



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC  
Programa de Iniciação Científica Voluntária - PICVOL

**INVESTIGAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE  
FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Humirianthera ampla***

Área de Concentração: Exatas e da Terra

Voluntário: Lucas Vinícius de Jesus Alves

Orientador (a): Profa. Dra. Natália Nogueira Saraiva

Relatório Final

Período  
2016/2017

## RESUMO

Os produtos naturais são usados a muito tempo pela humanidade no tratamento e cura de patologias. Tais propriedades medicinais são consequência da presença de substâncias químicas complexas bioativas. No cenário atual, os fungos endofítico destacam-se como fonte promissora desses compostos. Assim, esse estudo realizou uma bioprospecção da atividade citotóxica de extratos orgânicos produzidos a partir de um isolado fúngico de *Humirianthera ampla* uma planta de raiz tuberosa, predominante na Amazônia, que pertence à família das Icacinaceas cuja raiz é utilizada como anti-ofídicos. O fungo B4-2N cresceu em diferentes meios de cultura (batata-dextrose - BD, sabouraud dextrose - SBD e extrato de carne e peptona - MEP) durante 22 dias. Os extratos orgânicos foram obtidos por diferentes métodos de extração: maceração, ultrassom e maceração + ultrassom. Os extratos orgânicos foram analisados por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). A partir da comparação das duplicatas das massas dos extratos obtidos a partir do micélio, observou-se que o fungo crescido em SBD pelo método de maceração forneceu maior média (0,17 g) e dos obtidos a partir do meio líquido por partição líquido-líquido o melhor resultado foi o extraído do BD (0,02 g). Através da análise do perfil cromatográfico, bem como dos resultados da atividade citotóxica, foi observado que o extrato orgânico mais promissor para uma investigação de metabólitos bioativos foi o obtido pelo crescimento em BD pelo método de maceração, inibindo duas das 4 células tumorais testadas: (inibição de 96,96% da linhagem leucêmica e 95,73% da linhagem de célula colorretal).

**PALAVRAS CHAVES:** Atividade citotóxica, Extratos fúngicos, e Métodos de extração.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 4  |
| 2. OBJETIVOS.....   | 6  |
| 2.1 GERAL .....   | 6  |
| 2.2 ESPECÍFICO .....  | 6  |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA.....   | 7  |
| 3.1. PRODUTOS NATURAIS.....   | 7  |
| 3.2. FUNGOS.....  | 7  |
| 3.3. FUNGOS ENDOFÍTICOS.....  | 8  |
| 3.4. PROPRIEDADE CITOTÓXICA.....  | 9  |
| 4. METODOLOGIA.....   | 11 |
| 4.1. OBTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS .....                                    | 11 |
| 4.2. SELEÇÃO E PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA .....                               | 11 |
| 4.3. INOCULAÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO .....                                       | 11 |
| 4.4. EXTRAÇÃO.....  | 11 |
| 4.4.1. MACERAÇÃO .....  | 12 |
| 4.4.2. ULTRASSOM.....   | 12 |
| 4.4.3. ULTRASSOM + MACERAÇÃO .....  | 12 |
| 4.5. ATIVIDADE CITOTÓXICA .....   | 12 |
| 4.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PLANAR .....   | 13 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 14 |
| 5.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MASSAS DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO FUNGO B4-2N ..... | 14 |
| 5.2 ANÁLISE EM CCDA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS OBTIDOS DO FUNGO B4-1A .....         | 15 |
| 5.3. ATIVIDADE CITOTÓXICA .....   | 17 |
| 6. CONCLUSÕES .....   | 18 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 19 |

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo Veiga et al. (2006), desde os tempos remotos o homem utiliza produtos naturais oriundos de plantas, animais e microrganismos se beneficiando das suas propriedades biológicas e medicinais, afim de alcançar o alívio, a cura de doenças, o controle de pragas na agricultura e inúmeras outras aplicações. Chapla, V. M.; Biasetto, C. R.; Araujo, A. R., (2013) afirmam que há muito tempo a medicina e os produtos naturais possuem uma relação íntima pela sua utilização na produção de medicamentos populares e essa relação de longa data é observada nos achados históricos que relatam que em 2600 a.C. os povos mesopotâmicos registraram a utilização dos primeiros produtos naturais a base de plantas e seus derivados no tratamento de resfriados, infecções parasitárias e inflamações. (SILVA, P. I. 2014).

