atividades de redução

do colesterol dos derivados da lovastatina, esses compostos também foram avaliados quanto à atividade da HMG-CoA redutase. O Composto 5 exibiu a atividade mais potente contra a HMG-CoA redutase, com um valor de IC_{50} de 387 μ M. Além disso, o presente estudo indicou a interação direta do composto 5 com a HMG-CoA redutase (PHAINUPHONG et al., 2016).

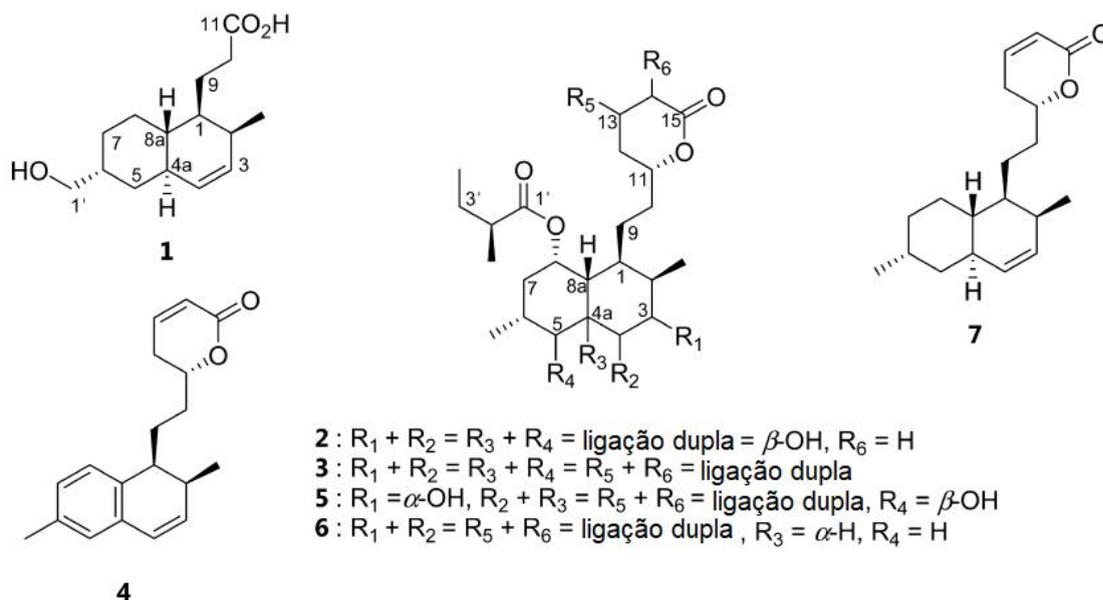


Figura 9: Estruturas dos compostos 1-7 isolados de *Aspergillus sclerotiorum*. Fonte: PHAINUPHONG et al., (2016).

A produção de ácido penicílico por *Aspergillus sclerotiorum* para o biocontrole da doença de *Phytophthora* foi investigada em fermentação submersa usando meios compostos de diferentes nutrientes. Os resultados obtidos demonstraram que o ácido penicílico isolado de *Aspergillus sclerotiorum* tem propriedades antifúngicas contra as espécies de *Phytophthora* (KANG, 2007).

Neste contexto, a espécie *Aspergillus sclerotiorum* pode atuar como fontes importantes de substâncias biologicamente ativas.

2.0 Atividade antimicrobiana

O Câncer compreende um conjunto de doenças que se caracterizam pela presença de células em crescimento contínuo, com propriedades de invasão e destruição do tecido adjacente, bem como, de crescimento em outros sítios diferentes do tumor primário (HANAHAN, et al, 2000). O funcionamento inadequado dos mecanismos de regulação do ciclo celular permite a passagem das células mutadas pelo ciclo, acumulando mutações que contribuem para o surgimento das características do tumor maligno (FOPPA et al. 2015). O câncer afeta a população de um modo geral, incluindo pessoas de ambos os sexos e de todas as idades (NEWMAN; CRAGG, 2005).

Segundo Machado et al. (2010) muitas pesquisas vêm sendo realizadas para a seleção de novas substâncias bioativas com atividade antitumoral, dessa forma busca-se entender os mecanismos moleculares envolvendo o câncer, avaliando a atividade citotóxica de substâncias frente a uma gama de células tumorais. Nas últimas décadas, há uma tendência de busca por essas substâncias em fontes naturais, devido ao aumento da demanda por produtos naturais como uma alternativa aos tratamentos convencionais. (PÉREZ ZAMORA, et al, 2018). Dentre os metabólitos fúngicos com atividade antitumoral, encontra-se: a chaetopiranina (Wang et al., 2006), podofilotoxina (Lu et al., 2009), beauvericina (Wang et al., 2011), altersolanol A (Teiten et al. 2013), entre outros.

Uma proporção importante dos fármacos antitumorais atualmente utilizados em clínica foi obtida a partir de produtos naturais. De acordo com a revisão bibliográfica “Produtos naturais como fontes de novas drogas ao longo de quase quatro décadas, de 01/1981 a 09/2019” realizada por Newman e Cragg, de todos os medicamentos anticâncer lançados no mercado entre 1981 a 2019, 48,6% apresentavam alguma correlação com produtos naturais. Destes fármacos (Figura 10), 15% eram totalmente originários de produtos naturais, 35,8% de derivados semissintéticos, 0,8% de produto natural botânico, 37,4% de derivados miméticos e 11% de droga sintética com grupos farmacofóricos de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2020).

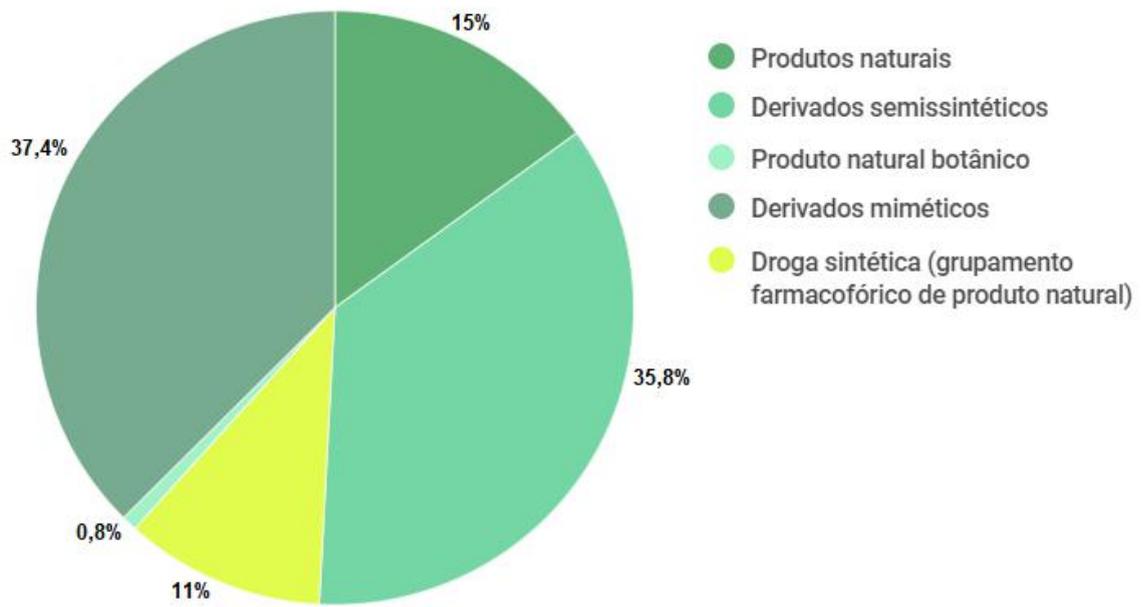


Figura 10: Distribuição dos fármacos anticancerígenos derivados de produtos naturais lançados no mercado, nos anos de 1981 a 2019. Fonte: Adaptado NEWMAN e CRAGG (2020).

Os resultados evidenciam a importância de produtos naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos contra o câncer, que é um dos principais problemas de saúde pública mundial.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, sabe-se que os fungos produzem inúmeros compostos via metabolismo secundário que podem ser utilizados nas indústrias farmacêuticas e na agricultura. Exemplos de classes químicas são os flavonoides, alcaloides, terpenos, isocumarinas, entre outros. Entre eles, há uma imensa gama de compostos desconhecidos, ou compostos que são conhecidos há décadas, dos quais pouco ou nada se sabe sobre sua atividade biológica (FORTKAMP 2018).

Com o surgimento de novas doenças e o crescente desenvolvimento da resistência bacteriana, se faz necessária a pesquisa por compostos químicos capazes de funcionar como alternativa ao combate desses patógenos. Os fungos endofíticos se tornam uma excelente alternativa para a bioprospecção desses compostos, pois possuem grande quantidade de moléculas, variando de estruturas simples a altamente complexas, são excelentes produtores de metabólitos secundários com significativa diversidade química e atividade biológica, além de seu cultivo ser em larga escala não apresentando grandes prejuízos ao ecossistema. Além disso, esses fungos podem produzir metabólitos secundários ativos com diferentes atividades farmacológicas, sendo uma delas a anticancerígena.

Nesse contexto, o presente trabalho visa contribuir com os estudos que vêm sendo conduzidos com as espécies vegetais estudadas no LPBio. Além de colaborar para o conhecimento da relação entre a espécie da planta e do micro-organismo endofítico isolado. Dessa forma, reforçando a linha de pesquisa em produtos naturais microbianos e contribuindo na descoberta de novos metabólitos secundários bioativos, que possam servir de base para o desenvolvimento de agentes terapêuticos.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Investigar o potencial químico-biológico do micro-organismo endofítico *Aspergillus sclerotiorum*, associado à *Stachytarpheta schottiana* Schauer (Verbenaceae), espécie vegetal da Restinga de Jurubatiba.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivo do micro-organismo, em quantidade ampliada de número de cultivos, utilizando fermentação em meio sólido de arroz;
- Obtenção de extrato etanólico e frações orgânicas (hexano e acetato de etila) a partir desses cultivos;
- Avaliação do potencial biológico de extratos e frações em ensaios biológicos;
- Avaliação do perfil cromatográfico via CCD, CLAE - DAD e CG-EM;
- Isolamento via técnicas cromatográficas e elucidação estrutural via técnicas espectrais (RMN, UV, IV e EM);
- Avaliação biológica das substâncias isoladas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Equipamentos

Autoclave Vertical (Prismatec série 9141), balança analítica (Sartorius), geladeira (Consul), estufa (De Leo), Incubadora B.O.D. (Solab – SL- 200), Rotaevaporador (IKA®, BUCHI e Heidolph), câmara de segurança biológica de Classe II (Trox modelo FLV série 506), agitador tipo "shaker" (SOLAB SL – 223), centrífuga (EduTec 80-2B), ultrassom (Ultracleaner 800^a – Unique – Ultrasonic clean), chapa de aquecimento (Fisatom modelo 752A série 1237464) e gabinete para lanterna de emissão de radiação ultravioleta (254nm/365nm) (BOITTON).

O aparelho de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizado foi Shimadzu prominence LC-20A que possui uma bomba quaternária (LC-20AT), um degaseificador (DGU-20A5), forno (CTO-20A), auto-injetor (SIL-20A), detector de arranjos de diodos (SPD-M20A), controlador (CBM-20A) e software LC SOLUTION. O cromatógrafo a gás foi o modelo GCQP2010S Shimadzu equipado com detector de massas (EM) e uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,33 µm) usando hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹).

4.1.2 Solventes, reagentes e meios de cultivo

Metanol (Tedia), acetato de etila (Êxodo), hexano (Tedia), acetona (Chemco), etanol (Tedia), água destilada e água ultrapura (Milli-Q), HCl (Êxodo), acetonitrila (Tedia), dimetilsulfóxido (DMSO), BDA (Himedia), triptona (Himedia), extrato de levedura (KASVI), extrato de malte (KASVI), dextrose (Himedia) e ágar (KASVI).

