



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

CAMPUS UFRJ-MACAÉ

CURSO DE FARMÁCIA



Avaliação da atividade antimicrobiana e efeito citotóxico de extratos de fungos endofíticos associados à *Humiria balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill.

KATHARINE FIDELIS DA SILVA KELLY

Macaé

Setembro de 2014

KATHARINE FIDELIS DA SILVA KELLY

Título: Avaliação da atividade antimicrobiana e efeito citotóxico de extratos de fungos endofíticos associados à *Humiria balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill.

Monografia Apresentada ao Curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – *Campus Macaé* como um dos requisitos para obtenção do título de farmacêutico

Nome do orientador: Prof^a Dr^a
Denise Oliveira Guimarães

Nome do co-orientador: Prof^a Dr^a
Michelle Frazão Muzitano

Macaé

Setembro de 2014

Agradecimentos

À Deus, que me proporcionou a realização deste grande sonho.

Aos meus pais, Lucia e Alberto, os grandes responsáveis por chegar onde estou hoje. Obrigada pelo investimento realizado, as palavras de encorajamento, as orações. Não sei o que seria da minha vida sem vocês.

À minha irmã, Rafaela, e a todos os meus familiares, que mesmo de longe nunca deixaram de mandar energias positivas.

Às professoras Denise Oliveira Guimarães e Michelle Frazão Muzitano, pela oportunidade que me deram de desenvolver este trabalho, os ensinamentos, a paciência e dedicação nesses anos.

Aos meus amigos e companheiros do LaProN, por toda convivência, amizades, bons momentos, conversas e todo apoio. Sentirei saudades.

Aos amigos conquistados na graduação, principalmente a Juliana Nascimento, Mayara Louback, Rafaela Dionísio e Vanessa Reis. Obrigada por permanecerem comigo desde o primeiro período de faculdade, sempre apoiando e ajudando. Juntas vivemos momentos inesquecíveis. República das Borboletas para sempre.

Às amigas Roberta e Vanessinha, que mesmo com toda distância, compartilharam comigo os momentos bons e ruins da faculdade. Obrigada por não deixarem nossa amizade morrer.

Ao Diogo, essa pessoa tão especial que surgiu em minha vida. Obrigada por toda paciência e dedicação nesses últimos meses. Todo seu apoio foi essencial nessa reta final. Essa conquista também é sua. Te amo muito.

*“O verdadeiro homem mede a sua
força, quando se defronta com o
obstáculo.”*

(Antonie de Saint-Exupéry)

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química dos antibióticos clássicos	03
Figura 2: Fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2010	06
Figura 3: Estrutura química de exemplos de fármacos antitumorais e antimicrobianos derivados de fontes naturais	07
Figura 4: Foto das partes aéreas da espécie <i>Humiria balsamifera</i> (Aubl.) A. St. Hill.	13
Figura 5: Esquema do processo de partição líquido-líquido a partir do extrato etanólico de arroz	22
Figura 6: Cromatografia em coluna de fase normal da fração AcOEt	23
Figura 7: Fungos endofíticos isolados de <i>Humiria balsamifera</i> (Aubl.) A. St. Hill. utilizados no trabalho	27
Figura 8: Placas com ensaio de CIM	31
Figura 9: Estrutura química do metabólico secundário guanacastepeno A	32
Figura 10: Resultado do ensaio de atividade citotóxica de EEA em células HCT-116 (côlon-humano)	33
Figura 11: Análise das frações por CCD	35
Figura 12: Cromatografia de camada delgada da sub-fração Fr 24-27 após revelação com sulfato cérico	37
Figura 13: Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da sub-fração Fr 24-27	39
Figura 14: Picos majoritários presentes no cromatograma por CLAE-DAD da sub-fração Fr 24-27 no comprimento de onda de 254 nm	40
Figura 15: Dados de tempos de retenção, área, altura relativa de cada pico observado no cromatograma em 254 nm.	41
Figura 16: Espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fr 24-27	42
Figura 17: Espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fr 24-27 com sinais de hidrogênios aromáticos, carbinólicos e alifáticos	43
Figura 18: Espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fp utilizando solvente CDCl_3	45
Figura 19: Espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fp utilizando solvente MeOD	46
Figura 20: Espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fa	47

Lista de Tabelas

Tabela 1: Metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos	10
Tabela 2: Esquema do CIM realizado frente à <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Tabela 3: Fases móveis utilizadas para o fracionamento cromatográfico da fração AcOEt e as correspondentes sub-frações obtidas	24
Tabela 4: Protocolo de eluição adotado para análise em CLAE-DAD	26
Tabela 5: Quantidades obtidas (g) dos extratos etanólicos de arroz	29
Tabela 6: Rendimento após partição líquido-líquido	34
Tabela 7: Sub-frações da coluna cromatográfica da fração AcOEt e seus respectivos rendimentos	36
Tabela 8: Sub-frações da coluna cromatográfica da sub-fração Fr 24-27 e seus respectivos rendimentos	37
Tabela 9: Sub-frações da cromatografia semi-preparativa da sub-fração RF 4-6	38

Lista de Abreviações

INCA: Instituto Nacional de Câncer

IARC: *International Agency for Research on Cancer*; Agência Internacional para Pesquisa de Câncer

OMS: Organização Mundial de Saúde

®: Marca registrada

PARNA de Jurubatiba: Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

LaProN: Laboratório de Produtos Naturais

CIM: Concentração Inibitória Mínima

BDA: Batata Dextrose Ágar

DMSO: Dimetilsulfóxido

MH-caldo: Caldo Müeller-Hinton

MH-ágar: Ágar Müeller-Hinton

Atb: Antibiótico

EEA: Extrato Etanólico de Arroz

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

MeOH: Metanol

HXA: Hexano

AcOEt: Acetato de Etila

BuOH: Butanol

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

¹H-RMN: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

CLAE-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos

TR: Tempo de retenção

CDCl₃: Clorofórmio deuterado

MeOD: Metanol deuterado

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CÂNCER	1
1.2. DOENÇAS MICROBIANAS	3
1.3. PRODUTOS NATURAIS – FONTE DE FÁRMACOS	5
1.4. PRODUTOS NATURAIS MICROBIANOS – FONTE DE FÁRMACOS ANTITUMORAIS E ANTIMICROBIANOS	8
1.5. MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS	9
1.6. BIODIVERSIDADE DO PARQUE NACIONAL DA RESTINGA DE JURUBATIBA	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. OBJETIVO GERAL	15
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. MATERIAIS	16
4.1.1. EQUIPAMENTOS	16
4.1.2. FASES ESTACIONÁRIAS	16
4.1.3. MEIOS DE CULTURA	16
4.1.4. SOLVENTES	17
4.1.5. VIDRARIA	17
4.1.6. OUTROS	17
4.2. MÉTODOS	17
4.2.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL, ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS E CULTIVOS EM MEIO SÓLIDO DE ARROZ	17
4.2.2. ANÁLISE DO PERFIL BIOLÓGICO	18
4.2.2.1. Ensaio antimicrobiano pelo método de microdiluição em caldo: Concentração Inibitória Mínima	18
4.2.2.2. Preparação das Amostras	18
4.2.2.3. Preparação dos Antibióticos Utilizados	18
4.2.2.4. Preparação do Inóculo	18
4.2.2.5. Ensaio	19
4.2.2.6. Ensaio do Efeito Citotóxico em Células Tumorais	21
4.2.3. ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO	21
4.2.3.1. Partição Líquido-Líquido a Partir do Extrato Etanólico de Arroz de HB11b	21
4.2.3.2. Análise por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	22
4.2.3.3. Fracionamento Químico	23
4.2.3.3.1. Isolamento dos Constituintes Químicos da Fração AcOEt	23

4.2.3.3.1.1. Preparo da Fase Estacionária	23
4.2.3.3.1.2. Preparo da Fase Móvel	24
4.2.3.3.2. Isolamento dos Constituintes Químicos da Sub-fração Fr 24-27	24
4.2.3.3.2.1. Preparação da Fase Estacionária	24
4.2.3.3.2.2. Preparação da Fase Móvel	25
4.2.3.3.3. Isolamento dos Constituintes Químicos da Sub-fração RF 4-6	25
4.2.3.3.3.1. Preparação da Fase Estacionária	25
4.2.3.3.3.2. Preparação da Fase Móvel	25
4.2.3.3.3.3. Isolamento dos Constituintes Químicos	25
4.2.3.4. Identificação dos Constituintes Químicos Isolados	26
4.2.3.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)	26
4.2.3.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹ H	26

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **27**

5.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	27
5.2. CULTIVOS EM MEIO SÓLIDO DE ARROZ	28
5.3. ANÁLISE DO PERFIL BIOLÓGICO	29
5.3.1. ENSAIO ANTIMICROBIANO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA	29
5.3.2. ENSAIO DE ATIVIDADE CITOTÓXICA	32
5.4. ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO	34
5.4.1. PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO A PARTIR DO EXTRATO ETANÓLICO DE ARROZ DE HB11B	34
5.5. FRACIONAMENTO QUÍMICO	35
5.5.1. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FRAÇÃO ACOET	35
5.5.2. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA SUB-FRAÇÃO FR 24-27	37
5.5.3. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA SUB-FRAÇÃO RF 4-6	38
5.6. IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS	38
5.6.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD)	38
5.6.2. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ¹ H	41

6. CONCLUSÃO **49**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **50**

ANEXOS **57**

ANEXO 1	57
ANEXO 2	59

Resumo

Micro-organismos endofíticos são aqueles detectados em um momento particular associados à tecidos da planta hospedeira aparentemente saudável, sem causar prejuízos imediatos. São responsáveis pelo fornecimento de substâncias bioativas. A pesquisa por metabólitos produzidos por micro-organismos tem uma história mais recente quando comparada aos produtos de origem vegetal. Visto que a resistência adquirida aos medicamentos existentes é encontrada na maioria dos pacientes, a busca por novos agentes terapêuticos para os diferentes tipos de câncer e doenças microbianas é um dos assuntos de grande interesse na atualidade. Desta forma, visando contribuir para a identificação de novas substâncias bioativas, o objetivo deste trabalho foi a avaliação de extratos de fungos endofíticos, associados a espécie vegetal *Humiria balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill, quanto à atividade antimicrobiana e efeito citotóxico. As partes aéreas de *H. balsamifera* foram coletadas na Restinga de Jurubatiba para o isolamento dos fungos endofíticos. Os fungos isolados foram submetidos a cultivo em meio sólido de arroz para obtenção dos extratos etanólicos de arroz (EEA). As análises do perfil biológico desses extratos foram realizadas em ensaio para atividade citotóxica em cultura de linhagem de câncer de cólon HCT-116, onde o EEA do fungo HB11b apresentou a maior atividade dentre os extratos testados (concentração 50 µg/mL inibiu aproximadamente 50%). Este extrato foi submetido a processos de purificação por técnicas cromatográficas para o isolamento de substâncias bioativas. A avaliação das atividades antimicrobianas pelo ensaio de concentração inibitória mínima – CIM dos EEAs foi realizada frente a bactérias patogênicas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus saprophyticus*; e Gram-Negativa *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Nenhuma atividade antimicrobiana significativa foi encontrada na maior concentração testada de 400 µg/mL.

Palavras chave: Produtos naturais, fungos endofíticos, *Humiria balsamifera*, citotoxidez, atividade antimicrobiana, resistência.

1. Introdução

1.1. Câncer

A palavra câncer é oriunda do grego *karkinos* significando caranguejo, e foi utilizada pela primeira vez por Hipócrates, o pai da medicina. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), câncer é o conjunto de mais de 100 doenças que se caracterizam pelo crescimento e disseminação desordenada de formas anômalas de células do próprio corpo, que invadem tecidos e órgãos, podendo sofrer metástase para outras regiões (BRASIL, 2011). É uma doença que se inicia por condições multifatoriais, onde os fatores causais podem estar agindo em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover a doença (carcinogênese) (BRASIL, 2013).

O crescimento das células cancerosas se diferencia do crescimento das células normais, pois ao invés de sofrerem apoptose, estas permanecem crescendo de maneira rápida e incontrolável, levando ao acarretamento de transtornos funcionais. O câncer, uma neoplasia maligna ou tumor maligno, é um destes transtornos.

As estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa de Câncer (IARC – *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial de Saúde (OMS), apontam que surgiram 14,1 milhões de casos novos de câncer e aproximadamente 8,2 milhões de mortes pela doença, no mundo inteiro, no ano de 2012. Acredita-se que estes números continuarão aumentando nos países em desenvolvimento e muito mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem aplicadas. (BRASIL, 2013).

O aumento do número de novos casos de câncer no Brasil vem crescendo nas últimas décadas, destacando a importância da doença e o seu impacto social e econômico. A urbanização e a industrialização estão entre os principais fatores associados a esse aumento de novos casos da doença (BITTENCOURT *et al.*, 2004). Estima-se que para o ano de 2014 ocorram aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, mostrando a magnitude desta doença no país. O câncer do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira (182 mil novos casos), seguidos pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo de útero (15 mil) (BRASIL, 2013).

Desconsiderando os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 394 mil novos casos da doença, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para o sexo feminino. Na população masculina os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e mama, cólon e reto, colo de útero, pulmão e glândula de tireoide nas mulheres (BRASIL, 2013).

No tratamento eficaz da doença têm-se utilizado esquemas terapêuticos juntamente com a cirurgia, radioterapia e quimioterapia (FRANKS, 1990; GUIDA *et al.*, 2008; REINER *et al.*, 2009). A cirurgia e a radioterapia são eficazes no tratamento de tumores sólidos, porém no tratamento de tumores disseminados atuam apenas como paliativos. Nos casos em que isso ocorre, a quimioterapia se torna o tratamento de escolha, entretanto seu efeito tóxico sobre os tecidos normais geralmente limita sua utilização (BAXEVANIS *et al.*, 2009).

Na cirurgia oncológica curativa ocorre a remoção do tumor, de sua drenagem linfática, dos linfonodos locais e do tecido normal, em quantidade suficiente, com o intuito de manter uma margem de segurança adequada (FRANKS, 1990).

A radioterapia consiste em um método capaz de destruir as células tumorais empregando-se feixes de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido capaz de englobar o tumor, objetivando irradiar todas as células tumorais, buscando causar o menor dano possível às células normais vizinhas (BRASIL, 2007).

Na quimioterapia são utilizados medicamentos com o objetivo de destruir as células cancerosas impedindo seu desenvolvimento. Estes medicamentos são, em grande parte, oriundos de derivados de plantas, organismos marinhos e micro-organismos (DE MESQUITA, 2009).

Um problema muito importante da terapia antineoplásica é a resistência adquirida aos medicamentos, podendo também ocorrer o fenótipo MDR, que consiste na resistência múltipla aos quimioterápicos. Diversos mecanismos explicam o desenvolvimento da resistência, dentre eles estão: aumento do potencial anti-apoptótico das células antitumorais, incremento do mecanismo de reparo do DNA e interferências no transporte do medicamento pelas proteínas de transporte (proteínas ABC) capazes de promover o efluxo do medicamento das células alvo (DE MESQUITA, 2009).

1.2. Doenças Microbianas

As doenças microbianas também são alvos constantes de estudos devido ao acarretamento de mortes e à expressiva morbidade que elas representam. Além disso, estão relacionadas à resistência, devido, principalmente, ao uso inadequado de medicamentos antimicrobianos. (WANNMACHER, 2004).

O surgimento de cepas resistentes aconteceu principalmente após a Segunda Guerra Mundial, onde houve o uso excessivo de penicilina, desencadeando o surgimento das primeiras cepas de bactérias Gram-positivas não suscetíveis ao antibiótico. Os antibióticos lançados nos anos seguintes, como os análogos penicilínicos meticilina e cefalosporina, além de tetraciclina e eritromicina (**Figura 1**), aos poucos foram se tornando limitados, devido a resistência múltipla em cepas de enterococos e estafilococos infecciosos (SILVEIRA *et al.*, 2006).