As propriedades medicinais, biológicas e farmacológicas intrínsecas oferecidas pelos tão utilizados produtos naturais são, na verdade, desempenhadas por substâncias químicas complexas e de estruturas variadas presentes em sua composição (JI et al., 2009; SILVA, P. I. 2014).

Dentre as classes de organismos vivos que apresentam grande potencial para produção de substâncias bioativas que podem ser usadas na medicina, na agricultura e na indústria alimentícia, estão os fungos que passam a desempenhar um papel bastante significativo no descobrimento e desenvolvimento de novas drogas e produtos naturais (CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R. & ARAUJO, A. R., 2013). Essa afirmativa é comprovada por Newman e Cragg que analisaram os agentes terapêuticos aprovados, em todo o mundo, nos últimos 30 anos (1981 a 2010) e concluíram que das novas entidades químicas aprovadas, 29% foram obtidas de origem natural (NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. 2007).

Porém, o interesse maior pelo estudo dos fungos só foi possível graças ao acidente presenciado por Alexander Fleming em 1928 que acabou obtendo a penicilina isolada do fungo *Penicillium notatum*, o primeiro metabólito secundário obtido de um microrganismo. Foi a partir deste evento acidental que houve de fato um avanço no interesse pelos estudos e pesquisas em microrganismos, visto que estes possuíam potencial de produzir substâncias bioativas que poderiam auxiliar na saúde (CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R. & ARAUJO, A. R., 2013).

Nos dias atuais, uma atenção maior vem sendo dada a um grupo de fungos denominados de endofíticos, ascomicetos definidos por sua ocorrência assintomática nos tecidos vegetais e principalmente caracterizados por não causarem danos imediatos ao hospedeiro. Segundo Ownley et al. (2010), esses micro-organismos associados a plantas representam uma fonte inexplorada de produtos naturais novos e bioativos, com mais de 20000 substâncias já descritas que apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, como antimicrobiana, antiparasitária, neuroprotetora, antioxidante, antiviral, anticolinesterásica, antineoplásicos e citotóxica.

Desse modo esse trabalho tem como objetivos determinar as condições ótimas de cultivo e extração de metabólitos secundários além de avaliar potencial citotóxico dos extratos dos fungos endofíticos de *Humirianthera ampla* uma planta de pequeno porte que tem como centro de dispersão a Amazônia brasileira. Caracteriza-se por possuir uma raiz tuberosa bastante desenvolvida e rica em fécula. Conhecida popularmente como mairá, mairã, surucuína ou surucucuína tem suas raízes usadas por índios e seringueiros da região como medicamento anti-ofídico (MARQUES, R. A., 2007)

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Investigar o potencial de fungos endofíticos de *Humirianthera ampla* como fonte de metabólitos secundários bioativos.

### 2.2 ESPECÍFICO

- Cultivo dos fungos em diferentes meios (BD, MEP e SBD);
- Obtenção de extratos orgânicos por diferentes métodos de extração;
- Análise do perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA);
- Testar os extratos orgânicos obtidos frente a quatro linhagens tumorais: cólorretal, glioblastoma, próstata e leucêmica.

## 3. REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1. PRODUTOS NATURAIS

A pesquisa por novos agentes farmacologicamente ativos, obtidos por fontes naturais, tem levado a descoberta de fármacos potentes com um papel importante no tratamento das doenças humanas (BORGES, W. S., 2008). Aproximadamente 63% dos fármacos aprovados entre 1981 e 2006 para combate do câncer e doenças infecciosas são produtos naturais ou derivados de produtos naturais. Cerca da metade de todos os fármacos usados atualmente são de origem natural. (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Os metabólitos secundários são compostos presentes nos produtos naturais caracterizados por estrutura química complexa, baixo peso molecular, atividades biológicas marcantes e que, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas e outros organismos (BERG, J. M. T E LUBERT, j., 2008). Já foram considerados como produtos de excreção do vegetal no passado. Essas substâncias fazem parte do metabolismo especializado e dessa forma despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas nas plantas, animais e microrganismos em resposta aos estímulos do meio ambiente, como também pela imensa atividade farmacológica que possuem. Muitos são de importância comercial não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônômica e perfumaria (Simões et al., 2007).

Os microrganismos constituem uma importante fonte dessas substâncias ativas, mas apesar das inúmeras aplicações biológicas e sua imensa diversidade de espécies existentes, ainda são pouco estudados (BORGES, W. S., 2008).