4.1.3 Meios de Cultivo

Meio Batata Dextrose Ágar (BDA)

Este meio foi utilizado segundo a proporção de 8 g de meio para 160 mL de água destilada. Após preparo, o meio foi autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos.

International Streptomyces Program 2 (ISP2)

Este meio é composto de acordo com a seguinte proporção: 4 g de extrato de levedura, 10 g de extrato de malte, 4 g de dextrose, 22 g de ágar para 1 L de água destilada. Após preparo, o meio foi autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos.

Meio Pré-fermentativo

Composto por triptona 0,5%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 1% e dextrose 1% em água destilada. Após preparo, o meio foi autoclavado a 121 °C e 1 atm por 20 minutos. Este meio foi utilizado, com adição de ágar 0,22%, com fins de armazenamento e repique.

Solução de triptona para meio fermentativo

Aos 90 g de arroz (Tio João), adicionou-se solução de triptona, na proporção de 5,13 g de meio para 285 mL de água destilada. Em seguida o meio foi autoclavado por 40 minutos.

4.1.4 Fases Estacionárias

Sílica de fase normal em placa de revestimento de alumínio (MERCK), Sílica gel (70-230 mesh - G60 – SILICYCLE) e Sephadex LH-20.

4.1.5 Vidrarias e outros

Placas de Petri (20 x 100 mm), frascos de vidro, colunas cromatográficas (diâmetro: 2 cm x altura: 30 cm e altura: 60 cm x diâmetro: 5 cm), tubos de ensaio (16 x 150 mm), cuba cromatográfica (LIPSHAW). Além de vidrarias em diversas dimensões: funil, funil de separação, Erlenmeyer, béquer, bastão de vidro, balão de fundo redondo, pipetas, eppendorf, tubos de transferência e provetas.

Filtros descartáveis 0,45 micras (ALLCROM), seringa 1,0 mL, vials, pipetas automáticas 100-1000 μ L (Labmate Pro) e tubos Falcon (TPP) 50 mL.

4.2 Cultivo dos fungos

4.2.1 Pré-fermentação

O fungo codificado como SSF3 foi cultivado em placas de Petri (Figura 11), em seguida as placas foram mantidas em estufa por período de 7 dias à 30 °C. A partir disso foi realizado o procedimento de pré-fermentação.

Na pré-fermentação, com auxílio de um tubos de transferência foram transferidos plugs (fragmentos de meio com micélio) das placas de petri para 28 tubos Falcon. Cada tubo Falcon continha 15 mL de meio ISP2 (sem a presença de ágar) e três plugs do fungo em questão. Os tubos foram então incubados por 48 horas em um shaker (mesa agitadora) a 120 rpm e 30 °C (Figura 12). Esse procedimento tem por finalidade a obtenção de biomassa para a etapa posterior, a fermentação.



Figura 11: Fungo *Aspergillus sclerotiorum* – SSF3 após 7 dias de incubação a 30 °C.

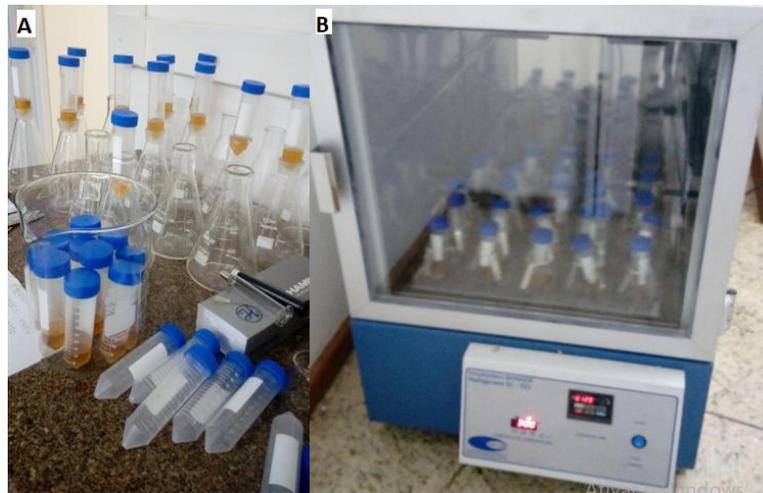


Figura 12: A - Processo pré-fermentativo em tubo falcon. B - Tubos Falcon incubados em shaker (48 h; 30 °C; 120 rpm).

4.2.2 Fermentação

Para o cultivo do fungo foram utilizados 63 Erlenmeyers de 500 mL contendo meio sólido de arroz 90 g de arroz parboilizado - marca “Tio João – Tipo 1” e 100 mL de solução de triptona. Os Erlenmeyers foram autoclavados por 40 minutos e após resfriamento os pré-inóculos foram vertidos no meio fermentativo de arroz. As culturas foram incubadas a 30 °C por 60 dias (Figura 13). O procedimento foi realizado na capela de fluxo laminar (adaptado de GUIMARÃES, 2010).

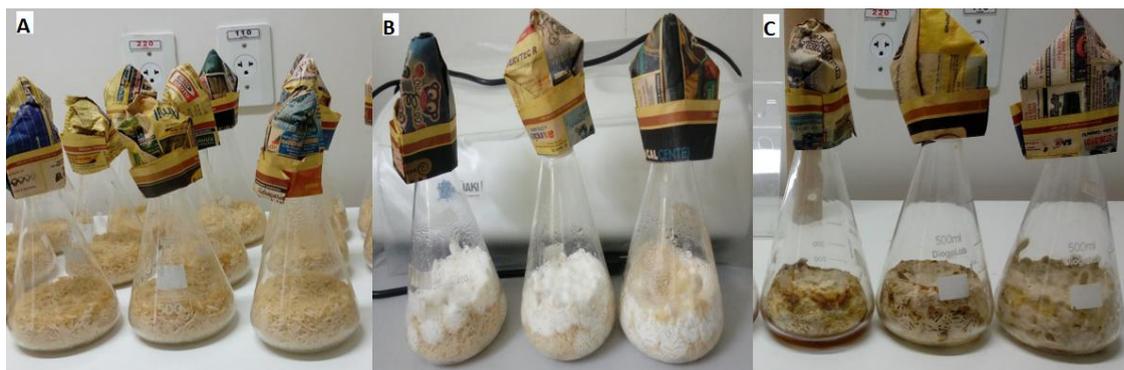


Figura 13: Fermentação em meio sólido. A - Primeiro dia do cultivo. B – 7 dias após o cultivo. C – 60 dias após o cultivo, a 30 °C.

4.2.3 Obtenção dos extratos e das frações fúngicas

Após o processo fermentativo em meio sólido (60 dias), os metabólitos fúngicos foram extraídos por meio de maceração com etanol. A solução extratora de etanol foi adicionada até submersão total das culturas e em seguida as mesmas foram mantidas em maceração por 48 horas (Figura 14). Posteriormente, os extratos etanólicos foram filtrados para remoção de resíduos insolúveis e da massa micelial residual. A solução extrativa de etanol foi concentrada sob evaporação rotativa (600 mmHg; tempo: 50 - 55 °C) de forma a obter o extrato etanólico bruto (adaptado de GUIMARÃES, 2010).

Os extratos etanólicos brutos foram solubilizados em 100 mL de metanol:água (1:9) e particionados com hexano (cinco partições de 150 mL cada) e acetato de etila (cinco partições de 200 mL cada) (Figura 15). Após concentração dos solventes, foram obtidas as frações hexânica, acetato de etila e aquosa. As duas primeiras foram depositadas em frascos de vidro, previamente tarados. Após secagem total, suas massas foram obtidas por meio de pesagem em balança analítica. Posteriormente, a fração aquosa foi descartada. (adaptado de GUIMARÃES, 2010).



Figura 14: Processo de maceração dos metabólitos com etanol.



Figura 15: A - Partição dos extratos brutos. B - Obtenção das frações em evaporador rotativo. C - Fração em acetato e fração em hexano.

4.3 Testes de atividade biológica

Para avaliar o potencial biológico, 5 mg de cada fração (hexano e acetato de etila) foram separados em eppendorf. Os testes realizados foram:

4.4 Avaliação da atividade citotóxica

As frações obtidas a partir das culturas microbianas foram avaliadas quanto a seu potencial citotóxico em colaboração com o Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará (UFCE) e Laboratório de Produtos Bioativos (LPBIO) – UFRJ – Campus Macaé.

4.4.1 Avaliação da viabilidade/citotoxicidade celular pelo método de MTT

O Método MTT é atualmente considerado um teste quantitativo preciso, fácil de ser realizado, sensível, rápido e de baixo custo, sendo frequentemente usado para avaliar a viabilidade celular (MOSMANN, 1983; et al; VAN et al., 2011).

Em 1983, Mosmann propôs um teste colorimétrico quantitativo para a avaliação da sobrevivência das células de mamíferos e da proliferação celular. Esse ensaio é baseado na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais das células vivas e metabolicamente ativas, converterem a solução aquosa de cor amarela do substrato MTT ([3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio]), no sal formazan, formado por cristais, com uma coloração azul-escuro/roxo, insolúveis em água. A quantidade de sal formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983).

A metodologia utilizada no LPBIO para avaliação da viabilidade celular pelo método MTT consistiu na seguinte técnica: as células U937 (leucemia de origem mieloide) foram cultivadas em meio D-MEM F12 (GIBCO, BRL) suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (GIBCO, BRL) e 10% de soro fetal bovino (GIBCO, BRL). As culturas foram repicadas a cada 2 dias e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada.

Logo após o tratamento das células tumorais com as amostras, a viabilidade celular foi determinada através do ensaio colorimétrico em microplaca utilizando MTT. As células foram incubadas por 48 horas com as amostras e, após o tempo determinado, foram adicionados 10 µL de MTT (Sigma, 5 mg/mL) em cada poço da placa. As placas foram mantidas na estufa por 3 horas. Seguinte a esse período, o sobrenadante de cada poço foi retirado cuidadosamente (para não retirar as células) e, em seguida, adicionados 100 µL de uma solução de 120 µL de HCl + 80 mL de isopropanol, homogeneizando até a completa dissolução dos cristais de sal formados. A placa contendo os poços foi lida em espectrofotômetro (Multiskan-EX) utilizando o comprimento de onda de 570 nm.

4.4.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* - Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará

As linhagens tumorais utilizadas, PC-3 (câncer de próstata - humano), HCT-116 (câncer de cólon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e HL60 (leucemia promielocítica) foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), sendo cultivadas em meio RPMI 1640, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram diluídas em DMSO estéril e testadas em concentrações variando de 0.01 a 25 µg/mL. A viabilidade celular foi determinada através do ensaio colorimétrico em microplaca utilizando MTT, assim como descrito no item 4.4.1.

Os experimentos foram analisados segundo a média ± erro padrão da média da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism*.

4.5 Análises Cromatográficas

4.5.1 Análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Nesta etapa, realizou-se uma avaliação preliminar do perfil químico das frações em hexano e em acetato de etila, esta análise foi desenvolvida por meio de cromatografia em camada delgada (CCD). Para a fração em acetato de etila utilizou-se a fase móvel 7:3 (Hex/AcOEt), e hexânica, a fase móvel 8:2 (Hex/AcOEt), posteriormente as placas foram observadas em câmara sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm. Por último, as placas foram reveladas utilizando anisaldeído sulfúrico.

4.5.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE - DAD

A fração em acetato de etila obtida a partir da cultura fúngica teve seu perfil químico analisado em CLAE - DAD.