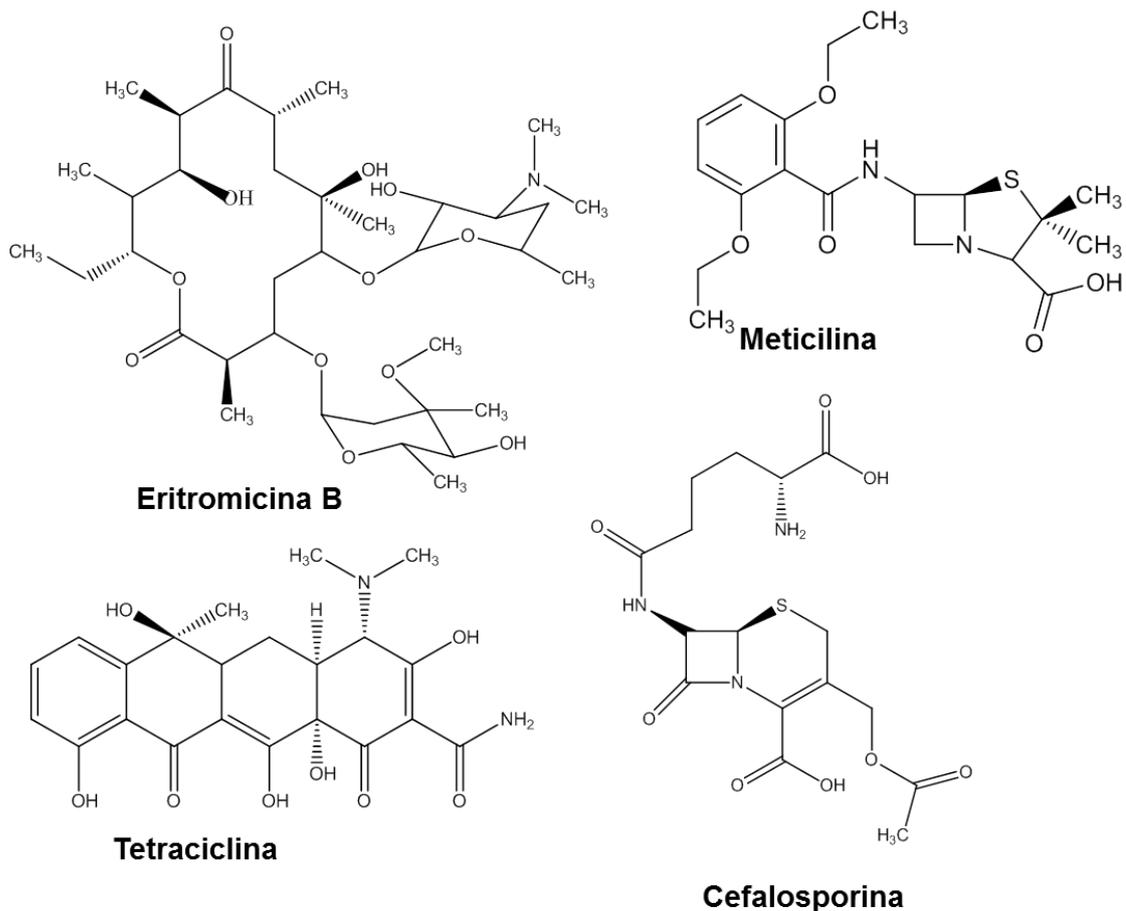


Figura 1: Estrutura química dos antibióticos clássicos (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Nas últimas décadas, a procura por novos agentes anti-infecciosos tem sido foco de novas pesquisas (RÍOS e RECIO, 2005) e, os produtos naturais têm se destacado como fonte pra descoberta de novos medicamentos antimicrobianos (BIBI, 2011).

Uma das razões mais importantes para estudar novos fármacos e os micro-organismos é entender as doenças que esses provocam e as formas de controlá-las, visto que a relação entre muitos micro-organismos e as doenças por eles causadas não é simples. Especificamente a maioria dos micro-organismos não causa uma única e definida doença, pois é mais comum que eles participem de muitas manifestações, por exemplo, o *Staphylococcus aureus* que está relacionado a endocardite, pneumonia, infecções em ferimentos e intoxicação alimentar. Há também os micro-organismos capazes de provocar a mesma doença, por exemplo, a meningite que pode ser causada por vírus, bactérias, fungos e parasitas (MURRAY *et al.*, 2006).

O corpo humano é adaptado a controlar a exposição a micro-organismos patogênicos através de barreiras físicas que são capazes de prevenir a invasão, visto que as respostas inatas reconhecem padrões moleculares nos componentes microbianos e ativam defesas locais e respostas imunes específicas, marcando o micro-organismo a ser eliminado. Contudo essa resposta imunológica é, infelizmente, tardia ou muito lenta. Para aumentar a capacidade do corpo humano de prevenir infecções ocorre a estimulação do sistema imune através da transferência passiva de anticorpos em preparados de imunoglobulina ou pela imunização ativa com componentes de micro-organismos, que são os antígenos. Além disso, as infecções também podem ser controladas com uma variedade de agentes quimioterápicos: os antimicrobianos (MURRAY *et al.*, 2006).

Os micro-organismos têm a capacidade de alterar sua estrutura antigênica (variação antigênica) e por isso desenvolvem resistência aos mais potentes antibióticos, dificultando assim o tratamento das doenças. Para o correto planejamento do tratamento para doenças microbianas deve-se avaliar a virulência do organismo, o local da infecção e a capacidade do paciente em responder a esta infecção, pois estes influenciam a interação parasito-hospedeiro (MURRAY *et al.*, 2006).

1.3. Produtos Naturais – Fonte de Fármacos

A busca por novos agentes terapêuticos para os diferentes tipos de câncer e doenças microbianas é um dos assuntos de grande interesse na atualidade da pesquisa de produtos naturais. A resistência adquirida aos medicamentos existentes é encontrada na maioria dos pacientes, sendo o principal responsável por problemas clínicos que limitam a eficácia do tratamento (DE MESQUITA, 2009). Devido a isto, os produtos naturais possuem um papel importante nas pesquisas de novos fármacos, visto a grande diversidade de atividades biológicas já atribuídas aos produtos naturais (BAKER *et al.*, 2007; HARVEY, 2007).

Classificam-se como produtos naturais as substâncias que se originam do metabolismo secundário de plantas, micro-organismos e algas, produzidas em contexto ou situação particulares (CLARDY & WALSH, 2004; BAKER *et al.*, 2007). Alguns autores estimam que essas substâncias tenham um alto valor ecológico em virtude das suas capacidades em aumentar a adaptação do indivíduo devido possuírem diversas atividades biológicas, por exemplo, atividade antibacteriana, antifúngica e inseticida. Além disso, algumas substâncias também possuem a capacidade de influenciar positivamente no crescimento e reprodução dos indivíduos (BAKER *et al.*, 2007; VERMA *et al.*, 2009).

Os produtos naturais destacam-se na descoberta de novos fármacos. Uma análise realizada com os fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2010 mostrou que os produtos naturais ou derivados de produtos naturais (substâncias modificadas chamadas de semi-sintéticas) compreendem 25% de todas as pequenas moléculas consideradas novos grupos químicos e 23% destes grupos químicos são semelhantes a produtos naturais ou tiveram sua síntese baseada em grupos farmacofóricos relacionados a produtos naturais como é possível observar na **Figura 2** (NEWMAN & CRAGG, 2012).

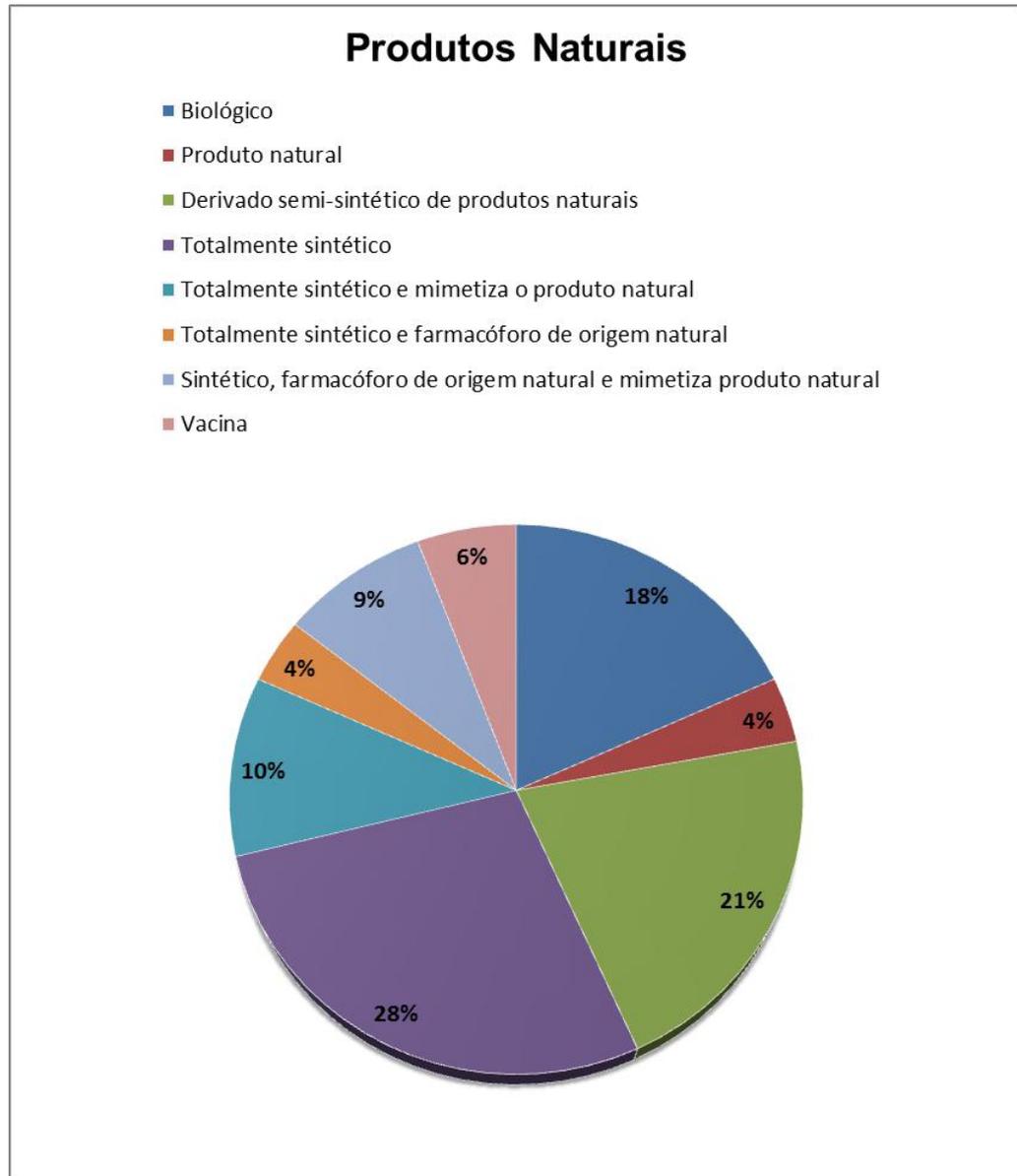


Figura 2: Fármacos desenvolvidos entre 1981 e 2010 (NEWMAN & CRAGG, 2012).

Pesquisas em produtos naturais têm resultado no desenvolvimento de diversos fármacos utilizados na atualidade, por exemplo, no controle de doenças infecciosas, câncer e doenças hipertensivas, destacando assim a importância dos produtos naturais na terapêutica (CLARDY & WALSH, 2004; GULLO *et al.*, 2006). Nas áreas de câncer e doenças infecciosas, por exemplo, 60% e 75% dos novos fármacos originaram-se de produtos naturais, respectivamente (GULLO *et al.*, 2006). A **Figura 3** mostra alguns exemplos de fármacos antitumorais e antimicrobianos derivados de fontes naturais.

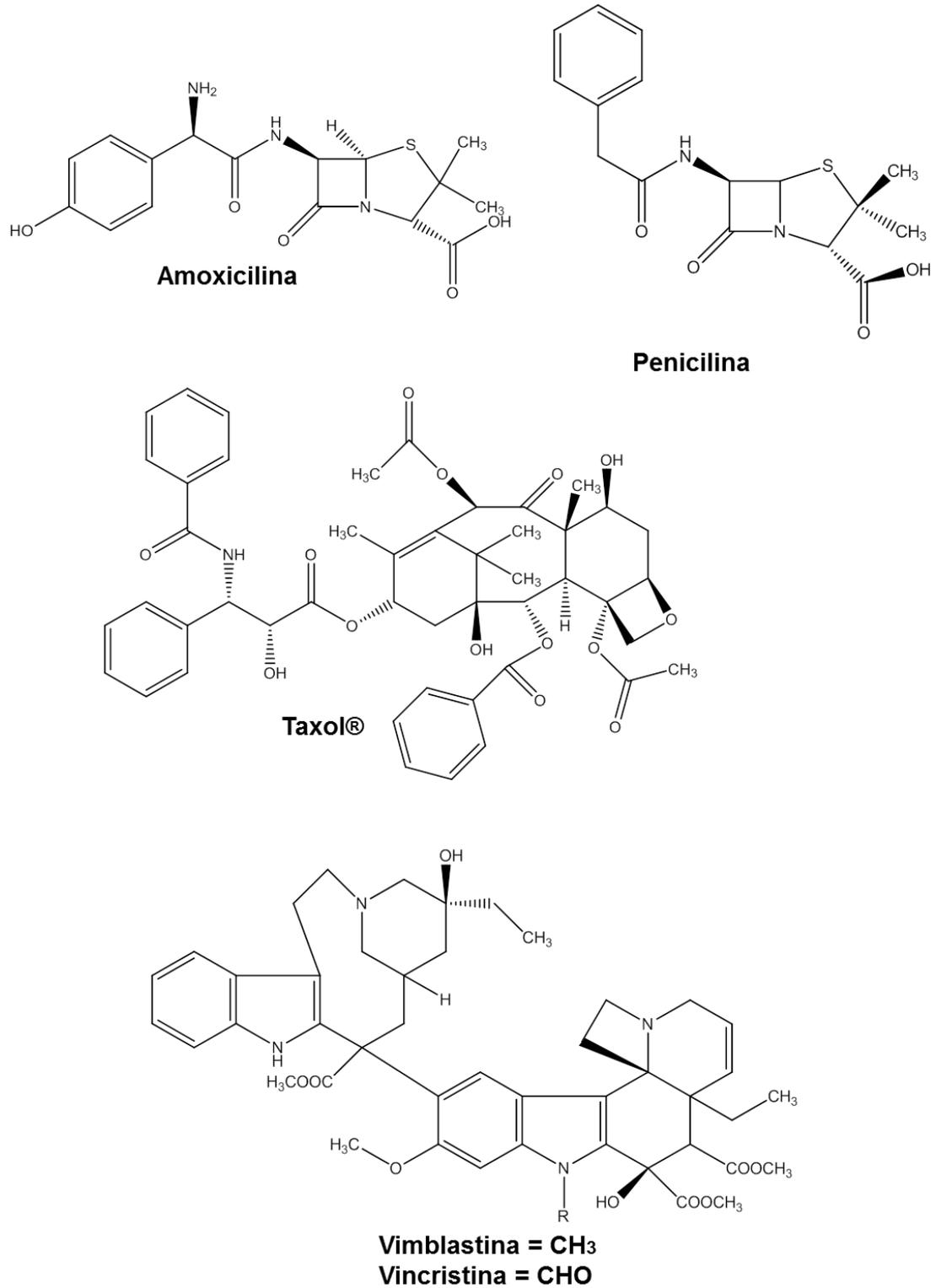


Figura 3: Estrutura química de exemplos de fármacos antitumorais e antimicrobianos derivados de fontes naturais. Amoxicilina e Penicilina: Atividade antibacteriana; Taxol®, Vimblastina e Vincristina: Atividade antitumoral.

1.4. Produtos Naturais Microbianos – Fonte de Fármacos Antitumorais e Antimicrobianos

A pesquisa por metabólitos produzidos por micro-organismos tem uma história mais recente quando comparada aos produtos de origem vegetal. Fleming, em 1928, revolucionou o tratamento de doenças infecciosas, ao verificar a inibição de uma cultura bacteriana de *Staphylococcus* pela ação de um fungo, posteriormente identificado como pertencente ao gênero *Penicillium*, surgindo assim a penicilina (BASHYAL *et al.*, 2005). Inicialmente esta descoberta não despertou muitos interesses, porém com a Segunda Guerra Mundial, em 1939, despertou-se o interesse em pesquisar o valor quimioterápico da penicilina. Em seguida, em 1942, um incêndio numa biblioteca em Boston, EUA, tornou a penicilina a “droga milagrosa”, mostrando assim sua ótima eficácia contra infecções de pele associadas às queimaduras resultantes do incêndio (PORTUGUAL, 2014). Estes acontecimentos levaram os pesquisadores da academia e das indústrias farmacêuticas a intensificarem a procura de produtos bioativos derivados de micro-organismos (MOREIRA, 2013).

Outro marcante exemplo foi a identificação do antitumoral Taxol® (**Figura 3**) (Paclitaxel) do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado de *Taxus brevifolia* (Taxaceae). Estima-se que 38.000 árvores sejam necessárias para gerar 25 Kg do fármaco, tratando apenas 12.000 pessoas. Um quilograma de Paclitaxel é extraído a partir de 10.000 Kg de casca. A produção do Taxol® também já foi observada em outros fungos endofíticos. Sabe-se que o gene 10-desacetilbacatina-III-10-O-acetil transferase, presente no fungo endofítico *Cladosporium cladosporioides* MD2 isolado de *Taxus media*, está envolvido na via de biossíntese deste fármaco e possui 99% de identidade com o gene de *T. media* (planta) e 97% com o gene de *Taxus wallichiana* var. *marirei* (planta) (CHANDRA, 2012). Porém é importante ressaltar que estudos de otimização ainda estão sendo realizados para chegar à uma produção eficiente em larga escala produzida pelo fungo. Devido a estas limitações relacionadas com a produtividade e vulnerabilidade das espécies vegetais como fonte de metabólitos, os micro-organismos ultimamente vêm sendo utilizados, visto que são facilmente renováveis, de fácil reprodutibilidade e fonte inesgotável de novas estruturas que possuem potencial farmacológico. Os micro-organismos, principalmente fungos, têm sido considerados como uma fonte importante de metabólitos ativos com atividade antibacteriana, antimicótica, antiviral

e antitumoral promissoras (CHANDRA, 2012). No mercado farmacêutico existem diversos medicamentos oriundos de micro-organismos que foram promissores para produção em larga escala, por exemplo, o *Penicillium chrysogenum* após modificações genéticas, aumentou a produção de penicilina cerca de 25 mil vezes em relação à linhagem original. A clonagem de genes humanos na bactéria *Escherichia coli* possibilitou a obtenção de insulina mais barata quando comparada com os métodos tradicionais. (LOPES *et al.*, 2011).

1.5. Micro-organismos Endofíticos

Os micro-organismos endofíticos pertencem a uma biota que vem sendo estudada e estão apresentando resultados surpreendentes em termos de produção de metabólitos bioativos (CLARDY & WALSH, 2004; VERMA *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2011). A este grupo de micro-organismos incluem-se os protistas, e principalmente as bactérias e os fungos (MOREIRA, 2013).

Micro-organismos endofíticos são definidos como micro-organismos que habitam o interior de plantas, de modo geral, partes aéreas, como folhas e caules, passando toda ou parte de sua vida colonizando tecidos saudáveis de uma determinada planta, inter- ou intracelularmente, em simbiose (SCHULZ & BOYLE, 2005; GUNATILAKA, 2006; GUO *et al.*, 2008; SCHNEIDER *et al.*, 2008). Eles diferenciam-se dos micro-organismos fitopatogênicos e epifíticos, que são prejudiciais as plantas, causando-lhes doenças e que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais, respectivamente. Porém essa diferença é considerada didática para alguns autores, visto que pode ocorrer sobreposição entre os grupos microbianos (AZEVEDO, 1999).

Os verdadeiros micro-organismos endofíticos estão diretamente associados com a sanidade de seus hospedeiros, favorecendo a estes benefícios através da produção, introdução ou inibição de metabólitos primários e/ou secundários, com funções biológicas, por exemplo, fito-hormônios, herbicidas, antimicrobianos, regulação do estresse abiótico, biorremediadores e vetores gênicos (CONTI *et al.*, 2012).

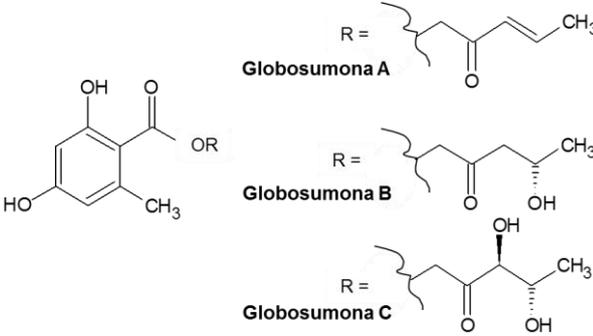
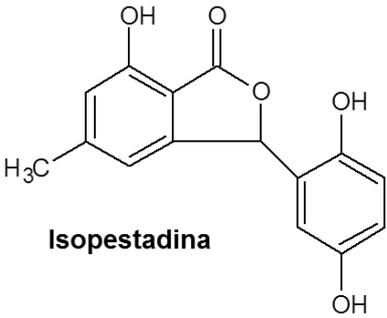
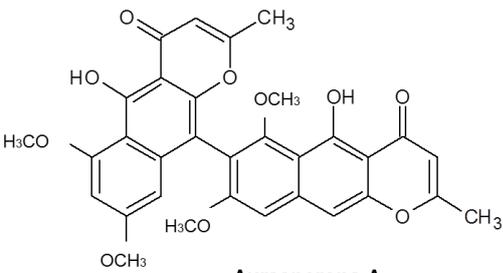
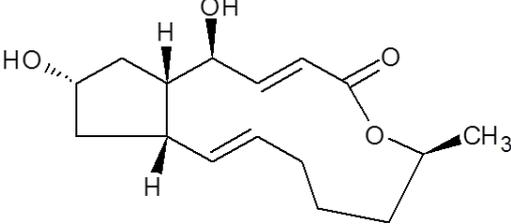
A ocorrência de fungos endofíticos em plantas contabiliza cerca de 1,5 milhões de espécies. Desse total, apenas 10% foram descobertos e estudados até o momento e só 1% examinado quanto aos seus metabólitos secundários (GUO *et al.*, 2008). Estudos recentes apontam uma nova estimativa para a ocorrência desse tipo de fungo, de aproximadamente 5,1 milhões de espécies (BLACKWELL, 2011).

A caracterização química e avaliação biológica dos metabólitos secundários oriundos de micro-organismos endofíticos vêm sendo estudados, apontando novas estruturas e atividades biológicas promissoras (STROBEL *et al.*, 2005; GUNATILAKA, 2006; GUO *et al.*, 2008). As principais classes de metabólitos secundários encontradas são: alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides, lignanas, peptídeos, esteroides, xantonas, fenóis, isocumarinas, quinonas, terpenoides, citocalasinas, compostos alifáticos e clorados (GALLO *et al.*, 2008; GUO *et al.*, 2008). As atividades biológicas promissoras também são diversas: antibióticas, antitumoral, anti-viral, antioxidantes, imunossupressoras, anti-helmínticos, inseticidas, etc (STROBEL *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2008).

Além do Taxol®, recentemente, outros produtos naturais antitumorais também foram isolados de fungos endofíticos associados aos respectivos hospedeiros vegetais, são estes: vincristina, isolada a partir do fungo endofítico *Mycella sterilia* associado a *Catharanthus roseus* (O'BRIEN *et al.*, 2011); camptotecina, isolada de um fungo endofítico não identificado encontrado em associação com *Nothapodytes foetida* (MORAN, 2006); podofiloxina, isolada a partir do fungo endofítico *Trametes hirsuta*, associado ao hospedeiro *Podophyllum hexandrum* (SELOSSE *et al.*, 2004) e hiperecina, isolada do fungo endofítico INFU/Hp/KF/34B, associado a *Hypericum perforatum* (BORGES *et al.*, 2009).

Diversos metabólitos já foram isolados de fungos endofíticos secundários com atividade antimicrobiana e citotóxica em células tumorais. A **Tabela 1** ilustra alguns metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos.

Tabela 1: Metabólitos secundários bioativos isolados de fungos endofíticos.

Fungo endofítico	Metabólito secundário / Atividade biológica	Referência
<i>Chaetomium globosum</i>	 <p>Globosumona A</p> <p>Globosumona B</p> <p>Globosumona C</p> <p>Atividade citotóxica</p>	BASHYAL <i>et al.</i> , 2005
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	 <p>Isopestadina</p> <p>Atividade antimicrobiana</p>	CASTILLO <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus niger</i>	 <p>Aurasperona A</p> <p>Atividade antimicrobiana</p>	LIU <i>et al.</i> , 2004
<i>Aspergillus clavatus</i>	 <p>Brefeldina A</p> <p>Atividade antifúngica e citotóxica</p>	WANG <i>et al.</i> , 2002

1.6. Biodiversidade do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba

Os micro-organismos endofíticos já foram encontrados em plantas pertencentes aos grupos pteridófitas, angiospermas, briófitas e gimnospermas (MOREIRA, 2013). Estes e outros grupos de plantas são encontrados no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PARNA de Jurubatiba), o que representa um nicho promissor para descoberta de novas substâncias oriundas de micro-organismos com atividades biológicas.

O PARNA de Jurubatiba, localizado na região Norte Fluminense, compreende os municípios de Macaé, Quissamã e Carapebus, estendendo-se por 44 quilômetros de litoral. Em sua composição têm-se um complexo de lagoas costeiras, restingas, brejos e cordões de mata, sendo uma região de grande diversidade de habitats e riqueza florística. Além disso, é formado por uma vegetação característica de restinga, com presença de espécies vegetais, restingas, dunas, praias, ilhas, costões, em distintas formações florestais (ESTEVES *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2004).

Já foram registradas 618 espécies vasculares no PARNA de Jurubatiba, que são distribuídas em 381 gêneros e 120 famílias. Dentre as espécies vegetais que compõem a restinga têm-se as famílias: Asteraceae, Myrtaceae, Rubiaceae, Bromeliaceae e Humiriaceae (DE OLIVEIRA, 2013).

Algumas dessas espécies vegetais vêm sendo estudadas pelo Laboratório de Produtos Naturais (LaProN), onde já foram isoladas e caracterizadas diversas substâncias e também realizadas avaliações das atividades biológicas. A *Humiria balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill (Humiriaceae), planta utilizada neste trabalho, é uma delas.

A família Humiriaceae pertence à classe das angiospermas, possui 8 gêneros e 36 espécies de acordo com a lista da flora do Brasil de 2012. No Brasil, podem ser encontradas no Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Os gêneros pertencentes a família Humiriaceae são: *Ectasia* Cuatrec.; *Endopleura* Cuatrec.; *Humiria* A.ST.-Hil.; *Humiriastrum* (Urb.) Cuatrec., *Hylocarpa* Cuatrec., *Sacoglottis* Mart., *Schistostemon* (Urb.) Cuatrec., *Vantanea* Aubl. (AMORIM & MEDEIROS, 2012).

Nas espécies da família Humiriaceae já foram encontradas substâncias que apresentam importantes atividades biológicas, por exemplo, inibição da COX-1 e

COX-2 em modelo *in vitro*, inibição de edema de orelha de rato *in vivo* induzido por fenilpropionato de etila, atividade antifúngica *in vitro* para células de microorganismos que causam infecções no aparelho reprodutor feminino, atividade antioxidante e atividade anti-helmíntica *in vitro* e *in vivo* (DE OLIVEIRA, 2013).

O gênero *Humiria* compreende 3 espécies: *Humiria balsamifera* (Aubl.) J.St.-Hill, *Humiria crassifolia* Mart. ex Urb. e *Humiria wurdackii* Cuatrec. de acordo com a lista da flora do Brasil de 2012 (DE OLIVEIRA, 2013).

Humiria balsamifera (Aubl.) A. St. Hill (**Figura 4**) é popularmente conhecida como umiri. O bálsamo da casca é utilizado popularmente na fabricação de perfumes, devido ao seu aroma agradável característico. Uma pesquisa da avaliação biológica das folhas e caules de *H. balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill apresentou significativo resultado quanto à atividade antimalárica (DA SILVA *et al.*, 2004).



Figura 4: Foto das partes aéreas da espécie *Humiria balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill. Fonte: Acervo de fotos do LaProN.

2. Justificativa

Na família Humiriaceae poucos membros foram estudados quanto a caracterização química e atividade biológica (DA SILVA *et al*, 2004), além disso, nenhum estudo sobre os micro-organismos endofíticos da família foi encontrado na literatura científica.

O número de novos casos de câncer e doenças microbianas vem crescendo nas últimas décadas, contudo a resistência aos medicamentos existentes pela maioria dos pacientes vem dificultando o tratamento dessas doenças.

A busca por novos agentes terapêuticos para os diferentes tipos de câncer e doenças microbianas oriundos de produtos naturais está aumentando. E desde que Fleming revolucionou o tratamento das doenças infecciosas através de metabólitos de um micro-organismo, estes começaram despertar interesse de pesquisa.

Por isso, este estudo é importante, visto que os micro-organismos endofíticos da espécie vegetal *Humiria balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill ainda não foram estudados e a resistência adquirida à maioria dos medicamentos existentes no tratamento do câncer e doenças microbianas. Adicionalmente, os achados deste trabalho poderão contribuir para estudos posteriores, além de valorizar a biodiversidade microbiana presente no Norte Fluminense.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Estudar o perfil químico e biológico de extratos dos fungos endofíticos associados a uma espécie vegetal da Restinga de Jurubatiba, a *Humiria balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de fungos endofíticos cultivados em arroz para atividade antimicrobiana (ensaio de concentração inibitória mínima – CIM) frente a bactérias patogênicas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 3538) e *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 153006) e Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).
- Avaliar a atividade antitumoral em ensaio citotóxico frente a cultura de linhagem de câncer de cólon HCT-116.
- Realizar processos de purificação por técnicas cromatográficas para o isolamento de substâncias bioativas, para o extrato mais promissor no ensaio citotóxico.
- Adquirir e realizar a análise preliminar de dados espectroscópicos das substâncias isoladas.

4. Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais (LaProN), com colaboração do Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, onde foi realizado o ensaio citotóxico, e do Laboratório Multiusuário de Análises por RMN (LAMAR) do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN/UFRJ), onde foi realizada a aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

4.1. Materiais

4.1.1. Equipamentos

Agitador de tubos (AP59); autoclave vertical (Prismac Autoclaves); balanças analíticas; capelas de fluxo laminar (TROX Modelo FLV Série 506); centrífuga; cromatógrafo Shimadzu Proeminence composto pelos seguintes módulos: bomba de gradiente quaternário modelo LC- 20AT, desgaseificador modelo DGU- 20A5, injetor automático modelo SIL- 20A, forno para colunas CTO- 20A, detector de arranjo de diodos modelo SPD- M20A interligados a uma controladora modelo CBM- 20A – o controle do equipamento e aquisição de dados foram obtidos com auxílio do software LC solutions versão 1.25; estufa bacteriológica (DeLeo); estufa de secagem; espectrofotômetro (Boit Ton); incubadora BOD (SL-20 SoLAB); mesa agitadora (shaker) (Ethik); placa de aquecimento; rotaevaporador.

4.1.2. Fases Estacionárias

Coluna para CLAE-DAD analítica de sílica C-18 (4.6 x 250 mm; 5 micras; Supelcosil); sephadex LH 20 (Sigma); sílica gel (Merck - 0,063-0,200 nm), sílica de fase normal em placa revestida de alumínio (SilicaPlate TLC Silicycle Ultrapure Silica Gels G1P 456).

4.1.3. Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados foram da marca Difco®, Himedia® e Merck®.

4.1.4. Solventes

Todos os solventes utilizados foram em grau de padrão analítico (PA) da marca Êxodo® e Vetec® e o dimetilsulfóxido da Panreac®. Os solventes de grau HPLC eram da marca Tedia®.

4.1.5. Vidraria

Béqueres; Erlenmeyers; balões de rotaevaporador; funis de separação; pipetas Pasteur; placas de Petri.

4.1.6. Outros

Alça de plástico; antibióticos penicilina (Sigma) e gentamicina (Gibco); colunas de vidro; filtro de HPLC; garrafas de vidro; pipetas automáticas; pipetas de vidro; placas de 96 poços; ponteiras plásticas; resazurina (Sigma); tubos tipo falcon.

4.2. Métodos

4.2.1. Coleta do Material Vegetal, Isolamento dos Fungos Endofíticos e Cultivos em Meio Sólido de Arroz

A espécie vegetal *H. balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill utilizada nesse trabalho foi coletada e identificada pela Professora Tatiana U. P. Konno, NUPEM-UFRJ-Macaé. O material vegetal foi devidamente identificado e a exsicata depositada no herbário da UFRJ-RJ sob o código RFA38751.

O isolamento dos fungos endofíticos e os cultivos em meio sólido de arroz estão descritos no Anexo 1.

4.2.2. Análise do Perfil Biológico

4.2.2.1. Ensaio antimicrobiano pelo método de microdiluição em caldo: Concentração Inibitória Mínima

A atividade em cultura dos extratos foi analisada através do ensaio de CIM, pelo método de microdiluição como recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003). Foram testadas cepas de bactérias Gram-Positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 3538) e *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 153006), e Gram-Negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa*. (ATCC 9027). Os ensaios foram realizados em duplicata em placas estéreis de 96 poços.

4.2.2.2. Preparação das Amostras

Os extratos foram inicialmente diluídos em dimetilsufóxido (DMSO) (0,008 mg/ μ L). Em seguida 10 μ L desta solução foi adicionada a 70 μ L de Mueller-Hinton-caldo (MH-caldo), tendo-se assim uma concentração de 0,001 mg/ μ L. Essa solução de 80 μ L obtida para cada extrato foi a utilizada no ensaio.

4.2.2.3. Preparação dos Antibióticos Utilizados

Os antibióticos penicilina e gentamicina foram utilizados como controles positivos para as bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas, respectivamente. Penicilina: 1,0 mg em 10 mL de água destilada; 1,0 mL dessa solução foi então diluído em 4,0 mL de MH-caldo. Gentamicina: 2,0 μ L (solução 50 mg/mL) foi diluído em 4,0 mL de MH-caldo.

4.2.2.4. Preparação do Inóculo

As cepas de bactérias cultivadas por 24 horas em Mueller-Hinton-ágar (MH-ágar), foram transferidas para um tubo contendo 5,0 mL de solução salina 0,9%. Padronizou-se estas suspensões comparando-se com a escala de McFarland 0,5 (10^8 unidades formadoras de colônias – UFC/mL). As suspensões adquiridas foram

diluídas na razão 1:10 em solução salina 0,9%, ou seja, 1,0 mL da suspensão para 9,0 mL de solução salina. Posteriormente 2 mL destas foram transferidas para um tubo contendo 9 mL de MH-caldo.