Preparo da Amostra: através do valor obtido na pesagem da fração fizeram-se cálculos para obter um volume respectivo de concentração para uso no CLAE - DAD, devendo a amostra estar a uma concentração de 1 mg/mL. A fração obtida, foi

adicionado 1 mL de metanol, sendo transferido para um eppendorf apenas o volume determinado pelos cálculos para ajustar a concentração. Em seguida, secou-se o solvente contido no eppendorf e adicionou-se 1 mL de solução de água: acetonitrila (8:2 - v/v), o qual foi, posteriormente, transferido para um *vial* para análise por CLAE - DAD.

Condições para a CLAE - DAD: A coluna utilizada no método foi a coluna Luna C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm; 100 Å), CH₃CN-H₂O fase móvel gradiente (vazão 1 mL.min⁻¹; detecção λ=254 nm). A temperatura do forno e da célula foi configurada para 30 °C e o volume de injeção da amostra igual a 20 µL. As condições do gradiente de eluição são mostradas na tabela 1.

Tabela 1 - Gradiente de eluição de amostra para análise de perfil químico em CLAE - DAD

Tempo (min)	Concentração de Acetonitrila (%)
0.01	15
15	35
20	100
23	100
24	15
30	15
30.01	----

*As condições do DAD faziam uma varredura de 190-800 nm

4.5.3 Análise em Cromatografia Gasosa (CG)-EM

A fração em hexano obtida a partir da cultura fúngica teve seu perfil químico analisado em CG-EM.

Preparo da Amostra: Através do valor obtido na pesagem da fração fizeram-se cálculos para obter um volume respectivo para determinada concentração para uso no CG-EM, devendo a amostra estar a uma concentração de 1 mg/mL. A fração obtida da cultura, foi adicionado 1 mL de hexano, sendo transferido para um eppendorf apenas o volume determinado pelos cálculos para ajustar a concentração. Em seguida, secou-se o solvente contido no eppendorf e adicionou-se 1 mL de hexano, que posteriormente foi transferido para um *vial* para análise por CG-EM.

Condições para a CG-EM: Análises por cromatografia gasosa foram desenvolvidas por cromatógrafo gasoso, modelo GCMS-QP2010S Shimadzu equipado com detector de massas (EM) e uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,33 μm) usando hélio como gás de arraste (1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$). A temperatura do injetor foi de 220 $^{\circ}\text{C}$ e a do forno da coluna foi programada para intervalo de 60 – 246 $^{\circ}\text{C}$ na razão de 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. A temperatura da linha de transferência foi de 240 $^{\circ}\text{C}$, fonte de íons à 220 $^{\circ}\text{C}$, IEEM, 70 eV. Os constituintes da amostra analisada foram comparados aos índices de retenção em cromatografia gasosa e padrão de fragmentação em EM de uma solução padrão de n-alcanos (C7 – C26).

4.5.4 Cromatografia de Exclusão Molecular (Sephadex)

A cromatografia de exclusão molecular (Sephadex) é uma técnica de separação, na qual as moléculas são separadas de acordo com seu tamanho molecular. A matriz cromatográfica é porosa e atua como uma peneira molecular dentro de uma coluna hermética contendo o eluente, que passa através da coluna e da matriz por gravidade ou por bombeamento. A matriz mais comumente utilizada é um polímero gelatinoso denominado Sephadex. Os grânulos da matriz, por serem porosos, permitem que moléculas minúsculas passem livremente, tanto internamente (através dos poros) como externamente a eles. Assim, as moléculas que são transportadas pela solução aquosa fluindo externamente aos grânulos (fase móvel) fluem através da coluna mais rapidamente que as moléculas menores que tomam muito mais tempo dentro da fase estacionária, ou seja, na solução aquosa imóvel dentro dos grânulos da matriz. (MACHADO et al., 1993.)

Para este processo, inicialmente, separou-se em um béquer de 100 mL, a fração AcOEt. Em seguida, a amostra foi dissolvida em 30 mL de metanol e filtrada em algodão. O filtrado foi reservado enquanto o preenchimento da coluna (diâmetro: 5 cm; altura: 60 cm) era realizado. O empacotamento da coluna cromatográfica compreendeu as seguintes etapas: a coluna foi fixada a um suporte universal; em seguida, um pedaço de algodão foi inserido na porção próxima à torneira da mesma e 500 g de gel Sephadex LH-20 foram adicionados a 500 mL de MeOH. Essa mistura foi transferida para a coluna e aguardou-se um período para que o gel se acomodasse à mesma.

Em seguida, passou-se o eluente puro (MeOH) através da coluna antes da introdução da amostra. Logo em seguida, a amostra foi adicionada com auxílio de uma pipeta volumétrica de 10 mL e a coluna passou a ser alimentada com MeOH.

Posteriormente, as bandas características (Figura 16) foram recolhidas de forma fracionada em tubos de ensaio e em seguida foram reunidas seguindo o perfil químico demonstrado através de CCD. Por fim, as amostras foram transferidas para frascos de vidro previamente tarados e suas massas foram obtidas por meio de pesagem em balança analítica.

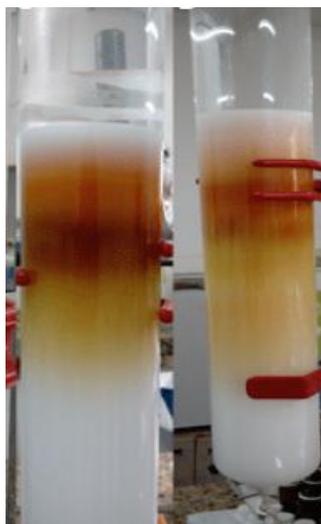


Figura 16: Coluna em coluna da fração em acetato em fase estacionária Sephadex.

4.5.5 Cromatografia Clássica em Fase Normal

As frações em acetato de etila reunidas na metodologia 4.5.4. foram solubilizadas em mistura de metanol, acetona e acetato de etila (1:1:1). Em seguida, foram incorporadas em sílica gel (Sílica gel fina, 100-200 mesh – VETEC) para preparo da pastilha da amostra.

Em seguida, a coluna cromatográfica sílica gel foi empacotada (diâmetro: 3 cm; altura: 45 cm) de acordo com a proporção amostra/fase estacionária - 1:50. Após o empacotamento e acondicionamento em fase móvel hexânica, a pastilha foi cuidadosamente aplicada ao topo da coluna e protegida com algodão para o início do processo cromatográfico.

Lentamente adicionou-se o solvente hexano puro (200 mL) para iniciar o processo de eluição. O desenvolvimento da coluna (eluição) seguiu o

comportamento das bandas de separação, sendo assim, foram utilizadas as seguintes fases móveis: Hex:AcOEt (90:10 – 200 mL), Hex:AcOEt (80:20 - 200 mL), Hex:AcOEt (70:30 - 200 mL), Hex:AcOEt (60:40 – 200 mL), Hex:AcOEt (50:50 - 200 mL), AcOEt:Hex (60:40 - 200 mL), AcOEt:Hex (70:30 – 200 mL), AcOEt:Hex (80:20 - 200 mL), AcOEt:Hex (90:10 - 200 mL) e AcOEt 100%, respectivamente.

As frações foram recolhidas em frascos de tubos de ensaio, de acordo com o comportamento das bandas coloridas (Figura 17) que se apresentavam ao longo da eluição. Em seguida, as amostras foram transferidas para frascos de vidro previamente tarados e após secagem total, a massa da amostra isolada foi obtida por meio de pesagem em balança analítica.



Figura 17: Cromatografia em fase normal da fração em acetato de etila.

4.5.6 Cromatográfica em CCD das frações em acetato de etila

Nessa etapa do projeto, realizou-se uma avaliação preliminar do perfil químico das frações e uniões obtidas após cromatografia de exclusão e em sílica, esta análise foi desenvolvida por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), a fim de reunir as frações similares. A fase móvel utilizada para as frações em cromatografia de exclusão foi 6:4 (Hex:AcOEt). No entanto, a utilizada para cromatografia em fase normal foi 7:3 (Hex:AcOEt), logo após as placas foram observadas em câmara sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm. Sendo utilizado anisaldeído sulfúrico como revelador.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das frações orgânicas

As massas das frações, após secagem total, foram obtidas por meio de pesagem em balança analítica e apresentaram os seguintes valores:

Tabela 2: Tabela contendo as massas das frações de acetato de etila e hexânica do endófito de *Aspergillus sclerotiorum*.

Fração	1º cultivo	2º cultivo	Massa fração final
AcOEt	4,0225 g	5,3773 g	9,3998 g
Hexânica	2,5065 g	4,8621 g	7,3686 g

5.2 Testes para verificação de atividade biológica

5.2.1 Avaliação da atividade citotóxica

As frações obtidas a partir das culturas microbianas foram avaliadas quanto a seu potencial citotóxico em colaboração com o Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará e Laboratório de Produtos Bioativos (LPBIO) – UFRJ – Campus Macaé.

5.2.2 Avaliação da viabilidade celular pelo método de MTT

Após a realização do teste de viabilidade celular pelo método de MTT, os resultados foram analisados através da absorbância de cada poço e estão representados graficamente abaixo.

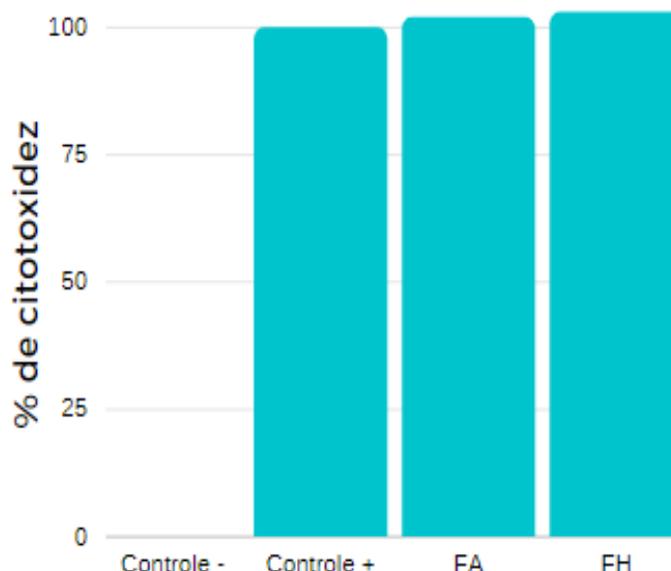


Figura 18: Efeito citotóxico em linhagem tumoral U937 (leucemia de origem linfoide) tratadas com as amostras dos fungos endofíticos da espécie vegetal *Stachytarpheta schottiana*. O tratamento foi realizado com as amostras na concentração de 100 µg/mL por 48 horas. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados obtidos através do método com MTT. Controle positivo (+), células U937 tratadas com Triton X100 para lise máxima. Controle negativo (-), células U937 sem tratamento.

Na Figura 18 demonstra a % de citotoxicidade, ou seja, quanto maior for o seu valor, maior será o seu efeito citotóxico e, portanto, maior a capacidade de inviabilizar as células da linhagem tumoral.

A atividade citotóxica das frações obtidas do endófito *Aspergillus sclerotiorum* se destacam por seus expressivos percentuais de inibição do crescimento tumoral (>90%). As frações FA (101,70 (±6,09)) e FH (102,67 (±2,41)) apresentaram inibição no crescimento celular significantes, sendo bastante ativas contra a linhagem tumoral utilizada. Convém mencionar que as letras A e H ao fim das codificações se referem às frações acetato de etila e hexano, respectivamente.

Em 2018, PHAINUPHONG e colaboradores, isolaram cinco compostos do fungo *Aspergillus sclerotiorum*., incluindo um novo derivado de pirrolidina, asperidina A, e dois novos derivados de piperidina, asperidinas B e C, juntamente com dois alcaloides. A citotoxicidade de asperidinas B e C em células Caco-2 (extraídas de adenocarcinoma de cólon humano) foi realizada utilizando o método MTT. Os resultados mostraram que a viabilidade das células Caco-2 se manteve acima de 100% após 24 h de exposição aos derivados de piperidina na concentração que varia de 12,5 a 100 µM. Sendo assim, apresentando um efeito antioxidante interessante.