As suspensões finais foram então utilizadas como inóculo para o ensaio de CIM. A concentração final do inóculo utilizada foi de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL.

4.2.2.5. Ensaio

Em cada orifício da placa de 96 poços foram depositados um total de 100 μ L da mistura final contendo: MH-caldo, soluções das substâncias e suspensão do micro-organismo indicador. As amostras previamente preparadas foram testadas em diferentes concentrações obtidas por diluição seriada (400 – 25 μ g/mL) em MH-caldo, bem como os antibióticos (5,9 – 00115 μ g/mL), que foram utilizados como controle positivo. Foram realizados três controles de esterilidade: do sistema de solvente utilizado na solubilização das amostras ensaiadas (DMSO), da amostra e do meio de cultura. Também fez-se controle negativo do DMSO, a fim de verificar sua atividade antimicrobiana; e controle de viabilidade do inóculo. A **Tabela 2** ilustra as placas de 96 poços finais para o ensaio de CIM.

As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Posteriormente, foram adicionados em cada orifício 20 μ L do indicador redox resazurina na concentração de 0,02 mg/mL. As placas foram então encubadas por 30 minutos, sendo observada a mudança de coloração (azul). A cor azul (estado oxidado da resazurina) indica que há oxigênio no meio, concluindo-se que não houve crescimento de bactéria, indicando atividade antimicrobiana. A cor rosa (estado reduzido da resazurina) representa o crescimento da bactéria, portanto a amostra não foi considerada tendo atividade antimicrobiana (NERO *et al.*, 2000).

Tabela 2: Esquema do CIM realizado frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Fileiras A-D: extrato etanólico de arroz. Fileira E: antibiótico. Colunas de 1 a 5 e 7 a 11 nas fileiras A-D: concentração ($\mu\text{g/mL}$) das amostras, respectivamente: 400; 200; 100; 50; 25. Colunas 6 e 12 das fileiras A-D: controle de esterilidade das amostras. Colunas 1 a 10 da fileira E: concentração ($\mu\text{g/mL}$) do antibiótico, respectivamente: 5,9; 2,95; 1,48; 0,74; 0,37; 0,18; 0,092; 0,046; 0,023; 0,012. Coluna 12 da fileira E: controle de esterilidade do antibiótico. Colunas de 1 a 5 da fileira G: controle de atividade antimicrobiana do solvente (DMSO). Coluna 1 da fileira H: controle de esterilidade do meio de cultura. Coluna 6 da fileira H: controle de viabilidade do inóculo. Coluna 12 da fileira G: controle do sistema de solvente utilizado da solubilização da amostra (DMSO).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	80 μL caldo + 80 μL amostra + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL A1 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL A2 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL A3 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL A4 + 20 μL inóculo	20 μL caldo + 80 μL A5	80 μL caldo + 80 μL amostra + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL A7 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL A8 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL A9 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL A10 + 20 μL inóculo	20 μL caldo + 80 μL A11	
B	80 μL caldo + 80 μL amostra + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL B1 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL B2 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL B3 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL B4 + 20 μL inóculo	20 μL caldo + 80 μL B5	80 μL caldo + 80 μL amostra + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL B7 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL B8 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL B9 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL B10 + 20 μL inóculo	20 μL caldo + 80 μL B11	
C	80 μL caldo + 80 μL amostra + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL C1 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL C2 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL C3 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL C4 + 20 μL inóculo	20 μL caldo + 80 μL C5	80 μL caldo + 80 μL amostra + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL C7 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL C8 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL C9 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL C10 + 20 μL inóculo	20 μL caldo + 80 μL C11	
D	80 μL caldo + 80 μL amostra + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL D1 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL D2 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL D3 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL D4 + 20 μL inóculo	20 μL caldo + 80 μL D5	80 μL caldo + 80 μL amostra + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL D7 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL D8 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL D9 + 20 μL inóculo	80 μL caldo + 80 μL D10 + 20 μL inóculo	20 μL caldo + 80 μL D11	
E	59 μL caldo + 59 μL Atb + 21 μL caldo + 20 μL inóculo	59 μL caldo + 59 μL E1 + 21 μL caldo + 20 μL inóculo	59 μL caldo + 59 μL E2 + 21 μL caldo + 20 μL inóculo	59 μL caldo + 59 μL E3 + 21 μL caldo + 20 μL inóculo	59 μL caldo + 59 μL E4 + 21 μL caldo + 20 μL inóculo	59 μL caldo + 59 μL E5 + 21 μL caldo + 20 μL inóculo	59 μL caldo + 59 μL E6 + 21 μL caldo + 20 μL inóculo	59 μL caldo + 59 μL E7 + 21 μL caldo + 20 μL inóculo	59 μL caldo + 59 μL E8 + 21 μL caldo + 20 μL inóculo	59 μL caldo + 59 μL E9 + 21 μL caldo + 20 μL inóculo			41 μL caldo + 59 μL E10
F													
G	75 μL caldo + 5 μL DMSO + 20 μL inóculo	76 μL caldo + 4 μL DMSO + 20 μL inóculo	77 μL caldo + 3 μL DMSO + 20 μL inóculo	78 μL caldo + 2 μL DMSO + 20 μL inóculo	79 μL caldo + 1 μL DMSO + 20 μL inóculo							100 μL DMSO	
H	100 μL caldo					80 μL caldo + 20 μL inóculo							

4.2.2.6. Ensaio do Efeito Citotóxico em Células Tumorais

O ensaio citotóxico foi realizado pelo Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, descritos no Anexo 2.

A citotoxidez dos extratos foi determinada através de ensaio colorimétrico do MTT, que tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica que se baseia na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas (ALMEIDA *et al.*, 2014).

4.2.3. Análise do Perfil Químico

4.2.3.1. Partição Líquido-líquido a Partir do Extrato Etanólico de Arroz de HB11b

O EEA do HB11b, extrato mais ativo no ensaio citotóxico, foi ressuspense em 300 mL de solução metanol:água (MeOH:H₂O) (9:1), sendo, em seguida, realizado uma partição líquido-líquido iniciando-se com hexano (HXA) (3 x 100 mL), acetato de etila (AcOEt) (3 x 100 mL) e butanol (BuOH) (3 x 100 mL) (**Figura 5**). Antes da partição utilizando AcOEt foi realizado a concentração em rotaevaporador do MeOH utilizado inicialmente na ressuspensão da amostra, e após a mesma foi ressuspensa em MeOH:H₂O 1:9.

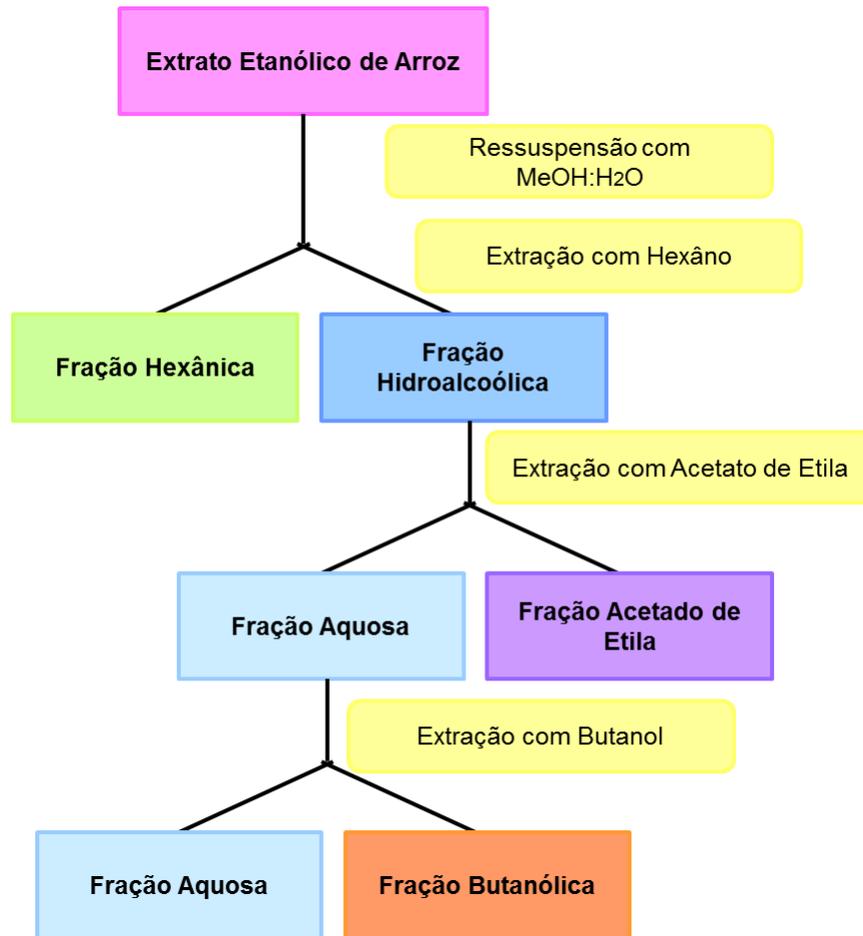


Figura 5: Esquema do processo de partição líquido-líquido a partir do extrato etanólico de arroz.

4.2.3.2. Análise por Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

As frações obtidas no processo de partição líquido-líquido foram analisadas por cromatografia de camada delgada utilizando-se sílica de fase normal em placa revestida de alumínio. Como eluente utilizou-se uma combinação HXA:AcOEt na proporção 7:3 e 3:7. As placas foram reveladas com vanilina sulfúrica.

4.2.3.3. Fracionamento Químico

4.2.3.3.1. Isolamento dos Constituintes Químicos da Fração AcOEt

4.2.3.3.1.1. Preparo da Fase Estacionária

Para o isolamento dos constituintes químicos majoritários da fração AcOEt do EEA de HB11b foi utilizada uma coluna cromatográfica de vidro utilizando-se fase normal constituída por sílica gel (Merck - 0,063-0,200 nm) como fase estacionária.

No desenvolvimento do processo cromatográfico, a sílica foi empacotada em HXA:AcOEt (7:3) preenchendo a coluna de 1,0 cm de diâmetro com 20 cm de sílica. Após o empacotamento adequado, a fração AcOEt do EEA de HB11b foi incorporada em um pouco de sílica seca e transferida para o topo da coluna de vidro formando a pastilha (**Figura 6**).



Figura 6: Cromatografia em coluna de fase normal da fração AcOEt.

4.2.3.3.1.2. Preparo da Fase Móvel

Durante o processo cromatográfico em coluna utilizou-se diferentes proporções de HXA:AcOEt. Na **Tabela 3** estão listadas as fases móveis e as respectivas frações obtidas. No total foram coletadas 73 sub-frações, que foram monitoradas quanto ao perfil químico por CCD. As placas de CCD foram reveladas utilizando sulfato cérico.

Tabela 3: Fases móveis utilizadas para o fracionamento cromatográfico da fração AcOEt e as correspondentes sub-frações obtidas.

Eluente	Sub-Frações
HXA:AcOEt 7:3	1-14
HXA:AcOEt 1:1	15-31
HXA:AcOEt 3:7	32-45
AcOEt 100%	46-62
MeOH 100%	62-73

Usou-se 150 mL de cada eluente.

4.2.3.3.2. Isolamento dos Constituintes Químicos da Sub-fração Fr 24-27

4.2.3.3.2.1. Preparação da Fase Estacionária

Para o isolamento dos constituintes químicos da sub-fração Fr 24-27 foi utilizada uma coluna cromatográfica de vidro utilizando-se Sephadex LH 20 como fase estacionária.

No desenvolvimento do processo cromatográfico, a Sephadex foi combinada com MeOH 100% (grau HPLC), preenchendo a coluna de 0,7 cm de diâmetro com 5 cm de Sephadex. Após o empacotamento, 6,3 mg da sub-fração Fr 24-27 foram ressuspensos em MeOH 100%, que foram aplicados no topo da coluna com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

4.2.3.3.2. Preparação da Fase Móvel

Durante o processo cromatográfico em coluna utilizou-se MeOH 100% como fase móvel. No total foram coletadas 38 frações, que foram monitoradas quanto ao perfil químico por CCD. As placas de CCD foram reveladas utilizando sulfato cérico.

4.2.3.3.3. Isolamento dos Constituintes Químicos da Sub-fração RF 4-6

4.2.3.3.3.1. Preparação da Fase Estacionária

Para o isolamento dos constituintes químicos da sub-fração RF 4-6 foi realizada uma cromatografia semi-preparativa utilizando uma placa de CCD (14 x 12 cm). No desenvolvimento do processo cromatográfico, a fração 4-6 foi ressuspensa em MeOH 100%, e foi aplicada totalmente na placa, de forma linear.

4.2.3.3.3.2. Preparação da Fase Móvel

Durante o processo cromatográfico em cromatoplaça utilizou- HXA/AcOEt 1:1 como fase móvel.

4.2.3.3.3.3. Isolamento dos Constituintes Químicos

Após observar a placa eluída sob luz UV cortou-se a placa em três partes, separando as substâncias isoladas. A sílica, então, foi removida da placa de alumínio, misturada com pequenas quantidades de MeOH (3x) e diclorometano (1x) e centrifugada. Em seguida, retirou-se o sobrenadante, e este então, foi filtrado e secado. Após este procedimento foi possível o isolamento de duas substâncias puras codificadas de Fp (polar) e Fa (apolar).

4.2.3.4. Identificação dos Constituintes Químicos Isolados

4.2.3.4.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

Para a análise da pureza a sub-fração identificada como Fr 24-27 proveniente da fração HXA:AcOEt 1:1 foi selecionada para injeção em CLAE-DAD após apresentar poucas bandas em CCD. Para realização desta análise utilizou-se o cromatógrafo equipado com detector de arranjo de diodos (CLAE-UV/DAD). Além disso, foi utilizada coluna analítica de sílica C-18 (4.6 x 250 mm; 5 micra; Supelcosil), vazão de 1,0 mL/min. Foi injetado 20 µL da amostra e a detecção foi feita a 254 e 365 nm, durante 30 min. Para eluição dos compostos utilizou-se o gradiente de água acidificada (pH 3,0) e acetonitrila conforme a **Tabela 4**.

Tabela 4: Protocolo de eluição adotado para análise em CLAE-DAD.

Tempo (min.)	Concentração de Acetonitrila (%)
0-30	10-100
30-35	100
35-37	10
37-45	10

4.2.3.4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H

A aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H-RMN) das sub-frações identificadas como Fr 24-27, Fp e Fa foi realizada no Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais – UFRJ/RJ. Os espectros foram registrados em espectrômetro de 500 MHz VARIAN INOVA 500 (Probenköpfe für direkte Beobachtung de ¹H, ¹⁹F, ¹⁵N - ³¹P). Os deslocamentos químicos (δ) foram referendados com padrões internos TMS ($\delta=0$, ¹H), sendo expressos em unidades ppm (parte por milhão) e, as constantes de acoplamento, (*J*), em Hertz (Hz).

5. Resultados e Discussão

5.1. Coleta do Material Vegetal e Isolamento dos Fungos Endofíticos

Após o processo de esterilização das partes aéreas (galhos e folhas) de *H. balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill foi possível o isolamento de 26 fungos endofíticos, sendo 14 cepas isoladas a partir de folhas e 12 cepas a partir de galhos. Estes micro-organismos foram codificados de acordo com a morfologia. Apenas alguns fungos foram utilizados nesse trabalho. A **Figura 7** mostra a foto dos fungos endofíticos isolados de *H. balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill utilizados nesse trabalho.

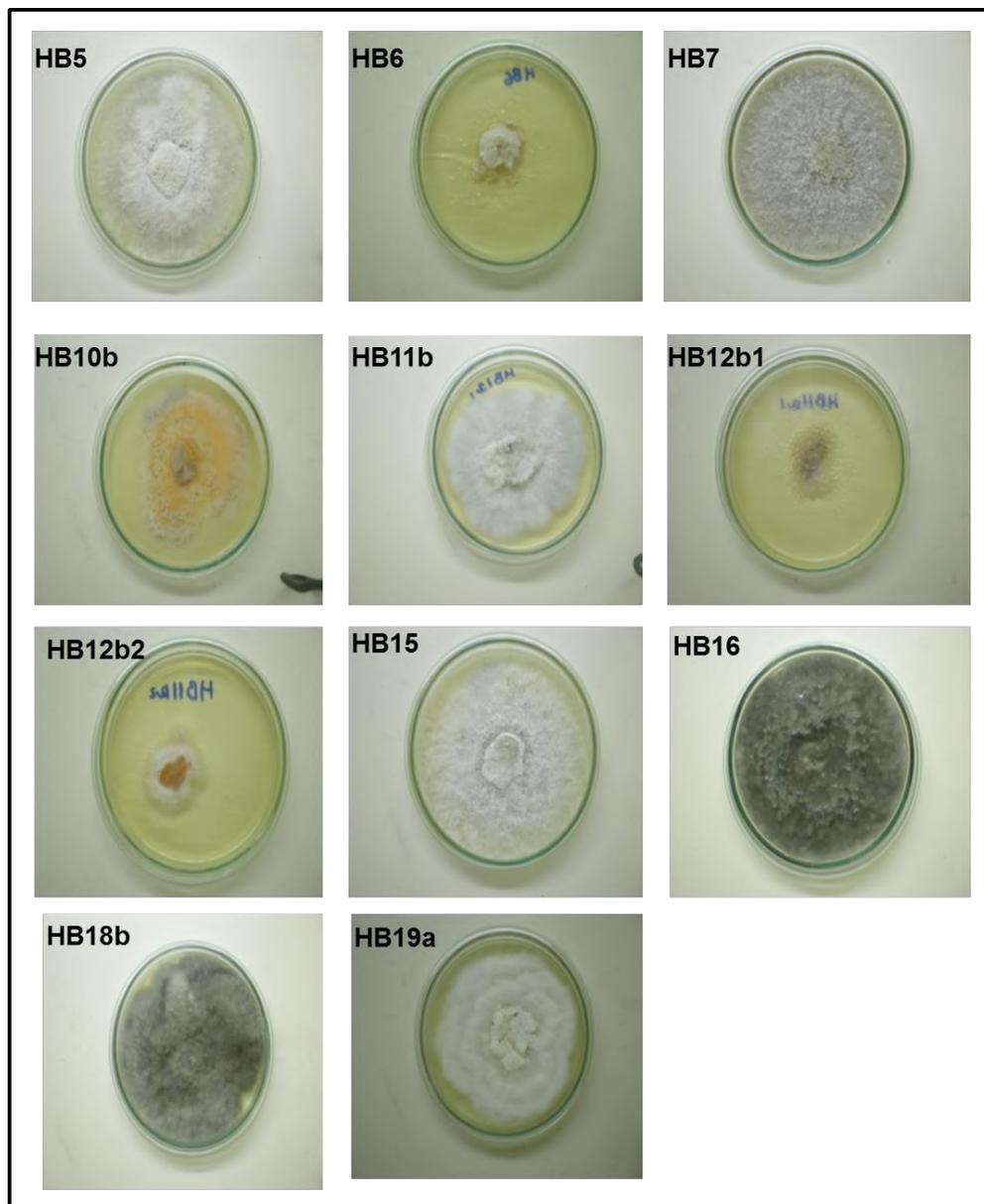


Figura 7: Fungos endofíticos isolados de *H. balsamifera* (Aubl.) A. St. Hill utilizados no trabalho.

Na literatura não foi encontrado nenhum trabalho que relatasse o isolamento de fungos endofíticos de espécies da família Humiriaceae, porém encontrou-se associações de fungos endofíticos com angiospermas, evidenciando a importância de estudar os micro-organismos desse grupo. De *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) isolou-se 11 micro-organismos (CUZZI *et al.*, 2011). De *Viguiera arenaria* (Asteraceae) isolou-se 37 fungos endofíticos (GUIMARÃES, 2006). Isto demonstra a importância de se estudar micro-organismos endofíticos desse grupo de plantas.

A quantidade de fungos isolados em relação ao número total de micro-organismos endofíticos existentes em uma espécie vegetal pode ser influenciado pela habilidade dos mesmos de crescerem fora do tecido vegetal em meios de cultura convencionais, além de existirem fungos que não crescem em meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (LIU *et al.*, 2007; MOREIRA, 2013) Essa quantidade também varia de acordo com a parte do vegetal utilizada para o isolamento, visto que os fungos endofíticos colonizam, principalmente, partes aéreas como galhos e folhas, e as raízes (SOUZA *et al.*, 2004). Os fungos endofíticos são considerados fontes naturais promissoras para desenvolvimento de novos fármacos, pois destes já foram isolados, metabólitos secundários com diversas atividades biológicas, como antimicrobiana e citotóxica.

5.2. Cultivos em Meio Sólido de Arroz

Todos os fungos endofíticos isolados foram agrupados de acordo com as características morfológicas tais como: velocidade de crescimento (rápido: 7 dias; lento: 14 dias), aspectos da borda (regulares, irregulares e radiadas), cor e textura. Os fungos codificados como HB5, HB6, HB7, HB10b, HB11b, HB12b1, HB12b2, HB15, HB16, HB18b e HB19a foram os escolhidos para o cultivo em meio sólido de arroz por apresentarem micélio mais abundante em 7 dias de crescimento em comparação com os de crescimento um pouco mais lento – 14 dias.

Os extratos etanólicos secos obtidos foram utilizados para realização dos ensaios biológicos. A **Tabela 5** mostra as quantidades obtidas dos extratos etanólicos de arroz oriundos de cada fungo e seus respectivos códigos no laboratório.

Tabela 5: Quantidades obtidas (g) dos extratos etanólicos de arroz (EEA).

Código do Fungo	Código do extrato utilizado no laboratório	Massa obtida (g)
Branco	-	0,75
HB5	EEA HB5	8,51
HB6	EEA HB6	2,46
HB7	EEA HB7	6,07
HB10b	EEA HB10b	2,39
HB11b	EEA HB 11b	2,46
HB12b1	EEA HB12b1	1,37
HB12b2	EEA HB12b2	2,82
HB15	EEA HB15	4,29
HB16	EEA HB16	14,47
HB18b	EEA HB18b	5,90
HB19a	EEA HB19a	9,34

5.3. Análise do Perfil Biológico

5.3.1. Ensaio Antimicrobiano de Concentração Inibitória Mínima

Nas condições de cultivos utilizados, os extratos etanólicos de arroz não foram ativos para nenhum dos micro-organismos indicadores na maior concentração testada. A **Figura 8** mostra a foto das placas de CIM em que foram obtidas estes resultados negativos. O ensaio foi realizado utilizando 4 amostras por placa, as

quais foram aplicadas nas fileiras A-D, sendo realizadas as microdiluições nas colunas 1-5. Nas colunas 7-11 das mesmas fileiras foram realizadas as duplicatas, tendo-se o controle de esterilidade das amostras nas colunas 6 e 12. Na fileira E colunas 1-12 foram realizadas as microdiluições do antibiótico, sendo a 12 o controle de esterilidade do mesmo. Na fileira G colunas 1-5 foram realizadas os controles da atividade antimicrobiana do solvente (DMSO) e na coluna 12 o controle de esterilidade do solvente. Na fileira H coluna 1 tem-se o controle de esterilidade do meio de cultura e na coluna 6 o controle de viabilidade do inóculo (**Tabela 2 e Figura 8**).

A cor azul (estado oxidado da resazurina) indica que há oxigênio no meio, concluindo-se que não houve crescimento de bactéria, indicando atividade antimicrobiana. A cor rosa (estado reduzido da resazurina) representa o crescimento da bactéria, portanto a amostra não foi considerada tendo atividade antimicrobiana (NERO *et al.*, 2000). Na **Figura 8 A e D** observam-se poços azuis na microdiluição das amostras (indicativo de atividade antimicrobiana), porém nas respectivas duplicatas esse efeito não foi observado. Destaca-se assim a importância da realização do experimento em duplicata ou triplicata, com o objetivo de evitar resultados errôneos. Além disso, é possível observar em todas as placas na fileira E (antibiótico) que a partir de uma determinada concentração a coloração passa de azul para rosa/lilás, mostrando que aquela (última coloração azul) foi a concentração mínima capaz de inibir o crescimento da bactéria, dentro da faixa testada. Essa concentração mínima inibitória difere de acordo com a bactéria utilizada. Também é possível notar que o solvente utilizado para preparo das amostras não interfere na inibição do crescimento bacteriano (fileira G).

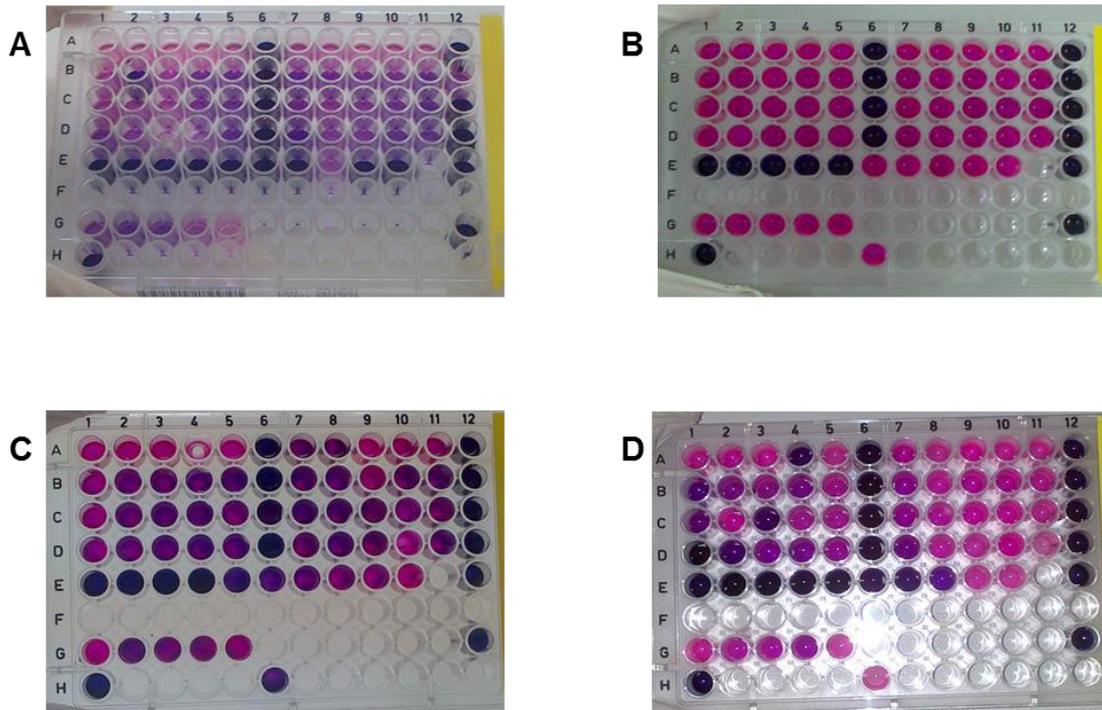


Figura 8: Placas com o ensaio de CIM. A: *Staphylococcus aureus*. B: *Staphylococcus saprophyticus*. C: *Escherichia coli*. D: *Pseudomonas aeruginosa*.

Estudos de triagem utilizando fungos como fonte de metabólitos bioativos demonstram que a porcentagem de fungos que apresentam atividade antimicrobiana pode variar de 10 a 40% (MOREIRA, 2013). Na literatura não foi encontrado nenhum trabalho que relatasse atividade antimicrobiana relacionada aos fungos endofíticos de espécies da família Humiriaceae, porém encontrou-se associações de fungos endofíticos com angiospermas. Um estudo realizado por GUIMARÃES (2006) utilizando 3 micro-organismos (*S. aureus*, *E.coli*, *C. albicans*) mostra que dos 37 fungos endofíticos isolados de *Viguiera arenaria* (Asteraceae), somente 5 foram mais promissores nos ensaios antimicrobianos. A busca por atividade antimicrobiana em triagens é muito utilizada em estudos de prospecção em produtos naturais, entretanto, encontrar um extrato bruto eficaz tem sido um desafio para vários pesquisadores desta área. Em um estudo feito por YMELE-LEKI *et al.* (2012), onde foram analisados 39.000 extratos a partir de organismos que crescem em diversos ecossistemas da Costa Rica, apenas 49 extratos apresentaram atividade antimicrobiana.

Infecções por *S. aureus* são responsáveis por desordens nos ossos, pele e articulações, além de problemas respiratórios e cardiovasculares. São responsáveis

também por diversas complicações causadas por infecções hospitalares, como bacteremia, osteomielite, endocardite e abscessos em órgãos como pulmão (LOWY, 1998; MATTOX, 2007). Estima-se que 95% dos pacientes do mundo infectados com *S. aureus* não respondem mais aos antibióticos de primeira linha (RUBIN *et al.*, 1999). Além disso, *S saprothyticus* é considerado, depois de *E. coli*, o maior causador de infecções urinárias em mulheres, podendo causar também cistite, uretrite e pielonefrite (RAZ *et al.*, 2005). *Pseudomonas aeruginosa* também é responsável por diversas infecções causadas no aparelho respiratório e urinário, sendo a principal responsável por infecções hospitalares.

Na literatura encontram-se substâncias antimicrobianas frente a *S. aureus* e *Enterococcus faecalis* resistentes, isolados de fungos endofíticos, como por exemplo o guanacastepeno A (**Figura 9**) (BRADY *et al.*, 2001) e frente a *Helicobacter pylori* tem-se o ácido rozoctônico, isolado de *Rizoctonia* sp. (MA *et al.*, 2004).

Devido a maioria dos patógenos apresentarem grande habilidade em adquirir resistência à maioria dos antibióticos existentes no mercado, e a existência na literatura de substâncias isoladas de fungos endofíticos com atividade antimicrobiana, encontrar um extrato com atividade antimicrobiana seria relevante.

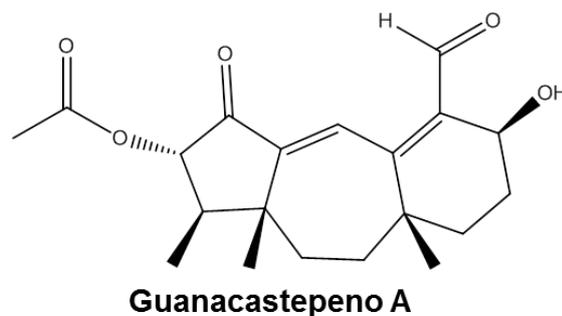


Figura 9: Estrutura química do metabólito secundário guanacastepeno A.

5.3.2. Ensaio de Atividade Citotóxica

A **Figura 10** mostra os resultados do ensaio citotóxico. Nas condições de cultivos utilizados, os extratos etanólicos de arroz de HB6, HB7, HB10b, HB12b1, HB15, HB18b e HB19a não apresentaram atividade citotóxica significativa. Já o extrato de HB11b apresentou moderada atividade citotóxica na maior concentração testada (50

$\mu\text{g/mL}$), com aproximadamente 50% de inibição do crescimento de células HCT-116. O extrato do meio de cultura (branco) apresentou pequena atividade, o que indica que o resultado positivo obtido é proveniente de metabólitos secundários transferidos pelos fungos endofíticos para o meio de cultura (GUIMARÃES, 2006).

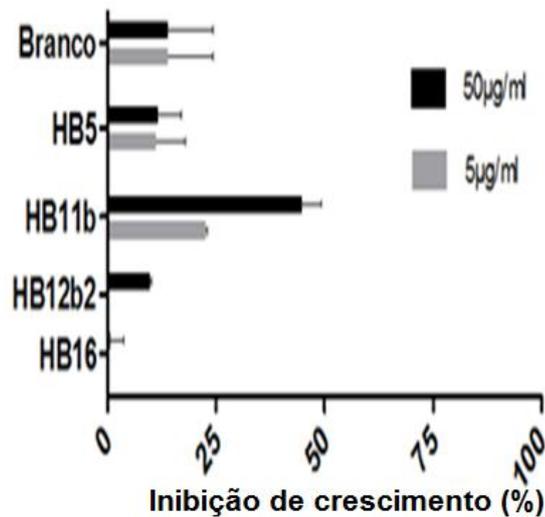


Figura 10: Resultado do ensaio de atividade citotóxica de EEA em células HCT-116 (cólono-humano).

As células tumorais de cólon são resistentes a maioria dos anti-tumorais existentes no mercado. Por este motivo, é importante fazer uma triagem inicial com este tipo de célula, pois quando encontrada uma atividade citotóxica com estas aumentam-se as chances de se encontrar com uma célula mais sensível. Entretanto, isto pode não ocorrer. A escolha deste tipo celular é um procedimento padrão adotado pelo Laboratório de Oncologia da Universidade Federal do Ceará.

Um estudo realizado por PESSOTTI (2011) utilizando células tumorais HCT-8 (cólono-humano) mostra que os 2 micro-organismos endofíticos estudados apresentaram atividade citotóxica significativa. Isto mostra que mesmo sendo uma célula resistente é possível encontrar atividade quando utilizados estes micro-organismos. Cria-se assim uma perspectiva para a avaliação da atividade citotóxica dos EEA utilizando outros tipos celulares mais sensíveis.

O câncer de cólon é uma das neoplasias de maior incidência em todo mundo, ocupando o terceiro lugar no ranking, ficando apenas atrás de pulmão e mama.

Estima-se que em 2014 surgirão aproximadamente 33 mil novos casos de câncer de cólon e reto no Brasil (BRASIL, 2013). Portanto, a atividade citotóxica observada no extrato etanólico de arroz de HB11b é relevante.