5.2.3 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* – Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará

Para os ensaios de citotoxicidade desenvolvidos no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, as amostras foram avaliadas contra quatro linhagens tumorais, a saber: PC-3 (câncer de próstata – humano), HCT-116 (câncer de cólon – humano); e SF-295 (glioblastoma – humano) e HL60 (leucemia promielocítica) utilizando o método MTT (Tabela 3). Os valores de inibição de IC₅₀ estão expressos em µg/mL.

Tabela 3: Ensaio de atividade citotóxica para linhagens tumorais, frações em acetato de etila e hexano do cultivo do endófito *Aspergillus Sclerotium* de *Stachytarpheta schottiana*.

Valores de IC₅₀ são apresentados em µg/ml. PC-3: câncer de próstata – humano; HCT-116: câncer de cólon – humano; SF-295: glioblastoma – humano; HL60: leucemia promielocítica.

Linhagens celulares	Fração em hexano	Fração em acetato de etila
PC3	15,12±2,00	11,08±0,62
SF295	24,70±7,36	7,37±0,27
HCT116	12,86±2,96	10,15±1,00
HL60	12,50±1,78	21,43±2,43

Para as linhagens testadas as frações provenientes do endófito *Aspergillus sclerotiorum* apresentaram nível de atividade considerável para os padrões de ensaios realizados pelo grupo do Ceará. As atividades foram relativamente satisfatórias considerando que os extratos têm alta complexidade química.

Em uma pesquisa realizada em 2019, três γ -hidroxilbutenolídeos, um par de novos espirobutenolídeos enantioméricos, um par de ciclopentanonas enantioméricos, outros compostos como ácido penicílico, ácido dihidropenicílico e orcinol, foram isolados de *Aspergillus sclerotiorum*. Os compostos γ -hidroxilbutenolídeos e ciclopentanona foram avaliados quanto à sua citotoxicidade contra as linhagens celulares, HL60 (leucemia humana promielocítica), A549 (adenocarcinoma do pulmão humano) e HL-7702 (hepática normal humano), através do método MTT, sendo a doxorrubicina como controle positivo (IC₅₀: 0,85, 1,5 e 8,3

μM , respectivamente). Como resultado, os γ -hidroxilbutenólídeos 1 e 3 mostraram citotoxicidade seletiva contra células HL60 (IC_{50} : 6,5 e 12,1 μM , respectivamente), A549 (IC_{50} : 8,9 e 16,7 μM , respectivamente) e HL-7702 (IC_{50} : 17,6 e 22,8 μM , respectivamente). Os outros compostos foram inativos para as linhas celulares testadas (Li-Ying et al., 2019).

Relacionando o potencial citotóxico dos compostos γ -hidroxilbutenólídeos, com a doxorrubicina e com as frações (Hex/ AcEOt) obtidas, as frações tiveram um potencial citotóxico significativo em todas as linhagens testadas. Porém, convém mencionar que as frações em acetato de etila se mostraram mais promissoras em relação ao nível de inibição, com valores de $7,37 \pm 0,27$ e $10,15 \pm 1,00$, para as linhagens SF295 e HCT116, respectivamente.

Considerando que o solvente de acetato de etila consegue extrair componentes da classe fenólica, a atividade encontrada pode estar relacionada a estes compostos pois na literatura existe ampla discussão sobre a atividade antioxidante de compostos fenólicos. (ALVES et al., 2017; MARTINS et al., 2018; MORAIS et al., 2017; PENIDO et al., 2017; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

Dessa forma, os resultados sugerem que compostos isolados da espécie *Aspergillus Sclerotium*, podem servir como fontes para compostos antitumorais.

5.3 Análise cromatográfica – Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As frações foram analisadas por CCD (Figura 19), através da observação em luz UV (254 e 365 nm) e revelação química com ácido anisaldeído sulfúrico. O sistema de solvente utilizado mostrou-se satisfatório, pois apresentou uma boa distribuição das substâncias ao longo da placa e evidenciou que os extratos e frações têm elevada complexidade, e que as mesmas apresentaram diferentes polaridades.

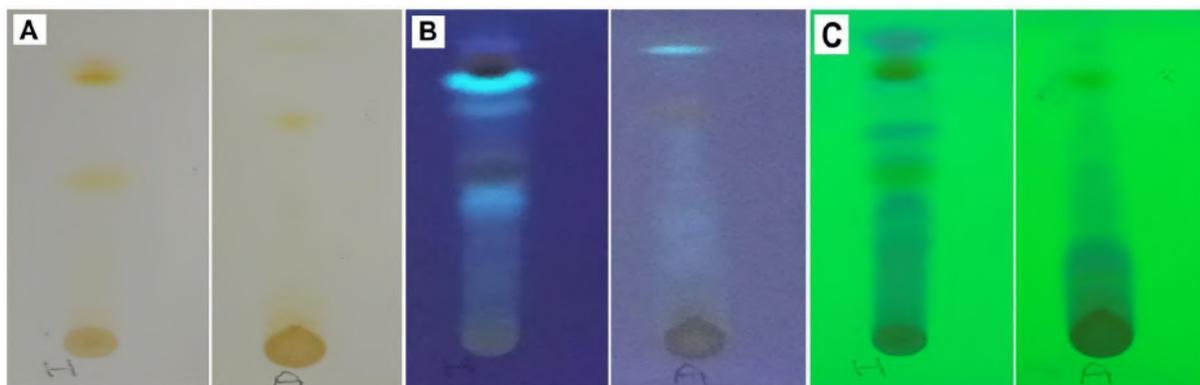


Figura 19: Cromatografias em camada delgada das frações acetato de etila (placas da coluna 1) e hexano (placas coluna 2). Eluente 7:3 (Hex: AcOEt) - (A): Revelação com anisaldeído sulfúrico; (B): Visualização em câmara de luz UV longo (365 nm) e (C) curto (254 nm).

Cálculo do fator de retenção:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{frente do solvente}}$$

Fator de retenção da CCD da fração em hexano:

$$R_f = \frac{3,4}{4,0} = 0,85$$

Fator de retenção da CCD da fração em hexano:

$$R_f = \frac{2,5}{4,0} = 0,63$$

5.4 Análise cromatográfica-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) - DAD

A fração em acetato de etila provenientes de endófito *Aspergillus sclerotiorum* foi avaliada quanto a seu perfil em CLAE - DAD (Figura 20), de modo a verificar a complexidade química da mesma. Foram utilizadas as condições relatadas no item 4.5.2.

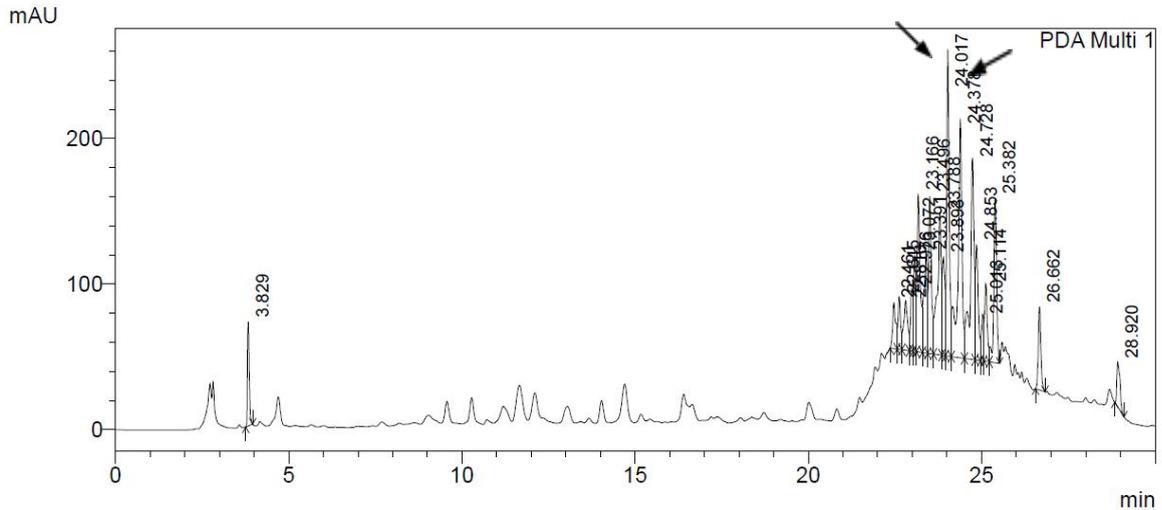


Figura 20: Perfil cromatográfico em CLAE - DAD, fração em acetato de etila. (254 nm).

A fração acetato de etila do fungo *Aspergillus sclerotiorum* apresentou uma complexidade elevada sobretudo o terço final da eluição. Entretanto, não houve uma boa distribuição dos metabólitos, os quais eluíram com o aumento da concentração da fase orgânica (acetonitrila). De qualquer modo, destacam-se os picos nos tempos: 24,01 e 24,37 minutos, os quais se apresentaram como picos majoritários no comprimento de onda selecionado (254 nm).

5.5 Análise por cromatografia gasosa CG-EM

A fração hexânica obtida a partir do cultivo do endófito *Aspergillus sclerotiorum* foi avaliada quanto a seu perfil de complexidade e possíveis constituintes em CG-EM, sob as condições relatadas no item 4.5.3.

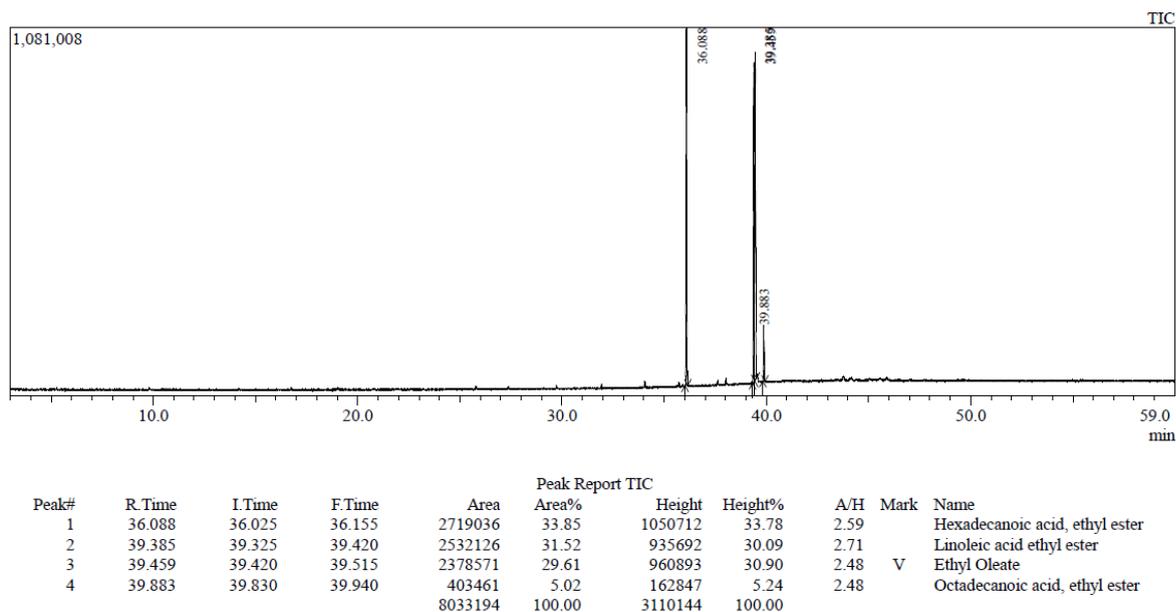


Figura 21: Perfil cromatográfico em CG-EM da fração hexânica. Temperatura do injetor: 220 °C; temperatura do forno da coluna: 60 – 246 °C na razão de 3 °C min⁻¹; temperatura da linha de transferência: 240 °C; fonte de íons à 220 °C, IEEM, 70 eV.