5.4. Análise do Perfil Químico

5.4.1. Partição Líquido-líquido a Partir do Extrato Etanólico de Arroz de HB11b

Para realização da partição líquido-líquido foi utilizado 1,58 g do extrato etanólico de arroz de HB11b. Os rendimentos das partições foram calculados a partir da relação percentual da massa obtida no processo em relação a massa de extrato utilizado. A fração aquosa foi descartada, devido a isto não tem-se o rendimento da mesma. A **Tabela 6** descreve os valores obtidos na partição líquido-líquido.

Tabela 6: Rendimento após partição líquido-líquido.

Fração	Massa (g)	Rendimento (% p/p)
Fração Hexânica	0,20	12,65%
Fração Acetato de Etila	0,08	5,06%
Fração Butanólica	0,54	34,17%

Após análise das frações por CCD (**Figura 11**), selecionou-se a fração acetato de etila para realização do fracionamento químico, devido apresentar menor complexidade química em comparação com as demais frações.

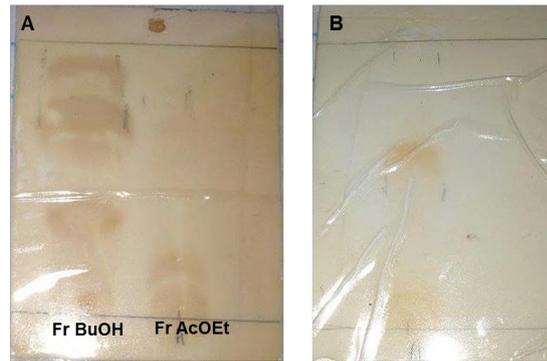


Figura 11: Análise das frações por CCD. A: CCD das frações butanólica e acetato de etila eluída em HXA:AcOEt 7:3. B: CCD da fração acetato de etila eluída em HXA:AcOEt 3:7.

5.5. Fracionamento Químico

5.5.1. Isolamento dos Constituintes Químicos da Fração AcOEt

Da fração AcOEt 69,5 mg da amostra total foi aplicada na coluna. Na **Tabela 7** têm-se as sub-frações obtidas na coluna cromatográfica e seus respectivos rendimentos. As sub-frações reunidas tiveram perfil químico igual, visualizadas através de CCD seguidas de revelação física sob luz UV à 240 e 365 nm e revelação química por sulfato cérico.

Tabela 7: Sub-frações da coluna cromatográfica da fração AcOEt e seus respectivos rendimentos.

Sub-fração	Massa (mg)	Sub-fração	Massa (mg)	Sub-fração	Massa (mg)
Fr 1	0,1	Fr 24-27	6,3	Fr 43-45	1,0
Fr 2	0,2	Fr 28	0,7	Fr 46	0,5
Fr 3	0,1	Fr 29	0,1	Fr 47-51	2,0
Fr 4	0,2	Fr 30	0,1	Fr 52	0,3
Fr 5	0,1	Fr 31	0,2	Fr 53	0,2
Fr 6	1,6	Fr 32	0,2	Fr 54	0,2
Fr 7	1,7	Fr 33-37	1,2	Fr 55-61	0,3
Fr 8	0,9	Fr 38	0,2	Fr 62	0,2
Fr 9-14	0,7	Fr 39	0,6	Fr 63-68	0,1
Fr 15-21	0,6	Fr 40	0,1	Fr 69	0,2
Fr 22	0,2	Fr 41	0,3	Fr 70-71	6,4
Fr 23	0,1	Fr 42	1,0	Fr 72-73	21,9

Total: 50,8 mg

Obteve-se 73,09% de rendimento na coluna cromatográfica.

5.5.2. Isolamento dos Constituintes Químicos da Sub-fração Fr 24-27

Com o objetivo de isolar as duas substâncias químicas contidas na sub-fração Fr 24-27 (**Figura 12**), 6,3 mg da amostra total foi aplicada na coluna. Na **Tabela 8** têm-se as novas sub-frações obtidas na coluna cromatográfica e seus respectivos rendimentos. As sub-frações reunidas tiveram perfil químico igual, visualizados através de CCD e luz UV à 240 e 365 nm.

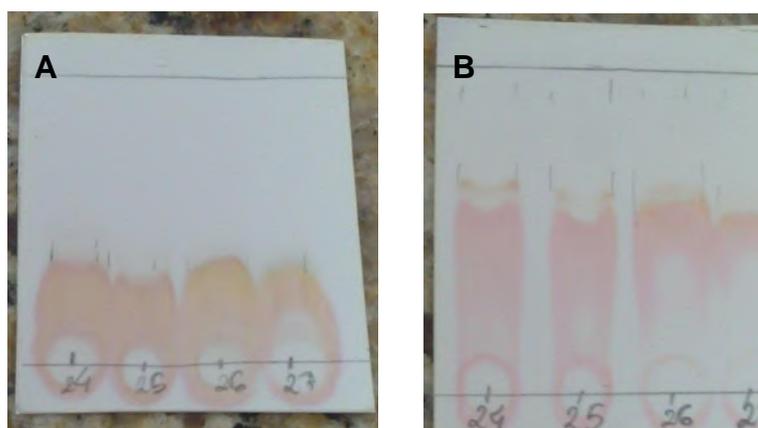


Figura 12: Cromatografia de camada delgada da sub-fração Fr 24-27 após revelação com sulfato cérico. A: Placa eluída em HXA:AcOEt 7:3; B: Placa eluída em HXA:AcOEt 3:7.

Tabela 8: Sub-frações da coluna cromatográfica da sub-fração Fr 24-27 e seus respectivos rendimentos.

Sub-fração	Massa (mg)	Sub-fração	Massa (mg)
RF 1-3	0,8	RF 13-15	6,0
RF 4-6	11,4	RF 16-17	0,5
RF 7-8	1,9	RF 18-38	1,4
RF 9-12	0,9		
Total: 22,9 mg			

Obteve-se 363,50% de rendimento na coluna cromatográfica. É possível observar que o rendimento total da coluna é maior do que a quantidade inicial injetada. Isto deve-se a algum erro analítico durante a pesagem inicial da amostra ou erro de calibração da balança utilizada, visto que a segunda coluna cromatográfica foi realizada meses após a primeira e nesse tempo a balança do laboratório passou por calibração técnica.

5.5.3. Isolamento dos Constituintes Químicos da Sub-fração RF 4-6

Com o objetivo de isolar as duas substâncias químicas contidas na sub-fração RF 4-6, 11,4 mg da amostra total foi aplicada na CCD. Na **Tabela 9** têm-se as duas novas sub-frações obtidas e seus respectivos rendimentos.

Tabela 9: Sub-frações da cromatografia semi-preparativa da sub-fração RF 4-6.

Sub-fração	Massa (mg)
Fp	3,03
Fa	8,20
Total: 11,23 mg	

Obteve-se 98,51% de rendimento na cromatoplaça cromatográfica.

5.6. Identificação dos Constituintes Químicos Isolados

5.6.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Detector de Arranjo de Diodos(CLAE-DAD)

Após visualização da sub-fração Fr 24-27 por CCD, realizou-se análise CLAE-DAD. A análise foi realizada nos mesmos comprimentos de onda em que visualizou-se as CCDs no espectrofotômetro (254 e 365 nm).

O perfil cromatográfico foi analisado nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm (Figura 13), os mesmos utilizados para análise da sub-fração Fr 24-27 por CCD. Na análise é possível observar dois picos majoritários, que possuem uma alta intensidade (Figura 14). No comprimento de onda de 254 nm é possível observar maior porcentagem de área relativa nestes picos de maior intensidade, indicando que este comprimento é mais adequado para observação dessas duas substâncias (Figura 15).

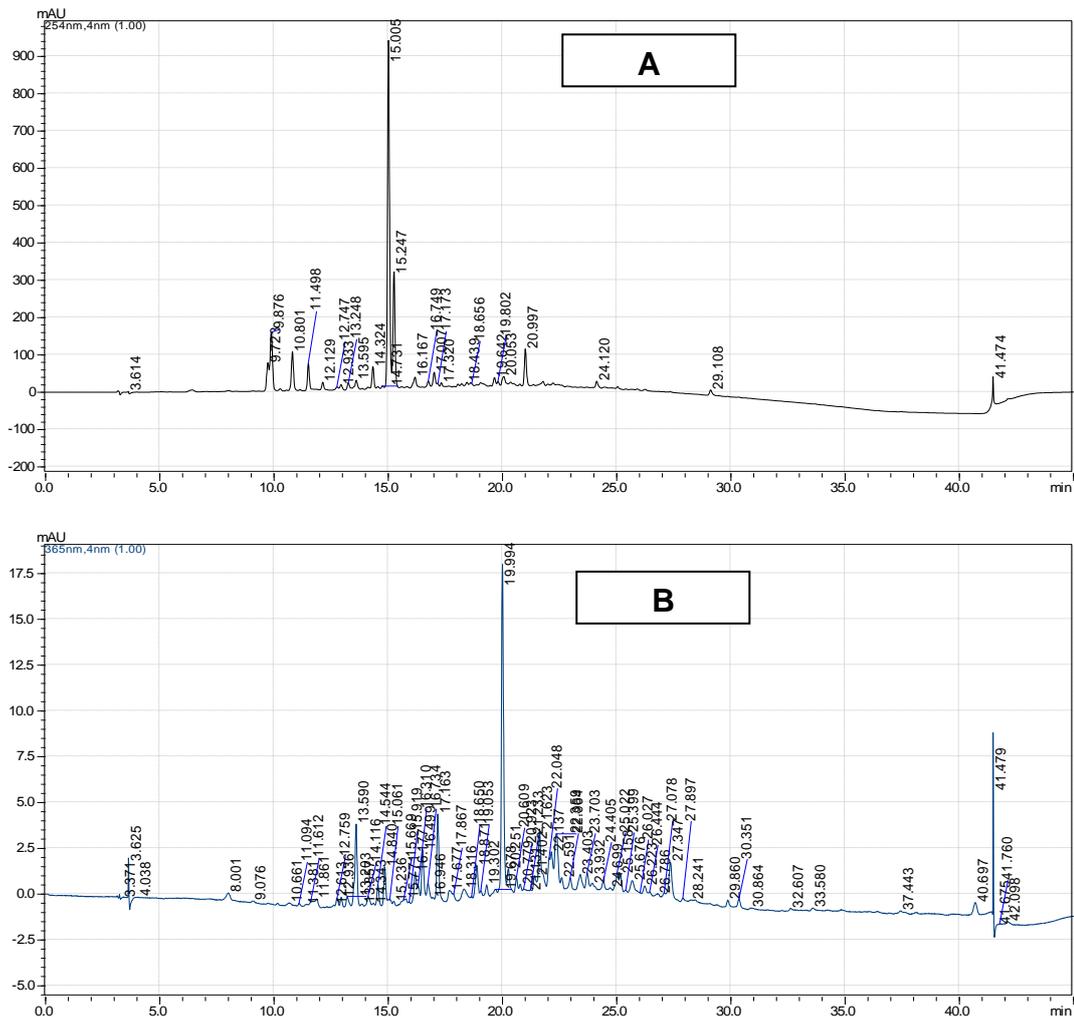


Figura 13: Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da sub-fração Fr 24-27. A: Comprimento de onda de 254 nm. B: Comprimento de onda de 365 nm.

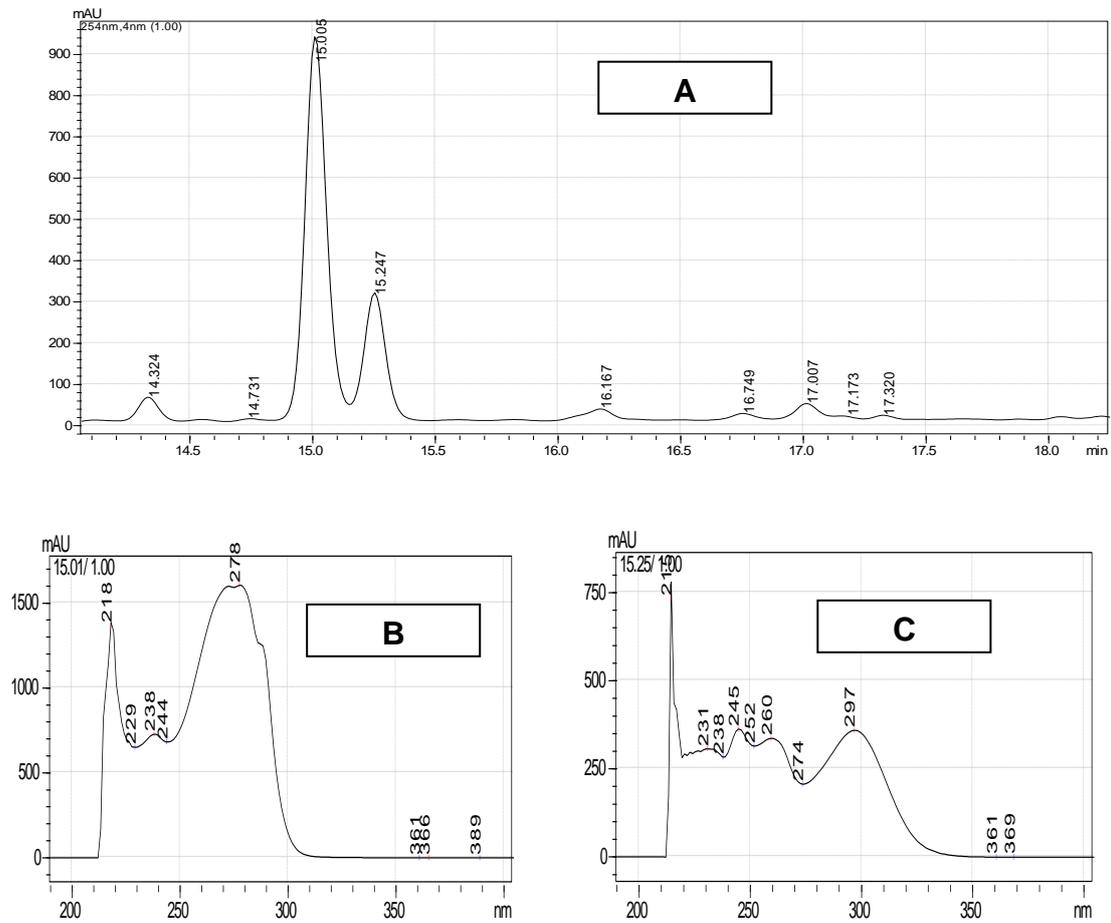


Figura 14: Picos majoritários presente no cromatograma por CLAE-DAD da sub-fração Fr 24-27 no comprimento de onda de 254 nm.

A: Ampliação dos picos majoritários presente no cromatograma. B: Espectro de UV do pico em tempo de retenção 15,01 minutos. C: Espectro de UV do pico em tempo de retenção 15,25 minutos.

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %
1	3.614	112774	6773	0.804	0.310
2	9.723	503125	75637	3.587	3.458
3	9.876	1176032	157960	8.385	7.221
4	10.801	690615	103913	4.924	4.750
5	11.498	408377	70030	2.912	3.201
6	12.129	116035	19944	0.827	0.912
7	12.747	62096	7313	0.443	0.334
8	12.933	92161	14054	0.657	0.642
9	13.248	135134	19070	0.963	0.872
10	13.595	222819	24493	1.589	1.120
11	14.324	326770	57498	2.330	2.628
12	14.731	43926	6085	0.313	0.278
13	15.005	5776350	931413	41.183	42.578
14	15.247	1950039	310420	13.903	14.190
15	16.167	249294	27994	1.777	1.280
16	16.749	109048	15818	0.777	0.723
17	17.007	273263	39358	1.948	1.799
18	17.173	44651	8265	0.318	0.378
19	17.320	52402	10147	0.374	0.464
20	18.439	59797	9384	0.426	0.429
21	18.656	61701	6196	0.440	0.283
22	19.642	144681	21943	1.032	1.003
23	19.802	60544	11065	0.432	0.506
24	20.053	199505	22209	1.422	1.015
25	20.997	617795	98792	4.405	4.516
26	24.120	122479	17546	0.873	0.802
27	29.108	109731	14364	0.782	0.657
28	41.474	305012	79868	2.175	3.651
Total		14026150	2187550	100.000	100.000

Figura 15: Dados de tempos de retenção, área, altura relativa de cada pico observado no cromatograma em 254 nm. Maior porcentagem de área relativa nos maiores picos.

5.6.2. Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

A aquisição do espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fr 24-27 (**Figura 16**) foi realizada utilizando como solvente o clorofórmio deuterado (CDCl_3). O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em δH 7,514 – 7,714, hidrogênios carbinólicos em δH 4,287 – 4,363 e hidrogênios alifáticos em δH 0,640 – 1,342. (**Figura 17**). As integrais observadas indicam que a substância está com considerável grau de pureza para prosseguir com a elucidação estrutural da substância.

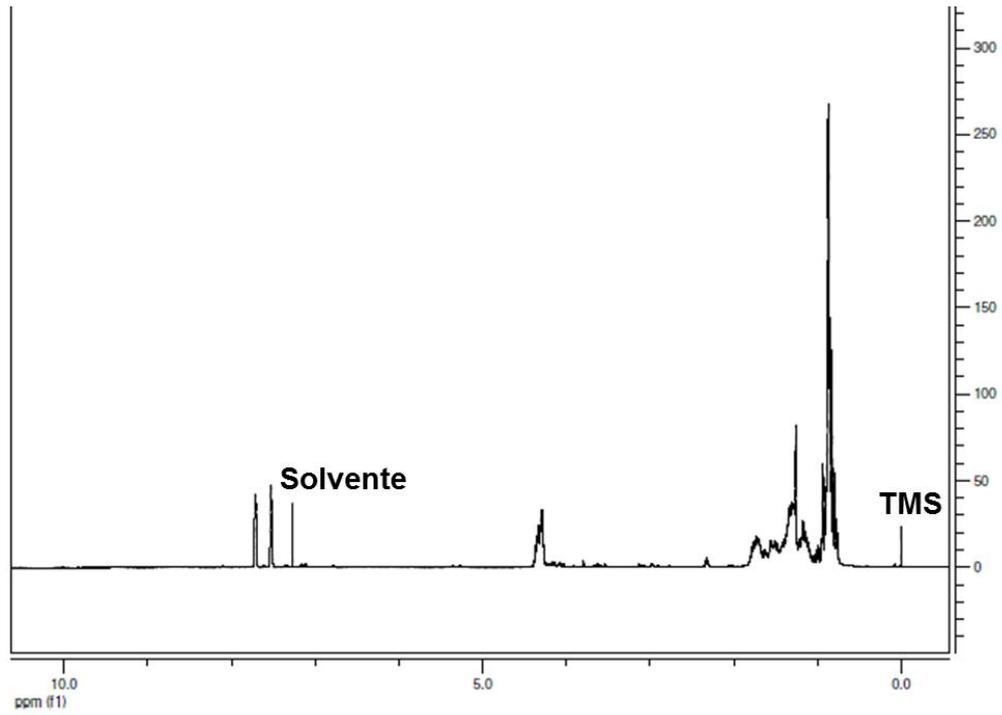
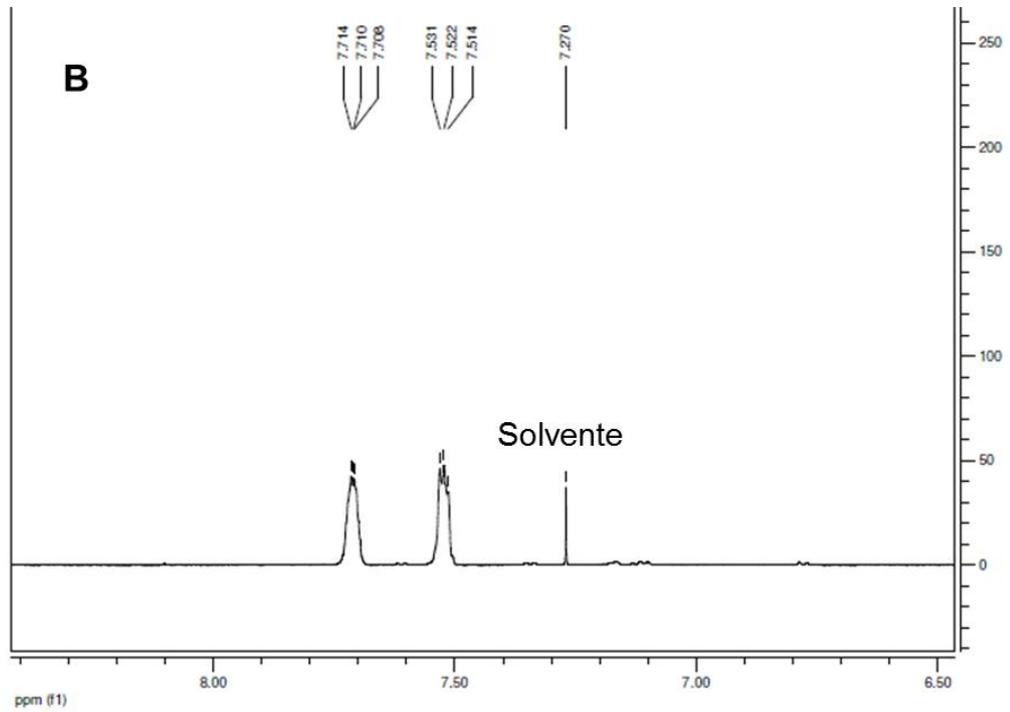
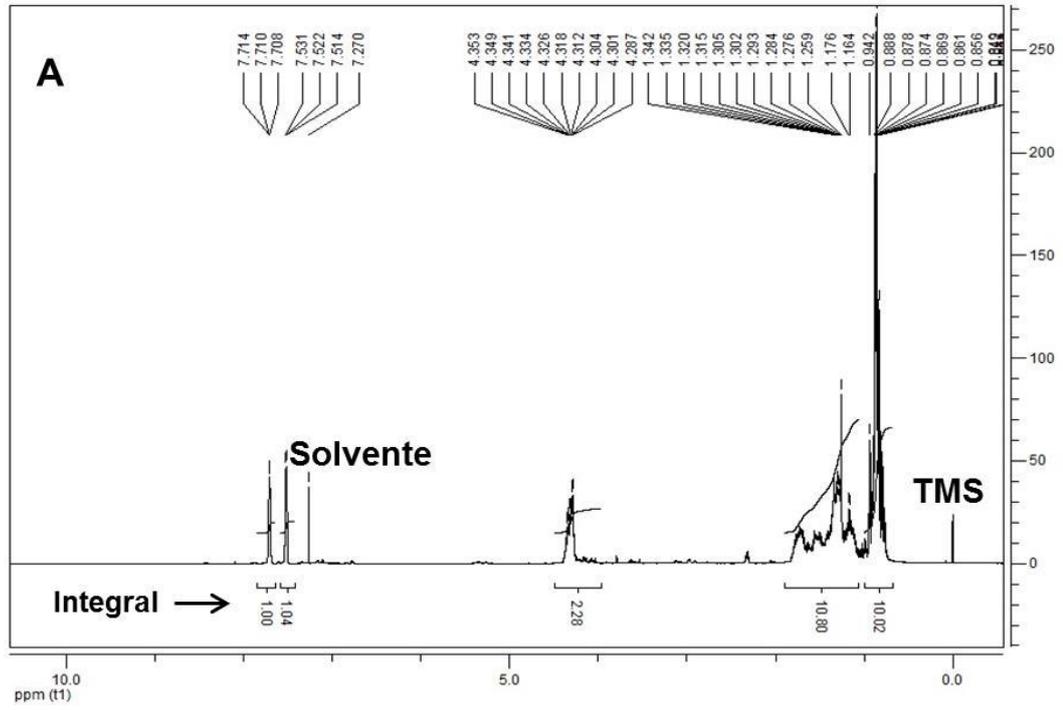


Figura 16: Espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fr 24-27.



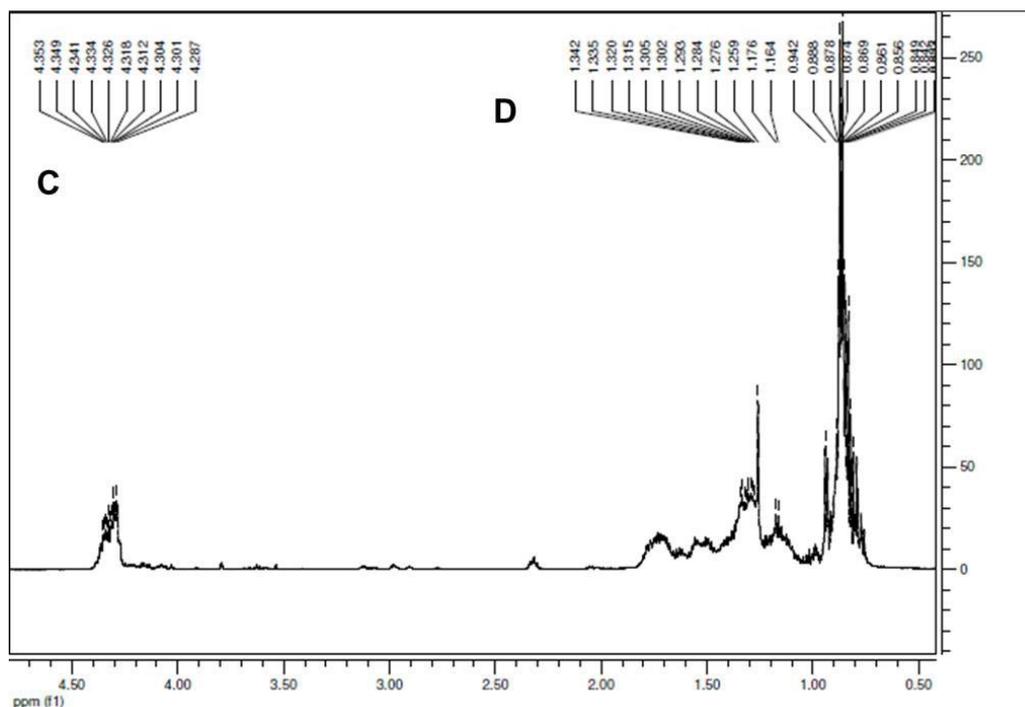


Figura 17: A: Espectro de RMN de ^1H com sinais de hidrogênios aromáticos, carbinólicos e alifáticos da sub-fração 24-27. B: Ampliação dos sinais de hidrogênios aromáticos. C: Ampliação dos sinais de hidrogênios carbinólicos. D: Ampliação dos sinais de hidrogênios alifáticos.

A análise de RMN de ^1H da sub-fração Fp foi realizada utilizando como solvente o clorofórmio deuterado (**Figura 18**). O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais característicos de substância graxa, porém a substância não estava totalmente solúvel nesse solvente e por isso utilizou-se o metanol deuterado (MeOD) para solubilizar o restante da amostra e realizar outra análise (**Figura 19**). É possível que essa cadeia graxa presente seja um contaminante adquirido ao decorrer dos experimentos através de uma vidraria contendo detergente residual, já que sua banda na CCD em sílica gel é de natureza polar.

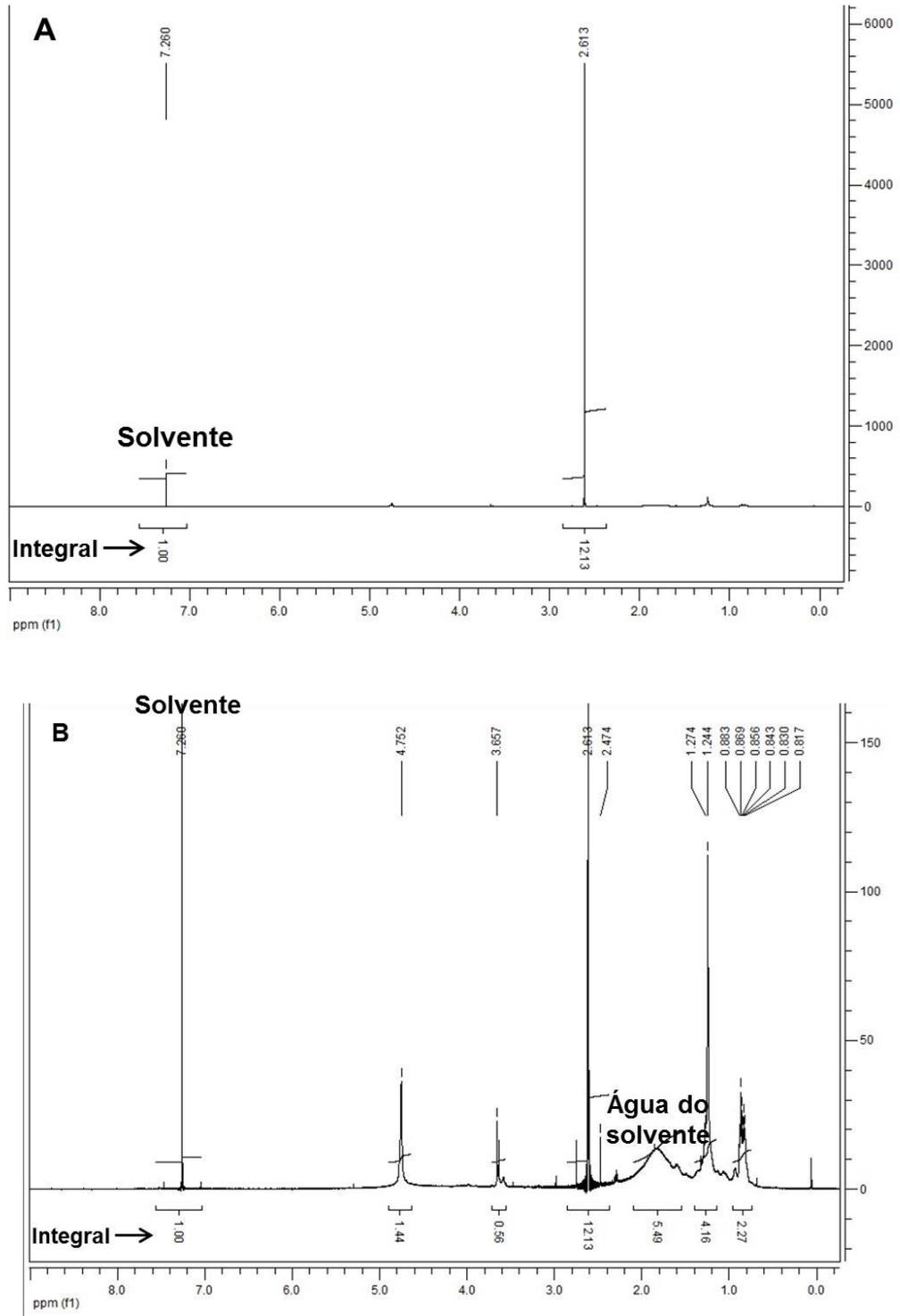


Figura 18: A: Espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fp utilizando solvente CDCl_3 . B: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fp.

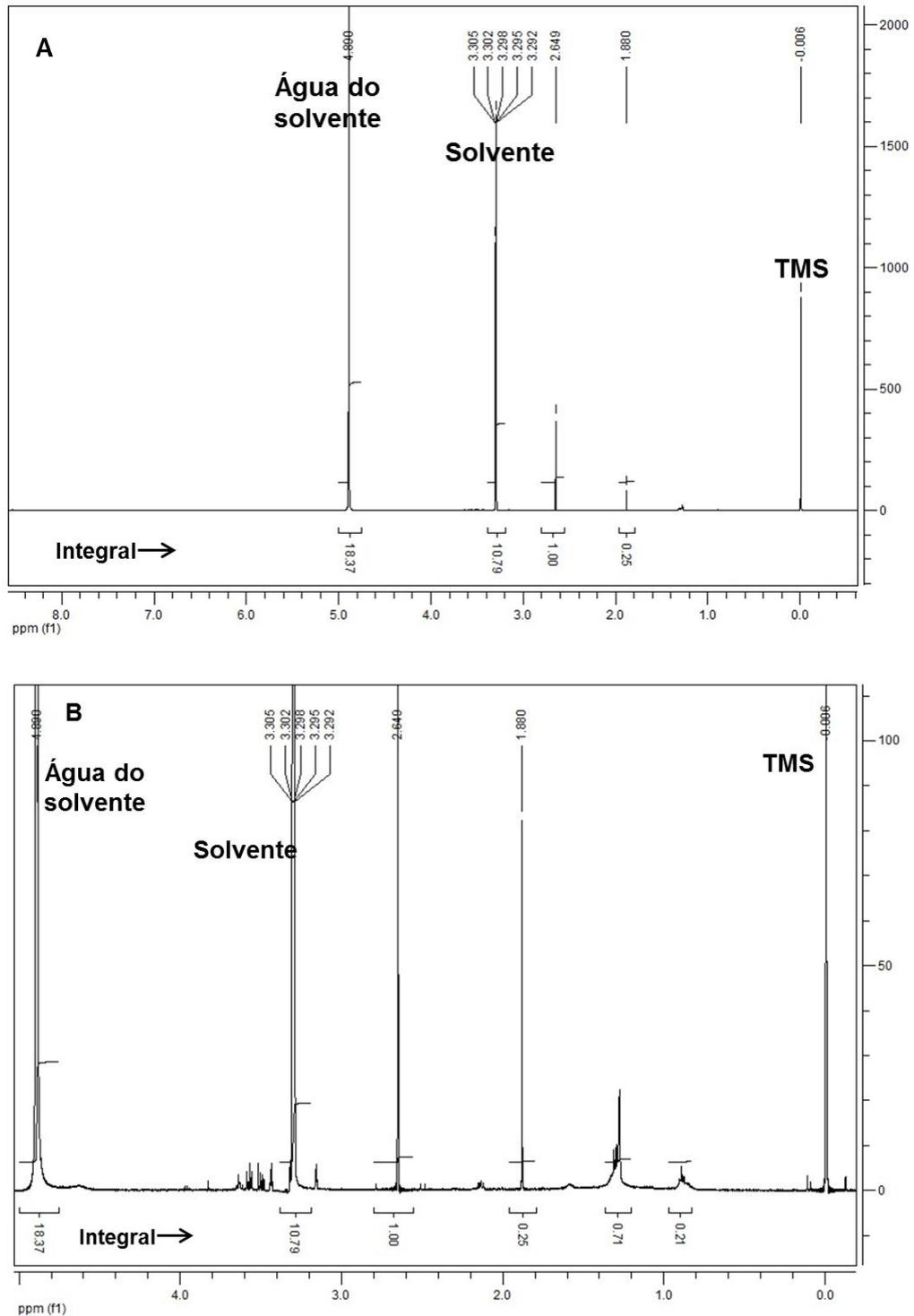


Figura 19: A: Espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fp utilizando solvente MeOD. B: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da sub-fração Fp.