De acordo com o perfil cromatográfico exibido acima (Figura 21), a fração hexânica analisada por CG-EM apresentou três substâncias majoritárias, a saber: ácido hexadecanoico (36,08 min – 33,85%), ácido linoleico (39,38 min – 31,52%) e oleato de etila (39,45 min – 29,61%), cujas estruturas apresentam-se na figura a seguir:

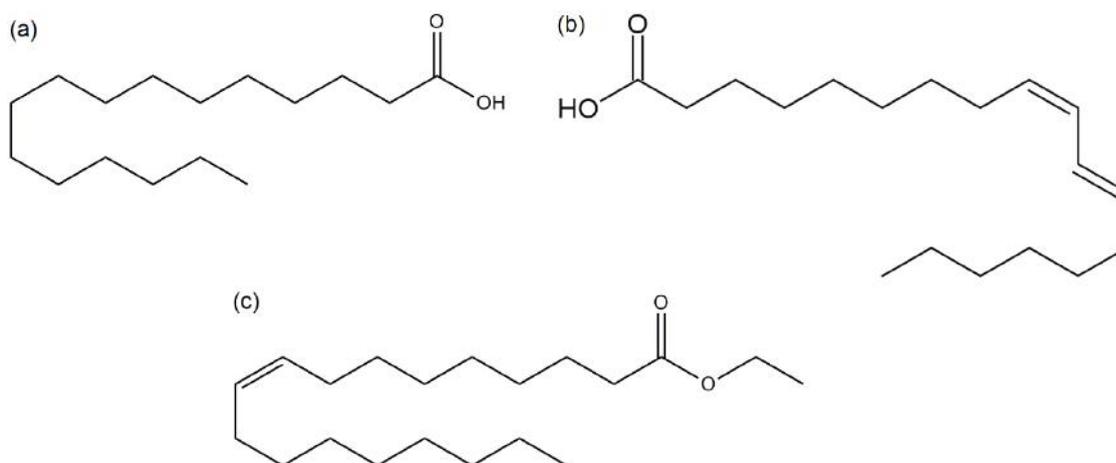


Figura 22: (a) Fórmula estrutural do ácido hexadecanoico, vulgarmente conhecido como ácido palmítico; (b) ácido linoleico e (c) oleato de etila.

Os micro-organismos durante seus processos metabólicos sintetizam e utilizam ácidos graxos e lipídeos como reserva de carbono (SILVA, 2011). Diversos estudos mostram a ocorrência de ácidos graxos em fungos endofíticos. Em 1930, Beilby detectou a presença do ácido palmítico e oleico na espécie *Acaulospora laevis*. Já em 2013, Kumar e Kaushik indicaram a presença de ácidos graxos no extrato hexânico obtido por fungos endofíticos da planta *Jatropha curcas*, dentre eles, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico e ácido linoleico.

Sendo assim, as frações em hexano de cultivos de micro-organismos têm grande complexidade em ácidos graxos, como estes que foram obtidos. Como os ácidos graxos sintetizado por micro-organismos geralmente possuem composição similar entre eles e pela pouca aplicabilidade em atividades biológicas, geralmente os mesmos tem pouca relevância nos estudos investigativos.

5.6 Cromatografia de Exclusão Molecular (Sephadex)

A cromatografia de exclusão (Sephadex) é um método que tem por objetivo separar as substâncias de acordo com a massa molecular. Sendo assim, optou-se pelo uso da Sephadex - cromatografia de exclusão (Figura 23) a fim de reduzir a complexidade da amostra para as etapas cromatográficas posteriores.

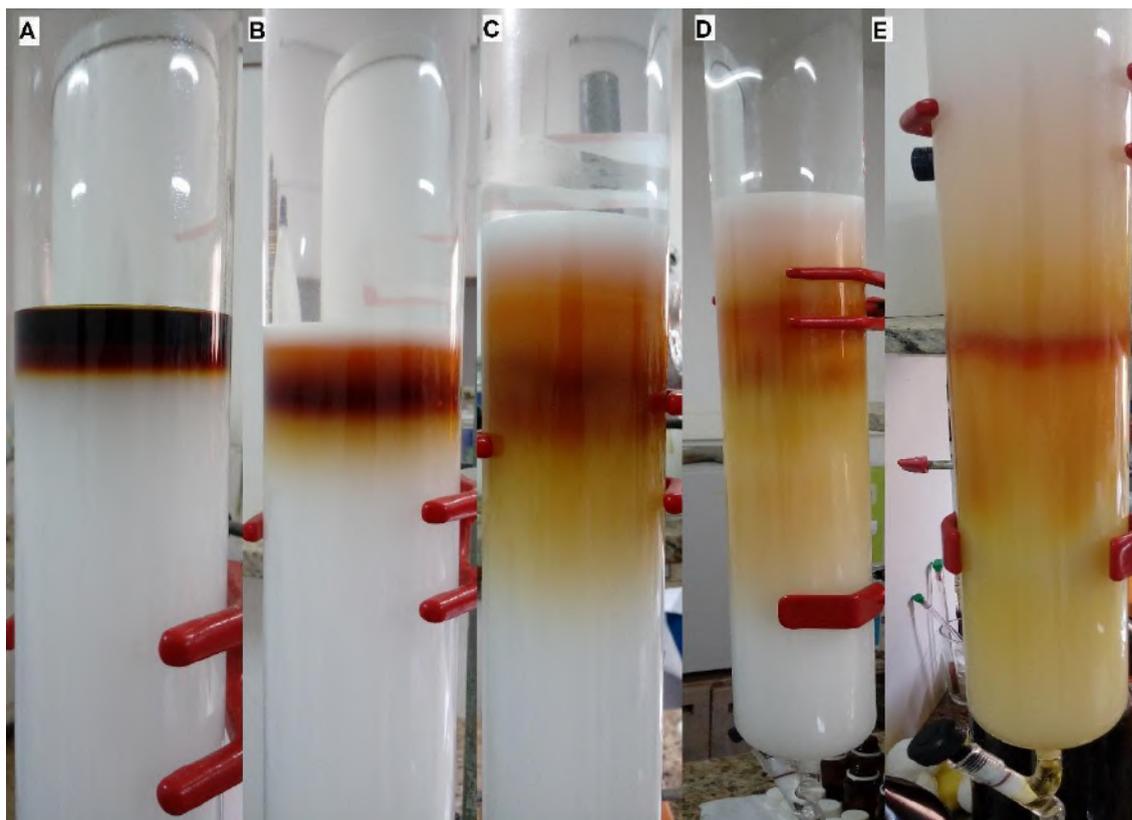


Figura 23: Coluna de exclusão (Sephadex). Eluente: Metanol – (A) Tempo 0 min; (B) Após 30 minutos; (C) Após 50 minutos; (D) Após 1 hora e 50 minutos; (E) Após 3 horas.

Por se tratar de uma cromatografia de exclusão, as espécies com pesos moleculares maiores não ficam muito tempo retidas aos poros presentes na fase estacionária da coluna, e são as primeiras a serem coletadas. Desta forma, conforme a sequência demonstrada na Figura 23, pode-se notar que as substâncias presentes na porção amarela, possivelmente, são as maiores com tempo de retenção menor. E, à medida que o pigmento vai mudando sua coloração do amarelo ao laranja, as moléculas vão ficando cada vez menores, ou seja, saindo lentamente da coluna cromatográfica por efeito do fluxo da fase móvel. Este perfil se mostrou semelhante para as duas colunas realizadas. Na primeira coluna foram recolhidas 40 (quarenta) frações, que foram agrupadas em 7 sub-frações e na segunda, 55 frações agrupadas em 10 sub-frações.

Após o procedimento cromatográfico em coluna sephadex, a amostra em acetato de etila apresentou rendimento de 93,4%.

5.7 Análise cromatográfica por CCD das frações obtidas no método em gel de exclusão

As frações obtidas na metodologia descrita no item 4.5.4 foram analisadas por cromatografia em camada delgada. Desta forma, foi possível identificar os perfis químicos e fazer as reuniões entre frações de mesma coluna e entre colunas.

Na primeira coluna cromatográfica recolheram-se 40 frações, agrupadas em 7 sub-frações (Figura 24) e na segunda 55 frações agrupadas em 10 sub-frações. (Figura 25). As frações foram agrupadas e analisadas.

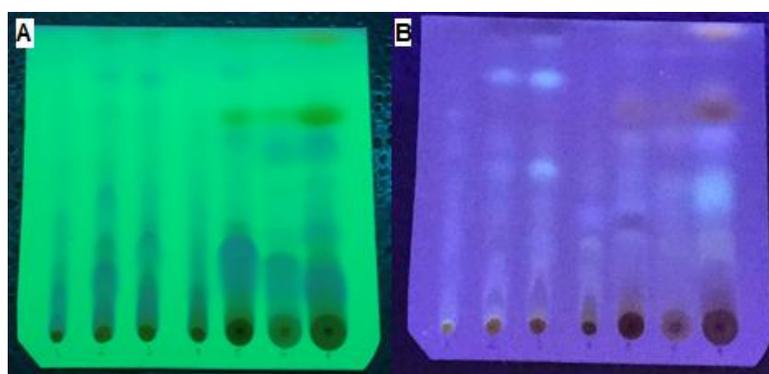


Figura 24: CCD das 7 frações da 1ª coluna de Sephadex (Da esquerda para direita) - Eluente 6:4 (Hex: AcOEt) - (A): Comprimento curto (254 nm) e (B): Comprimento longo (365 nm).

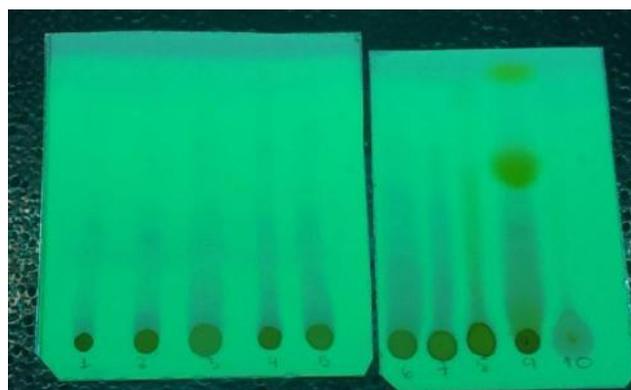


Figura 25: CCD das 10 frações da 2ª coluna de Sephadex (Da esquerda para direita) - Eluente 6:4 (Hex: AcOEt) - Comprimento curto (254 nm).

Pode-se notar que as frações 5, 6 e 7 (1ª col.) apresentaram perfis cromatográficos semelhante as frações 8, 9 e 10 (2ª col.), ou seja, apresentam bandas (manchas) equivalentes, quando observadas em UV e ao serem reveladas

em revelador químico. As demais frações não apontaram nenhuma substância de interesse e foram descartadas.

Sendo assim, as frações 5, 6, 7 do primeiro processo extrativo e as frações 8 e 9 do segundo processo fermentativo, foram reunidas para dar continuação ao trabalho. As suas massas foram obtidas por pesagem em balança analítica e estão apresentadas na tabela (Tabela 4):

Tabela 4 - Massas das frações reunidas.

Frações	Massa (mg)
5	227,1
6	20,0
7	58,7
8	208,6
9	105,3
10	109,8
Total	729,5

Após reunidas obteve-se uma massa no valor de $m = 0,7295$ g, ou seja, 729,5 mg. Para facilitar o entendimento, esta fração foi denominada FRX.