A análise de RMN de ^1H da sub-fração Fa foi realizada utilizando como solvente o clorofórmio deuterado. O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais de hidrogênios aromáticos para-substituídos em δH 7,502 – 7,713, hidrogênios carbinólicos em δH

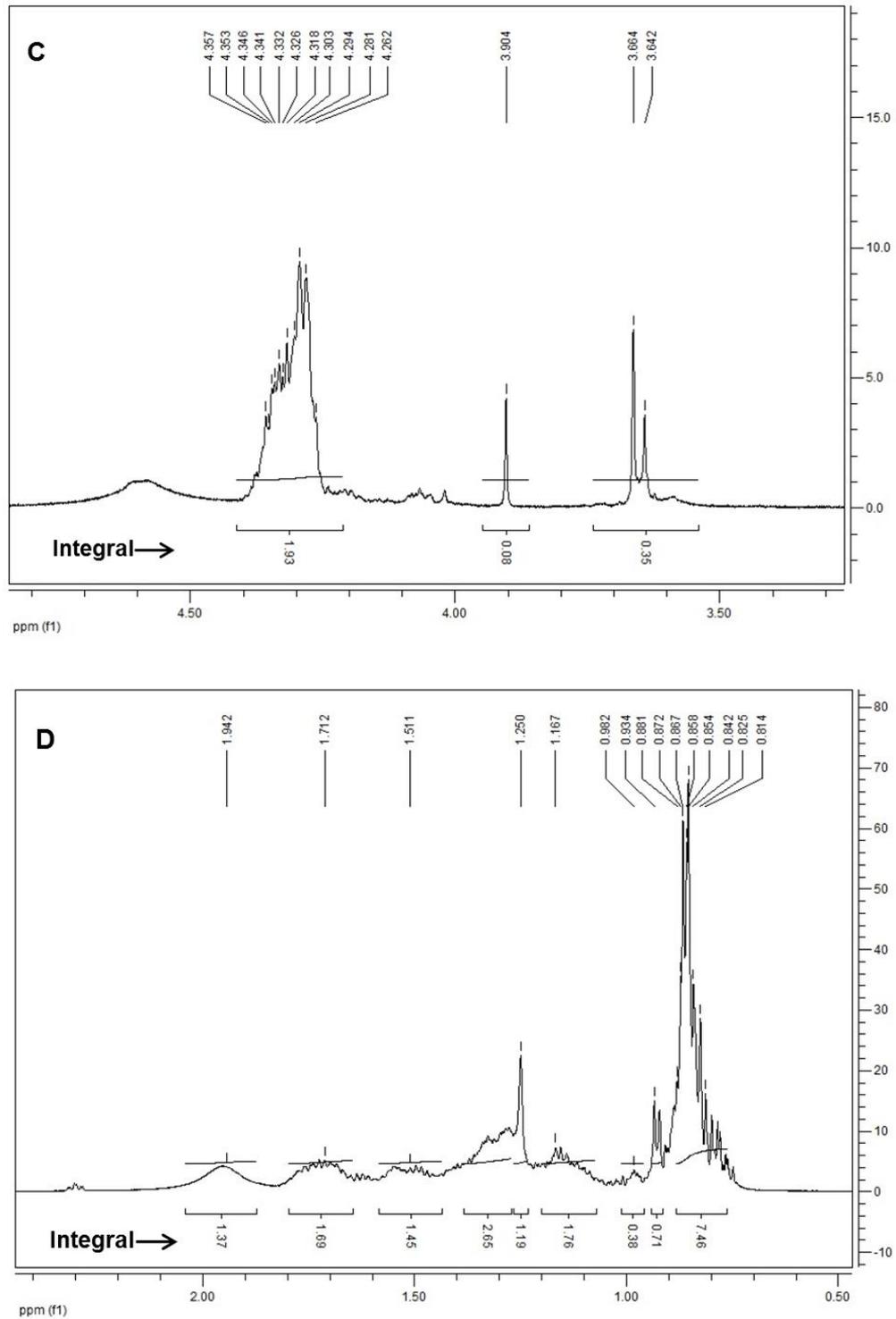


Figura 20: A: Espetro de RMN de ^1H da sub-fração Fa com sinais de hidrogênios aromáticos, carbinólicos e alifáticos. B: Ampliação dos sinais de hidrogênios aromáticos. C: Ampliação dos sinais de hidrogênios carbinólicos. D: Ampliação dos sinais de hidrogênios alifáticos.

6. Conclusão

Na análise do perfil biológico dos extratos etanólicos de arroz dos fungos endofíticos codificados como HB5, HB6, HB7, HB10b, HB11b, HB12b1, HB12b2, HB15, HB16, HB18b e HB19a, não foram ativos para atividade antimicrobiana em nenhum dos micro-organismos indicadores na maior concentração testada. Porém o extrato HB11b mostrou-se promissor na produção de compostos com atividade citotóxica em células tumorais HCT-116 (cólono-humano) na maior concentração testada (50 µg/mL).

Na análise do perfil químico do extrato promissor HB11b após colunas cromatográficas abertas resultou duas substâncias isoladas, codificadas como Fp e Fa.

Nos dados espectroscópicos, através do perfil cromatográfico por CLAE-DAD para sub-fração Fr 24-27 obteve-se dois picos majoritários. A substância Fp apresentou sinais de cadeia graxa e a substância Fa apresentou sinais de hidrogênios aromáticos, carbinólicos e alifáticos.

Como perspectivas futuras, tem-se a realização de RMN ¹³C, espectros bidimensionais e espectroscopia de massas a fim de realizar a elucidação da substância Fs. Além disso, a realização da análise biológica da atividade citotóxica utilizando células tumorais mais sensíveis com os extratos brutos obtidos do cultivo em arroz.

7. Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity of *Annona vepretorum* Mart.(Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. SPE1, p. 258-264, 2014.
- AMORIM, A. M. A., MEDEIROS, H. Humiriaceae in. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000129>> Acessado em: Março/2014.
- AZEVEDO, J; L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2 (suplemento), p. 225-229, 1999.
- BASHYAL, B. P. et al. Globosumones AC, Cytotoxic Orsellinic Acid Esters from the Sonoran Desert Endophytic Fungus *Chaetomium globosum* 1. **Journal of natural products**, v. 68, n. 5, p. 724-728, 2005.
- BAKER, D. D. et al. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. **Natural product reports**, v. 24, n. 6, p. 1225-1244, 2007.
- BAXEVANIS, C. N.; PEREZ, S. A.; PAPAMICHAIL, M. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. **Cancer immunology, immunotherapy**, v. 58, n. 3, p. 317-324, 2009.
- BIBI, Y. et al. Antibacterial activity of some selected medicinal plants of Pakistan. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 11, n. 1, p. 52, 2011.
- BITTENCOURT, R.; SCALETZKY, A.; BOEHL, J. A. R. Perfil epidemiológico do câncer na rede pública em Porto Alegre – RS. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Porto Alegre, n. 50(2), p. 95-101, 2004.
- BLACKWELL, M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BORGES, W. S.; et al. **Curr. Org.Chem.** v.13, n.1137, 2009.
- BRADY, S. F.; BONDI, S. M.; CLARDY, J. The guanacastepenes: a highly diverse family of secondary metabolites produced by an endophytic fungus. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 40, p. 9900-9901, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2008 – Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. INCA: 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **ABC do câncer – Abordagens básicas para o controle do câncer**. Rio de Janeiro. INCA: 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2014 – Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. INCA: 2013.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 225, p. 65-72, 1939.

CASTILLO, U. et al. Kakadumycins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS microbiology letters**, v. 224, n. 2, p. 183-190, 2003.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 47-59, 2012.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-837, 2004.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico**: norma aprovada. 6.ed. São Paulo, 2003. v.23, M7-A6.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: micro-organismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 43-47, 2012.

CUZZI, C. et al. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* DC (ASTERACEAE). **Global Science and Technology**, v. 4, n. 2, 2011.

DA SILVA, T. B. C. et al. Chemical constituents and preliminary antimalarial activity of *Humiria balsamifera*. **Pharmaceutical biology**, v. 42, n. 2, p. 94-97, 2004.

DE MESQUITA, M. L. **Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica.** 2009. 223 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2009.

DE OLIVEIRA, J. F. **Investigação da atividade de extratos de *Humiria balsamifera* frente à patógenos hospitalares: Estudo para valorização de uma espécie da Restinga de Jurubatiba.** 2013. 54 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, 2013.

ESTEVES, F. A. Ecologia das Lagoas costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ). **Rio de Janeiro, NUPEM-UFRJ, 1998.**

FRANKS, L. M. Introdução à biologia celular e molecular do câncer. **:Introdução à biologia celular e molecular do câncer.** Roca Ltda, São Paulo, 1ª edição, 1990.

GALLO, M. B. C. et al. Natural products from endophytic fungi. **Microbial biotechnology. New India Publishing Agency, New Delhi, p. 139-168, 2008.**

GUIDA, C. et al. Combined chemo-radiotherapy for locally advanced non-small cell lung cancer: current status and future development. **Critical reviews in oncology/hematology, v. 68, n. 3, p. 222-232, 2008.**

GUIMARÃES, D. O. **Prospecção química e biológica em fungos endofíticos associados à *Viguiera arenaria* (Asteraceae).** 2006. 236 f. Tese (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

GUIMARÃES, D. O. et al. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology, v. 52, n. 1, p. 134-144, 2008**

GULLO, V. P. et al. Drug discovery from natural products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 33, n. 7, p. 523-531, 2006.**

GUNATILAKA, A. A. L. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **Journal of Natural Products, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.**

GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008

HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 5, p. 480-484, 2007.

LIU, J. Y. et al. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of biotechnology**, v. 114, n. 3, p. 279-287, 2004.

LOPES, A.A. et al. Quando os micro-organismos salvam vidas – Seres diminutos a serviço da produção de medicamentos. **Ciência Hoje**, v. 48/286, p. 30-35, 2011.

KNIGHT, V. et al. Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 62, n. 5-6, p. 446-458, 2003.

LIU, X. et al. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 548-554, 2007.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998.

MA, Y. M. et al. Anti- *Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 5, p. 451-456, 2004.

MATTOX, K. P. Key facts about *Staphylococcus aureus* infections. **Nabi Biopharmaceuticals**, 2007.

MORAN, N.A. **Curr. Biol**, v.16, r. 866, 2006.

MOREIRA, M. G. **Diversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O., Kuntze.** 2013.68 f. Tese (Mestrado em Biotecnologia) – Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2013.

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

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. Elsevier Brasil, 2006.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F. Métodos rápidos e automatizados para enumeração de micro-organismos indicadores em leite-utilização no Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, n. 1, p. 115-126, 2000.

NEWMAN, D. J., & CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75(3), p. 311-335, 2012.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G.D. **Curr. Op. Biotechnol.** v. 22, n. 552, 2011.

PEREIRA, M. C. A.; CORDEIRO, S. Z.; ARAUJO, D. S. D. Estrutura do estrato herbáceo na formação aberta de *Clusia* do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 677-687, 2004.

PESSOTTI, R.C. **Comparação do perfil químico-biológico de culturas simples e mista de duas actinobactérias endofíticas do gênero *Streptomyces* em dois tipos de meio de cultura**. 2011. 92 f. Tese (Bacharel em Ciências Biológicas) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

PORTUGAL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DA SAÚDE
DOUTOR RICARDO JORGE. **Vigilância epidemiológica das resistências aos antimicrobianos**. Disponível em: <
<http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/Paginas/AntibioticosResi.aspx#antiexis>> .
Acesso em: 14Jun.14.

QIN, S. et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 457-473, 2011.

RAZ, R.; COLODNER, R.; KUNIN, C. M. Who are you—*Staphylococcus saprophyticus*?. **Clinical infectious diseases**, v. 40, n. 6, p. 896-898, 2005.

REINER, T. et al. Low dose combinations of 2-methoxyestradiol and docetaxel block prostate cancer cells in mitosis and increase apoptosis. **Cancer Letters**, v. 276, n. 1, p. 21-31, 2009.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 100, n. 1, p. 80-84, Ago. 2005.

RUBIN, R. J. et al. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 1, p. 9, 1999.

SCHNEIDER, P.; MISIEK, M.; HOFFMEISTER, D. *In vivo* and *in vitro* production options for fungal secondary metabolites. **Molecular pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 234-242, 2008.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SELOSSE, M.A.; BAUDOIN, E.; VANDENKOORNHUYSE, P.C. **R. Biol.** v. 327, n. 639. 2004.

SILVEIRA, G. P. et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844, 2006.

Souza, A. D., et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta amazônica**, v. 34(2), p. 185-195, 2004.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical reviews in biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315-333, 2002.

VERMA, V. C. et al. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. **Microbial ecology**, v. 57, n. 4, p. 749-756, 2009.

WANG, JIANFENG et al. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 51-57, 2002.

WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida. **Uso racional de medicamentos**, v. 1, n. 4, p. 1-6, Brasília, Marc. 2004.

YMELE-LEKI, P. et al. A high-throughput screen identifies a new natural product with broad-spectrum antibacterial activity. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31307, 2012.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural product reports**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

Anexos

Anexo 1

Isolamento dos Fungos Endofíticos

Os fungos endofíticos utilizados foram isolados pelas Mestrandas Juliana Givisiéz e Maria Sandra Ramos Queiroz e alunos de Iniciação Científica Letícia Carneiro e Alan da Silva no laboratório de microbiologia do LaProN, segundo a metodologia a seguir:

Os galhos e as folhas da espécie vegetal foram lavadas em água corrente, e esterilizadas superficialmente da seguinte maneira: imersão em álcool etílico 70% por 2,5 minutos; solução de hipoclorito de sódio 5%, um grupo por 60 e outro por 90 segundos para folhas e 5 minutos para galhos; imersão em álcool etílico 100% por 1 minuto; e, por fim, em água destilada estéril. Em seguida o material foi cortado em pequenos fragmentos, sendo estes inoculados em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Além disso, realizou-se um controle para cada tempo de esterilização a ser utilizado. Para isso, foi feita a inoculação de cerca de 20-30 µL da água estéril utilizada na última lavagem em meio BDA. A ausência de crescimento de micro-organismos nesta etapa com água estéril referente a última lavagem indicou o isolamento apenas de micro-organismos endofíticos (GUIMARÃES *et al*, 2008). A coleta e purificação das diferentes cepas foram feitas pelo repique em tubos de ensaio *slant*, contendo meio BDA. Estoques das linhagens foram preparados para adequada preservação das mesmas utilizando-se duas metodologias: em água estéril (CASTELLANI, 1939) e óleo mineral.

Cultivos em Meio Sólido de Arroz

Os cultivos em meio sólido de arroz foram realizados pelos alunos de Iniciação Científica Letícia Carneiro e Alan da Silva no laboratório de microbiologia do LaProN, segundo a metodologia a seguir:

Os fungos endofíticos foram repicados em meio BDA e postos para crescer por 7 dias, a 30 °C. Em seguida, preparou-se Erlenmeyers, cada um contendo 90 g de arroz e 90 mL de água destilada. Esses foram autoclavados por 40 minutos, a fim de esterilizar o meio. Então 12 fragmentos (discos de 0,5 cm de diâmetro) dos fungos

crescidos foram acrescentados a esse meio sólido de arroz. Como o controle tinha-se dois Erlenmeyers somente com arroz. As culturas foram deixadas em crescimento estático, a 30° C, por 21 dias. Após o período de cultivo foram extraídas com etanol (cerca de 150 mL ou até a submersão total da cultura), em maceração estática por um período de 7 dias, seguida de filtração e concentração em rotaevaporados, obtendo-se assim os extratos etanólicos de arroz (EEA).

Anexo 2

Ensaio do Efeito Citotóxico em Células Tumorais

O ensaio citotóxico foi realizado pelo Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. A citotoxidez dos extratos foi determinada através de ensaios colorimétrico do MTT (MOSMAN, 1983) utilizando a linhagem celular tumoral humana HCT-116 (cólon – humano), cultivadas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos. Essa linhagem é mantida em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de $0,7 \times 10^5$. As amostras foram adicionadas e as placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Os extratos previamente solubilizados em DMSO (10 mg/mL) foram testados em duas concentrações: 5 µg/mL e 50 µg/mL. As absorbâncias foram obtidas com o auxílio de um espectrofotômetro de placa a 595 nm.