5.8 Cromatografia Clássica em Fase Normal

O procedimento cromatográfico foi realizado para a fração FRX obtida no procedimento 5.7. De acordo com o sistema de solvente utilizado, as substâncias menos polares eludiram primeiro e com o aumento do solvente polar, as substâncias mais polares eludiram depois. Sendo assim, é possível observar que na primeira coluna a banda alaranjada apresentou caráter mais apolar, pois seu tempo de retenção foi menor. Já a zona móvel amarela mostrou afinidade intermediária pelo adsorvente e eluente; e, a marrom, apresentou caráter polar, interagindo melhor com o adsorvente.

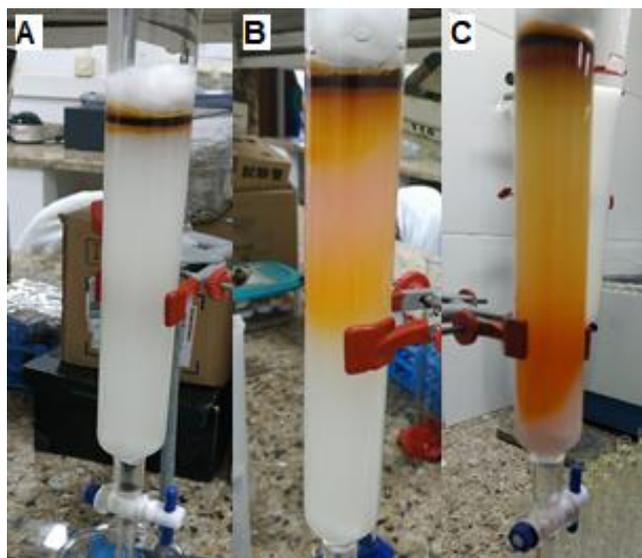


Figura 26: Cromatografia em fase normal da fração FRX.

Após o procedimento cromatográfico em coluna, a amostra em acetato etila da fração FRX apresentou rendimento de 30,6%.

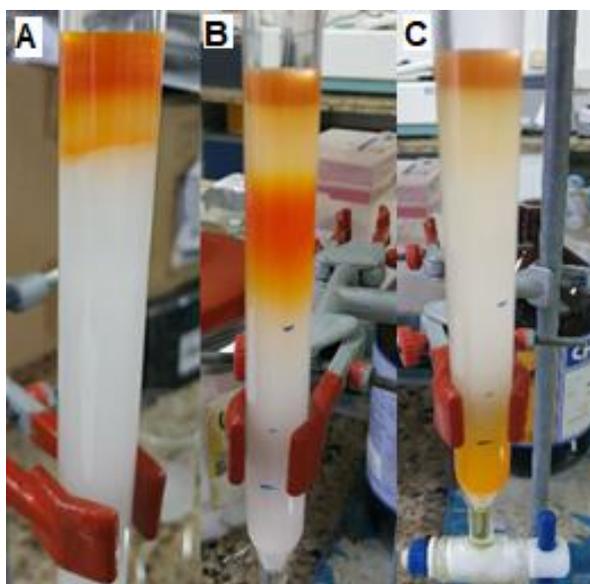


Figura 27: Cromatografia em fase normal das sub-frações da fração FRX.

Após o procedimento cromatográfico em coluna, a amostra em acetato etila das sub-frações da fração FRX apresentou rendimento de 30,01%.

Como resultado, na primeira coluna foram recolhidas 10 frações e na segunda, 18 frações, as quais tiveram seu perfil químico analisado em CCD.

5.9 Análise cromatográfica por CCD das frações obtidas no método de cromatografia em fase normal

Na primeira coluna cromatográfica recolheram-se 10 frações (Figura 28) e na segunda 18 sub-frações (Figura 28). As frações foram analisadas em câmara de UV (curto 254 nm) e longo (365 nm).

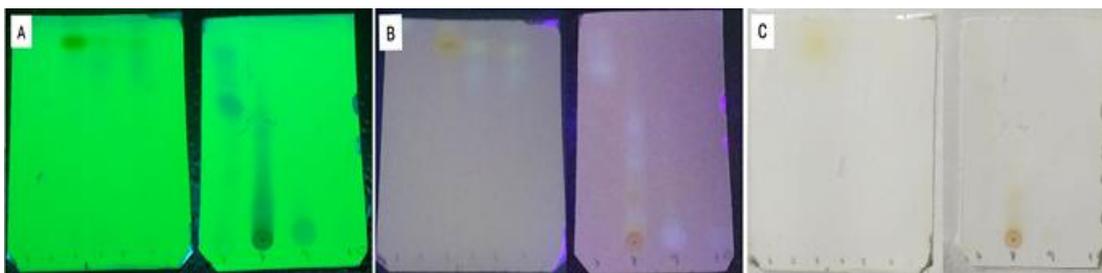


Figura 28: CCD das frações da cromatografia clássica em fase normal - Eluente 7:3 (Hex:AcOEt) - (A): Placa sob UV 254 nm; (B): Placa sob UV 365 nm e (C) Placa revelada com Anisaldeído sulfúrico.

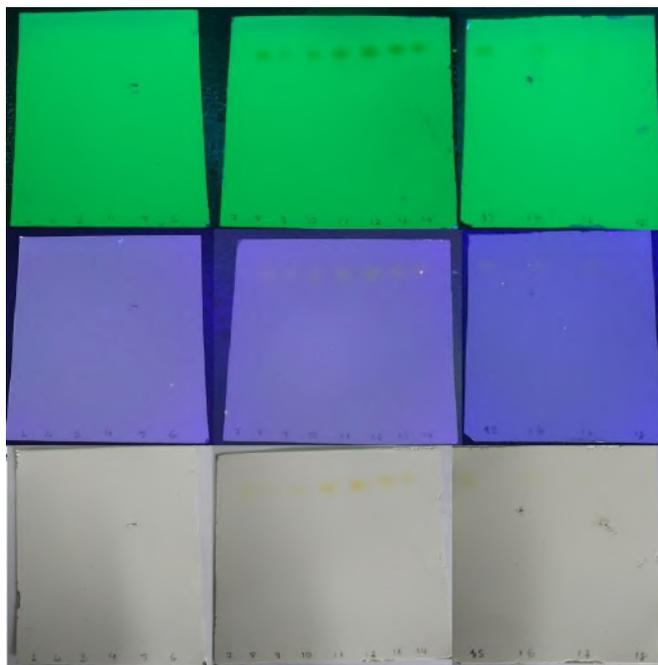


Figura 29: CCD das frações da cromatografia clássica em fase normal - Eluente 7:3 (Hex:ACOEt). (A) Placa sob UV 254 nm; (B) Placa sob UV 365 nm e (C) Placa revelada com Anisaldeído sulfúrico.

Cálculo do fator de retenção:

$$\text{Fr 7} = R_f = \frac{3,7}{4,6} = 0,80$$

$$\text{Fr 11} = R_f = \frac{4,0}{4,6} = 0,87$$

$$\text{Fr 8} = R_f = \frac{3,7}{4,6} = 0,80$$

$$\text{Fr 12} = R_f = \frac{4,0}{4,6} = 0,87$$

$$\text{Fr 9} = R_f = \frac{3,9}{4,6} = 0,85$$

$$\text{Fr 13} = R_f = \frac{4,1}{4,6} = 0,90$$

$$\text{Fr 10} = R_f = \frac{3,9}{4,6} = 0,85$$

$$\text{Fr 14} = R_f = \frac{4,1}{4,6} = 0,90$$

As sub-frações de 7 a 14, quando analisadas em cromatografia em placa, apresentaram mesmo fator de retenção, perfis de coloração semelhantes e manchas únicas à observação no ultravioleta e após revelação, indicando que a substância apresenta um bom grau de pureza, embora a amostra não tenha sido analisada em CLAE - DAD. Dessa forma, as amostras foram reunidas como amostra final (figura 30), obtendo-se uma massa no valor de $m = 31,2$ mg, ou seja, 0,0312g.

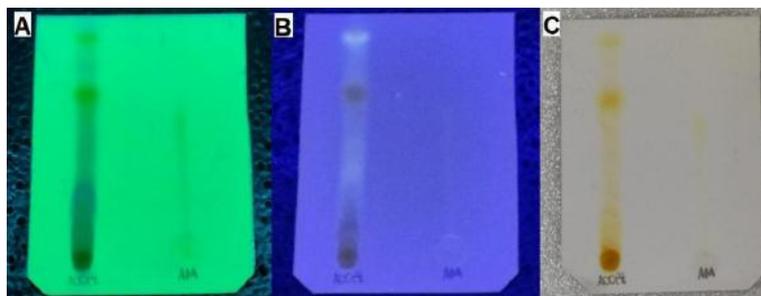


Figura 30 - CCD das frações da cromatografia clássica em fase normal agrupadas - Eluente 7:3 (Hex:ACOEt) - (A) Placa sob UV 254 nm; (B) Placa sob UV 365 nm e (C) Placa revelada com Anisaldeído sulfúrico.

Cálculo do fator de retenção:

Fator de retenção da fração em acetato: $R_f = \frac{2,9}{3,6} = 0,80$

Fator de retenção da amostra final: $R_f = \frac{2,2}{3,6} = 0,61$

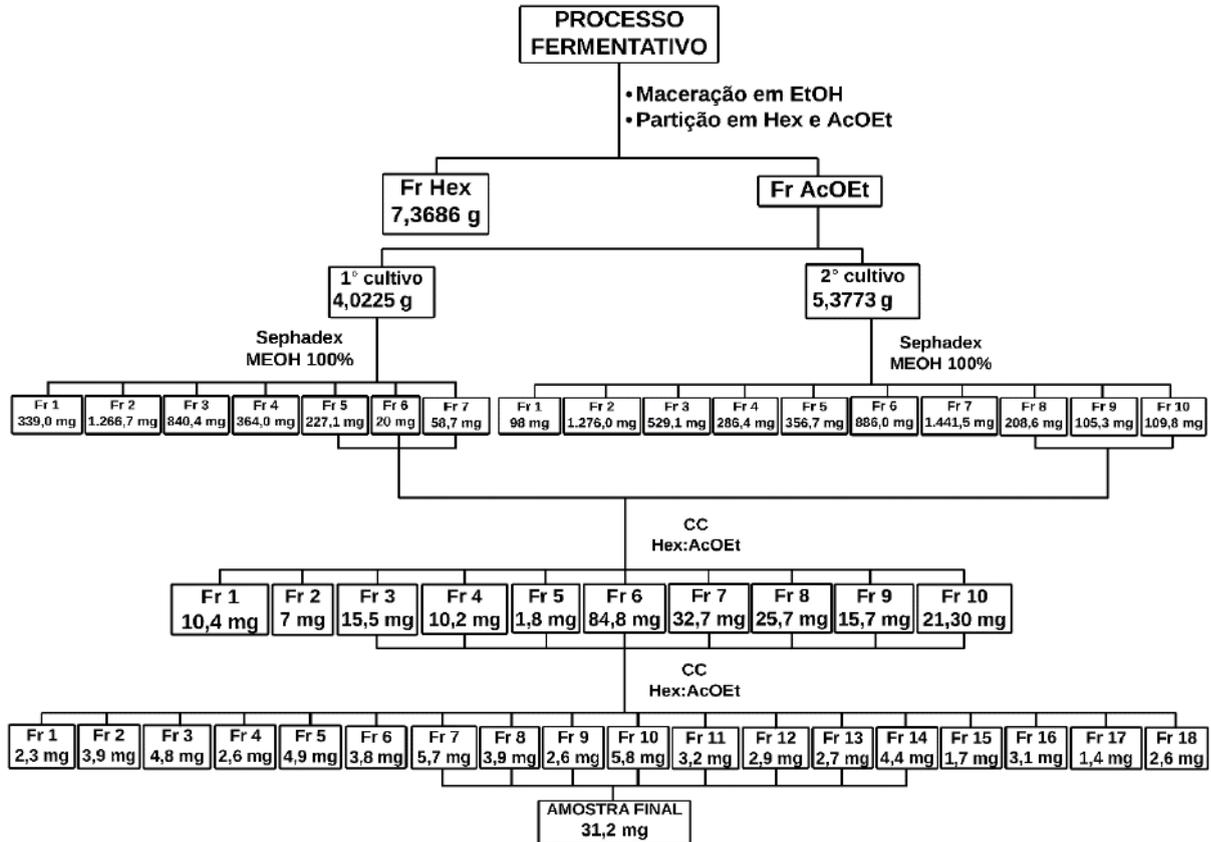


Figura 31: Fluxograma do isolamento

A amostra final foi encaminhada para análise em RMN, mas devido a pandemia os resultados ainda não foram obtidos.

A proposta é obter os espectros por RMN, juntamente com os espectros de massas para realização da elucidação estrutural. Além disso, submeter a amostra a avaliação biológica com os testes que foram utilizados nas frações brutas.

6 CONCLUSÃO

As frações orgânicas apresentaram massa considerável e, sendo assim, foi possível avançar o estudo visando a realização de métodos cromatográficos, para posterior isolamento de substâncias bioativas.

No teste de viabilidade celular pelo método de MTT, as frações FA e FH apresentaram resultado promissor, com inibição do crescimento tumoral (>90%) contra a linhagem tumoral U937. Além de bons resultados contra as linhagens celulares SF295 e HCT116. Acredita-se que resultados biológicos podem ser ainda melhores, quando as substâncias forem isoladas e testadas novamente.

As amostras foram submetidas à análise cromatográfica por CCD, CLAE - DAD e CG, apresentando complexidade química significativa. A fração em acetato foi selecionada para dar seguimento ao trabalho, visto que a maior parte das substâncias constituintes da fração hexânica foram identificadas por CG-MS.

A perspectiva futura desse trabalho será dar continuidade através da análise da substância isolada via técnicas espectrais para identificação da substância, bem como a submissão da mesma aos testes biológicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, D. R.; MAIA DE MORAIS, S.; TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M. M.; VASCONCELOS, F. R.; SILVA, I. N. G. da; ARAUJO DE SOUSA, H.; ASSOLINI, J. P.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W. R.; FREIRE, F. das C. O. **Flavonoid Composition and Biological Activities of Ethanol Extracts of *Caryocar coriaceum* Wittm., a Native Plant from Caatinga Biome.** vol. 2017, p. 1–7, 7 Sep. 2017.

ARAUJO, D. S. D.; MACIEL, N. C. **Restingas fluminenses: biodiversidade e preservação.** Boletim FBCN, v. 25, p. 27-51. 1998

ARAUJO, Marlon Heggdorne de et al. **Anti-mycobacterial and anti-inflammatory activity of restinga plants: a dual approach in searching for new drugs to treat severe tuberculosis.** Rodriguésia, v. 72, 2021

AURICCHIO, Mariangela T.; BACCHI, Elfried M. **Folhas de *Eugenia uniflora* L.(pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas.** Revista do Instituto Adolfo Lutz, 2003, vol. 62, no 1, p. 55-61.

ATKINS, S. **Verbenaceae in the families and genera of vascular plants.** Berlin: Springer-Verlag, ed. J. W. Kadereit, v. 7, p. 449-468. 2004.

ATKINS, S. **The genus *Stachytarpheta* (Verbenaceae) in Brazil.** Kew Bulletin, v. 60, n. 2, p.161-272, 2005.

AZEVEDO, João Lúcio. **Microrganismos endofíticos.** Ecologia microbiana, v. 486, 1998.

BARRETO, L. C.; SANTOS, F. M.G.; GARCIA, Q. S. **Seed dormancy in *Stachytarpheta* species (Verbenaceae) from high-altitude sites in south-eastern Brazil.** Laboratório de Fisiologia Vegetal, Departamento de Botânica, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. Flora, v. 225, p. 37–44. 2016.

BEILBY, J. **Fatty acid and sterol composition of ungerminated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Acaulospora laevis*.** Lipids, v. 15, n. 11, p. 949-952. Novembro/1930.

BENNETT, Scott E. Baker and Joan W. **An overview of the genus *Aspergillus*.** The Aspergilli, 2007, p. 23-34.

BFG - The Brazil Flora Group (2015) **Growing knowledge: an overview of seed plant diversity in Brazil.** Rodriguésia 66: 1085-1113.

BOSCOLO, O. H.; SENNA VALLE, L. DE. **Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil.** Iheringia - Serie Botanica, v. 63, n. 2, p. 263–272, 2008.

BREWER, M. S. **Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications.** Comprehensive reviews in food science and food safety, 2011, vol. 10, no 4, p. 221-247.

BROWN, James R. **Ancient horizontal gene transfer.** Nature Reviews Genetics, 2003, vol. 4, no 2, p. 121-132.

CARIBE J, CAMPOS JM. **Plantas que ajudam o homem.** Guia Prático para Época. Atual. 1991.

CHALFOUN, Sara Maria; BATISTA, L. R. **Fungos associados a frutos e grãos do café: Aspergillus e Penicillium.** Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

CHANG, Cicero LT, et al. **Beneficial effect of Bidens pilosa on body weight gain, food conversion ratio, gut bacteria and coccidiosis in chickens.** PloS one, 2016, vol. 11, no 1, p. e0146141.

DAMBRÓS, Daniela. **Caracterização epidemiológica e manejo da podridão pós-colheita por Aspergillus em uva de mesa.** 2015. 49 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/6000>. Acesso em: 10 nov 2021.

DE BARCELLOS FALKENBERG, Dantel. **Aspectos da flora e da vegetação secundária da restinga de Santa Catarina, Sul do Brasil.** INSULA Revista de Botânica, v. 28, p. 01-01, 1999.

DE SOUZA, M. A. A. (2010). **Essencial e avaliação do metabolismo de Mentha arvensis L. sob diferentes condições de cultivo.** Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Área de Concentração em Química Agrária. Seropédica, RJ, 2010. Disponível em: <https://cursos.ufrj.br/posgraduacao/ppgq/teses-doutorado-2010/>. Acesso em: 22 nov, 2021.

DE SOUZA, M. N. R. (2019). **ANÁLISE CROMATOGRÁFICA EMPREGANDO COLUNA BIFENIL NA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE VERBASCOSÍDEO E ISOVERBASCOSÍDEO NA ESPÉCIE VEGETAL Stachytarpheta Schottiana Schauer.** Tese (Mestrado em ciências) - Programa de Pós-Graduação em Produtos Bioativos e Biotecnologias. Macaé, RJ, 2019. Disponível em: <https://ppgprodbio.macaee.ufrj.br/images/Dissertacoes/2019/Dissertacao-Marcelly-Souza.pdf>. Acesso em: 12 de abril de 2022.

DOS SANTOS, Marcus Cezar, **Contribuição à Gestão Das Lagoas Costeiras: Conhecimento Tradicional, técnico e científico associado ao manejo dos recursos naturais da Lagoa de Carapebus, Parque Nacional Da Restinga de Jurubatiba - RJ.** 2008. Mestrado (Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Federal de Educação Tecnológica de Campos. Macaé, RJ, 2008. Disponível em: http://ava.icmbio.gov.br/pluginfile.php/108/mod_data/content/2526/Marcos%20C.%20dos%20Santos%20-%20Mestrado%20-%20Ano%202008.pdf. Disponível: 22 nov. 2021.

DUANGJAI, Acharaporn et al. **Antispasmodic Effect of Asperidine B, a Pyrrolidine Derivative, through Inhibition of L-Type Ca²⁺ Channel in Rat Ileal Smooth Muscle.** *Molecules*, v. 26, n. 18, p. 5492, 2021.

FELIPHE, Bárbara Helena Muniz Prado e. **Isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos associados à *Eugenia pyriformis* (Myrtaceae).** 2015. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2015. Disponível em: <http://bdtd.unifal-mg.edu.br:8080/handle/tede/846>. Acessado em: 22 nov de 2021.

FERNANDES, Maurette dos Reis Vieira, et al. **Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L.** *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 2009, vol. 45, p. 677-685.

FIRN, D.R.; JONES, G.C. **Natural products – a simple model to explain chemical diversity.** *Natural Product Reports*, London, v.20, p.382–391, 2003.

FOPPA, Carolina Ester et al. **Aplicações da metodologia fish em citogenética de neoplasias.** 2015.

FORZZA, R. C . **Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** Andrea Jakobsson Estúdio, v. 2, p. 1681. 2010.

FORTKAMP, Diana. **Metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de *Anthurium alcatrazense* e *Begonia* spp.** 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Disponível: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-17072018-184806/pt-br.php>. Acesso: 15 nov 2021.

FOWLER, Michael W. **Plants, medicines and man.** *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2006, vol. 86, no 12, p. 1797-1804.

FRANCO, Augusto C., et al. **Os microclimas das zonas de vegetação da praia da restinga de Barra de Maricá, Rio de Janeiro.** Restingas: Origem, estrutura e processos.(LD Lacerda, DSD Araujo, R. Cerqueira & B. Turcq, orgs.). CEUFF, Niterói, 1984, p. 413-425.

FRISVAD, J. C.; FRANK, J. M.; HOUBRAKEN, J. A. M. P.; KUIJPERS, A. F.A.; SAMSON, R. A. **New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*.** *Studies in mycology*, v. 50, p. 23–43. 2004.

FUCHS, Benjamin; KRAUSS, Jochen. **Can *Epichloë* endophytes enhance direct and indirect plant defence?.** *Fungal Ecology*, 2019, vol. 38, p. 98-103.

GEISER, D. M. . **The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*.** *Estudies in Mycology*, Utrecht, v.59, p.1-10, 2007.

GIULIETTI, Ana Maria, et al. **Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista das espécies**. Boletim de Botânica da universidade de São Paulo, 1987, p. 1-151.

PIRANI, AM Giuliettiand JR; GIULIETTI, A. M. **Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço range, Minas Gerais and Bahia**. En Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Brazil. 1988. p. 36-96.

GUIMARÃES, D.O. **Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em Caenorhabditis elegans**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto-SP, 186p., 2010. Disponível em: <http://bdtd.unifal-mg.edu.br:8080/handle/tede/846>. Acessado em: 22 nov de 2021.

HARLEY, Raymond Mervyn; SIMMONS, N. A. **Florula of Mucugê, Chapada Diamantina, Bahia, Brazil: A descriptive check-list of a campo rupestre area**. Royal Botanic Gardens Kew, 1986.

DE HOOG, Gerrit S., et al. **Atlas of clinical fungi**. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), 2000.

GYAWALI, Rabin; IBRAHIM, Salam A. **Natural products as antimicrobial agents**. Food control, v. 46, p. 412-429, 2014.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. **The hallmarks of cancer**. cell, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. **Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens***. IMA Fungus : The Global Mycological Journal, Berkeley, v.2, n.1, p.87-95, 2011.

HUBER, G. A. ***Aspergillus sclerotiorum***. Phytopathology. MycoBank MB2777072 3:306.1933.

IMBASSAHY, C. A. A. I.; COSTA, D. P.; ARAÚJO, D. S. D. **Briófitas do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil**. Acta Botanica Brasilica, v. 23, p. 558-570. 2009.

KUMAR, S. et al. **Draft Genome Sequence of *Streptomyces gancidicus* Strain BKS 13-15**. Genome Announcements, v. 1, n. 2, p. 1–2, 2013.

KANG, S. W. . **Production of penicillic acid by *Aspergillus sclerotiorum* CGF**. Bioresource technology, v. 98, n. 1, p. 191-197, 2007.

KLICH, M. A. **Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter**. Mycologia, New York, v. 94, n. 1, p. 21-27, 2002a.

KUMAR, S.; KAUSHIK, N. **Endophytic Fungi Isolated from Oil-Seed Crop *Jatropha curcas* Produces Oil and Exhibit Antifungal Activity.** Plos one, v. 8, n. 2, e. 56202, p. 1-8. Fevereiro/2013.

LACERDA, L.D., ARAUJO, D.S.D. & MACIEL, N.C. 1993. **Dry coastal ecosystems of the tropical Brazilian coast.** In **Dry coastal-ecosystems: Africa, Asia, Oceania** (E. Van der Maarel, ed.). Elsevier, Amsterdam, p.477-493.

SEBASTIANES, F. L. S.; AZEVEDO, J. L. DE; LACAVA, P. T. **Diversity and benefits of microorganisms from the tropics.** Switzerland: Springer Nature, 2017. p. 37–56.

LIEW, Pearl Majorie; YONG, Yoke Keong. **Stachytarpheta jamaicensis (L.) Vahl: from traditional usage to pharmacological evidence.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016, vol. 2016.

Li-Ying et al. **New butenolides and cyclopentenones from saline soil-derived fungus *Aspergillus sclerotiorum*.** Molecules, v. 24, n. 14, p. 2642, 2019

LOPES, Flávia Cristine Mascia. **Avaliação da atividade antiinflamatória, antitumoral e antiangiogênica de compostos isolados da planta *Alchornea glandulosa* e de fungos endofíticos a ela relacionados.** 2008. 164 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2008. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/103333>. Acesso em: 22 nov de 2021.

LORENZI, Harri; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras** 4. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

Lu Y, Chen S, Wang B. **Cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from the endangered, chinese endemic species *Dyosma pleiantha*.** J Biosci 2009; 64(8):518-520.

Machado FLS, Kaiser CR, Costa SS, Gestinari LM, Soares AR. **Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*.** Rev Bras Farmacogn 2010; 20(3):441-452

MACHADO, P.L.O. de A.; GERZABEK, M.H. **Tillage and crop rotation interactions on Humic substances of a Typic Haplorthox from southern Brazil.** Soil & Tillage Research, Amsterdam, v.26, n.3, p.227-236, 1993.

MARASCHIN, Marcelo; VERPOORTE, R. **Engenharia do metabolismo secundário.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 1999, vol. 23, p. 24-28.

MARTINS, G. V.; ALVES, D. R.; MARCELO VIERA-ARAÚJO, F. M.; RONDON, F.; BRAZ-FILHO, R.; MORAIS, S. M.; VIERA-ARAÚJO, F. M.; RONDON, F.; BRAZ-FILHO, R.; MORAIS, S. M. **Chemical Study and Evaluation of Antioxidant, Anti-acetylcholinesterase and Antileishmanial Activities of Extracts from *Jatropha gossypifolia* L. (Pião Roxo).** Revista Virtual de Química, vol. 10, no. 1, p. 21–36, 2018.

MARTIN, Louis; SUGUIO, K.; FLEXOR, J. M. **As flutuações de nível do mar durante o quaternário superior e a evolução geológica de " deltas" brasileiros.** Boletim IG-USP. Publicação Especial, 1993, no 15, p. 01-186.

MARX, Hannah E., et al. **A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae.** American journal of Botany, 2010, vol. 97, no 10, p. 1647-1663.

MATHIAS, L. A.; EMILY, A. **Tapping and Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará-Brazil.** J Ethnopharmacol, 1993, vol. 40, p. 53-75.

MESIA-VELA, S., et al. **Pharmacological study of Stachytarpheta cayennensis Vahl in rodents.** Phytomedicine, 2004, vol. 11, no 7-8, p. 616-624.

MEYER, V. **Engenharia genética do progresso de fungos filamentosos, obstáculos e tendências futuras** Biotechnol. Adv. , 26 (2) (2008) , pp. 177 - 185
Michito, T., Yoichi, I., Hisae, M., 1996. Herbicide. Japan Patent 08- 053310.

IDU, M., et al. **Preliminary phytochemistry, antimicrobial properties and acute toxicity of Stachytarpheta jamaicensis (L.) Vahl leaves.** Trends in Medical Research, 2007, vol. 2, no 4, p. 193-198.

MISHRA, Abha. **Production of L-asparaginase, an anticancer agent, from Aspergillus niger using agricultural waste in solid state fermentation.** Applied biochemistry and biotechnology, 2006, vol. 135, no 1, p. 33-42.

MONTEIRO, M. C. P. **Identificação de fungos dos gêneros Aspergillus e Penicillium em solos preservados do cerrado.** 2012. 76 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/706>. Acessado em: 17 out de 2021.

MORAIS, Selene M., et al. **Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities.** Pharmaceuticals, 2017, vol. 10, no 1, p. 31.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** 2 Ed. Lavras: UFLA, 729 p. 2006.

Moreira RCR, Rebêlo JMM, Gama MEA, Costa JML 2002. **Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil.** Caderno de Saúde Pública 18: 187-195.

MOSMANN, Tim. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of immunological methods, 1983, vol. 65, no 1-2, p. 55-63.

NADUMANE, V. K.; VENKATACHALAM, P.; GAJARAJ, B. **Aspergillus applications in cancer research.** In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering.** Elsevier, 2016. p. 243-255.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. **Em Anticancer Agents from Natural Products**; Cragg, G.M.; Kingston, D. G. J.; Newman, D. J., eds.; CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, 2005, cap. 1.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. **Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019**. *Journal of Natural Products*, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

ORMOND, W.T. 1960. **Ecologia das restingas do Sudeste do Brasil: comunidades vegetais das praias arenosas**. Parte I. *Arquivos do Museu Nacional* 50:185-236.

PASCUAL, M. E., et al. **Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review**. *Journal of ethnopharmacology*, 2001, vol. 76, no 3, p. 201-214.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Micro-organismos endofíticos**. *Biociência*, Brasília, v. 29, p. 62-77, 2002.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. **Micro-organismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas**. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PENIDO, Alexandre Batista, et al. **Medicinal plants from northeastern Brazil against Alzheimer's disease**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, vol. 2017.

PERES, Lázaro E. P. In: **Metabolismo secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2015.

PERES, LEP; CASTRO, PRC. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Metabolismo secundário: terpenos, 2005.

PÉREZ ZAMORA, Cristina M.; TORRES, Carola A.; NUÑEZ, María B. **Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America**. *Molecules*, v. 23, n. 3, p. 544, 2018.

PETRUCIO, M.M. & FARIA, M.F. 1998. **Concentrações de carbono orgânico, nitrogênio total e fósforo disponível no sedimento das Lagoas Cabiúnas e Comprida. Comunidades Vegetais do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba**. In *Ecologia das Lagoas Costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ)* (F.A. Esteves, ed.). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p.135-14.

PHAINUPHONG, Patima et al. **Lovastatin analogues from the soil-derived fungus *Aspergillus sclerotiorum* PSU-RSPG178**. Journal of natural products, v. 79, n. 6, p. 1500-1507, 2016.

PHAINUPHONG, Patima et al. **Asperidines A–C, pyrrolidine and piperidine derivatives from the soil-derived fungus *Aspergillus sclerotiorum* PSU-RSPG178**. Bioorganic & medicinal chemistry, v. 26, n. 15, p. 4502-4508, 2018.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, P. L.; EPIFANIO, R. A. **Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas**. Química Nova, v. 25, n. 1, p. 45-61. 2002.

RAPER, K.B., Fennell, D.I. **The genus *Aspergillus***. 1st ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1965.

RATH, M.; MITCHELL, T. R.; GOLD, S. E. **Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent**. Microbiological Research, v. 208, n. August 2017, p. 76–84, 2018.

ROCHA, C. F. D. et al. **A restinga de Jurubatiba e a conservação dos ambientes de restinga do Estado do Rio de Janeiro**. Pesquisas de longa duração na Restinga de Jurubatiba: ecologia, história natural e conservação. RiMa, São Carlos, p. 341-352, 2004.

Teiten MH, Mack F, Debbab A, Aly AH, Dicato M, Proksch P, et al. **Anticancer effect of Altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF- κ B activity**. Bioorg Med Chem 2013; 21(13):3850-3858.

THOMAS, Rogimon P. et al. **Antifungal activity of verbenaceae**. Biosciences Biotechnology Research Asia, v. 10, n. 1, p. 355-360, 2013.

SAIKKONEN, K.; WÄLI, P.; HELANDER, M.; FAETH, H. S. **Evolution of endophyte-plant symbiosis**. Trends in Plant Science, Oxford, v.9, p.275-280, 2004.

SALIMENA FRG, Moraes L, Kutschenko DC & Novaes L (2014) **Verbenaceae**. In: Martinelli G, Messina T & Santos-Filho L (orgs.) Livro vermelho da flora do Brasil - Plantas raras do Cerrado CNCFlora, Rio de Janeiro. Pp. 266-273

SALIMENA, F.R.G. **Stachytarpheta schottiana Schauer**. In: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15199>. Acesso em 21 jul de 2021.

SALIMENA, F.R.G. 2014. **Lantana In**: Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15163>> Acesso: 21 set 2021.

SANTOS, Marcelo Guerra et al. Recursos vegetais da restinga de Carapebus, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista de Biologia Neotropical/Journal of Neotropical Biology*, v. 6, n. 1, p. 35-54, 2009.

SILVA, R.R.; COELHO, D.G. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. 20p.

SILVA, G. K. B. **Produção de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) por *Cunninghamella elegans* ucp 542 em substratos alternativos**. 2011. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

STASHENKO, Elena E.; JARAMILLO, Beatriz E.; MARTÍNEZ, Jairo R. **Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae**. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, v. 27, n. 105, p. 579-597, 2003.

STEFANINI, Mirian Baptista; RODRIGUES, Selma Dzimidas; MING, Lin Chau. **Ação de fitorreguladores no crescimento da erva-cidreira-brasileira**. *Horticultura brasileira*, v. 20, p. 18-23, 2002.

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

STROBEL, G.; DAISY, B. **Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, n. 67, p. 491–502. 2003.

TAN, Ren Xiang; ZOU, Wen Xin. **Endophytes: a rich source of functional metabolites**. *Natural product reports*, v. 18, n. 4, p. 448-459, 2001.

TOMIOTTO-PELLISSIER, Fernanda et al. **Caryocar coriaceum extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion: Leishmanicidal effect of *Caryocar coriaceum* leaf extracts**. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 98, p. 662-672, 2018.

VAINER, A. G. **Ordenamento territorial e conflitos no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba**. V Encontro Nacional da Anppas, Florianópolis – SC. Florianópolis-SC, p. 01-20, 2010.

VAN MEERLOO, Johan; KASPERS, Gertjan JL; CLOOS, Jacqueline. **Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: Cancer cell culture**. Humana Press, 2011. p. 237-245.

VARALAKSHMI, V.; RAJU, K. Jaya. **Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* mtcc 1782 using bajra seed flour under solid state fermentation**. *Int J Res Eng Technol*, v. 2, n. 09, p. 121-129, 2013.

VARGA, J. . **Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species.** European Journal of Plant Pathology, Dordrecht, v. 110, p. 627–640, 2004.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** Química Nova, 29 v., n. 2, p. 326-337. 2006.

VISAGIE, C. M. . **Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*).** Studies in Mycology, v.78, p.1–61. 2014.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importancia.** Embrapa Clima Temperado. Pelotas, RS. 2010.

Wang QX, Li S, Zhao F, Dai H, Bao L, Ding R, et al. **Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*.** Fitoterapia 2011; 82(5):777-81.

Wang S, Li XM, Teuscher F, Li DL, Diesel A, Ebel R, et al. **Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative, and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endo-phytic fungus derived from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*.** J Nat Prod 2006; 69(11):1622-1625.

YUNES, R. A.; Calixto, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** 1ª ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001, cap. 1; Quim. Nova 2001, 24, 147.

ZAPPI, DANIELA C. et al. **Lista das plantas vasculares de Catolés, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil.** Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, p. 345-398, 2003.