### 3.2. FUNGOS

O Reino Fungi é constituído, aproximadamente, 1,5 milhões de espécies com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta (CHAPLA et al., 2011). Os fungos formam um grupo de micro-organismos eucarióticos, uni ou multicelulares,

com parede celular e com estruturas reprodutivas que apresentam uma variedade de formas. São organismos que não possuem pigmentos fotossintetizantes, sendo heterotróficos com nutrição por absorção. Os fungos podem ser filamentosos, constituídos por filamentos longos e ramificados denominados hifas; leveduriformes, constituídos por células individuais que se reproduzem por brotamento ou fissão binária; ou dimórficos, podendo ser filamentosos ou leveduriformes dependendo das condições ambientais, principalmente a temperatura (ARAÚJO et al., 2010;).

Segundo Santos T. T.; Varavallo A. M. (2011), dentre os grupos de fungos estão os endofíticos, aqueles que vivem no interior das plantas, habitando de modo geral em suas partes aéreas, como folhas e caules, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros. Isso os diferencia dos microrganismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas e causam-lhes doenças e dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais.

### 3.3. FUNGOS ENDOFÍTICOS

Um interesse crescente, vem sendo dado aos fungos endofíticos porque possuem grande potencial na produção de substâncias bioativas. O termo endófitos, originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a qualquer micro-organismo que vive nos tecidos das plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície. São encontradas diferentes definições de endófitos na literatura (CHAPLA et al., 2011), mas a definida por Bacon e Write, amplamente aceita e utilizada, é que endófitos são micro-organismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar efeitos negativos imediatos (CHAPLA et al., 2011).

Segundo Specian V. et al. (2014), existem mecanismos envolvidos na relação endófito-planta que ainda não são bem compreendidos, porém sabe-se que as interações podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas, os endófitos produzem substâncias químicas bioativas que originam diversas vantagens à planta, como o aumento da tolerância a estresses abióticos, diminuição do ataque de herbívoros e insetos e controle de outros microrganismos como também produzem substâncias químicas caracterizadas originalmente da planta hospedeira. Em contrapartida, a planta garante ao endófito os nutrientes necessários à sua sobrevivência, abrigo e transferência horizontal de genes às próximas gerações.

Os fungos possuem a capacidade de produzir uma grande variedade de diferentes metabólitos secundários devido sua capacidade de adaptação ao ambiente no qual encontra-se



inserido. Alguns isolados endofíticos possuem a capacidade de produzir diferentes substâncias, como os compostos orgânicos voláteis bioativos (VOCs), que podem atuar com outras classes de compostos, sendo letais para outros microrganismos, como os patógenos e as bactérias Gram positivas e Gram-negativas (SPECIAN, V. et al. 2014).

As várias classes de moléculas produzidas pelos fungos endofíticos podem possuir atividades hormonais, antibióticas, antitumorais, antifúngicas, citotóxicas, antivirais, imunossupressoras, antiparasitárias, entre outras. Os produtos naturais obtidos de endófitos incluem principalmente alcalóides, esteróides, terpenóides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanóides, ligninas, fenóis e ácidos fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, flavonóides, peptídeos e xantonas (SPECIAN, V. et al. 2014).

### 3.4. PROPRIEDADE CITOTÓXICA

O câncer é uma doença que afeta diversos órgãos do corpo, sendo caracterizada através do crescimento desordenado de células anormais e invasão em tecido normal, podendo espalhar-se por outras regiões do corpo, gerando novos tumores. Graças ao aumento dos casos de câncer no mundo há uma crescente necessidade de novos fármacos com propriedades citotóxicas. Pesquisas mostram que organismos endofíticos podem produzir os mesmos metabólitos que suas plantas hospedeiras e a produção de taxol (anticancerígeno) por um microrganismo endofítico foi demonstrada pela primeira em 1993, onde se evidenciou que o fungo endofítico *Taxomyces andreanea*, encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia*, era capaz de produzir taxol. Outros trabalhos demonstraram que diferentes espécies de fungos endofíticos produzem taxol como é o caso de *Pestalotiopsis microspora*, isolado de *Taxus wallachiana* e *Tubercularia sp.*, isolado de *Taxus mairei* (SANTOS T. T.; VARAVALLO A. M. 2011)

Segundo Silva, P. I. (2014), alguns metabólitos extraídos de alguns endófitos mostraram atividade anticancerígena, como por exemplo, contra as células PC-3, PANC-1, e A549, de um metabólito chamado beauvericina isolado do endofítico *Fusarium oxysporum*, da planta *Cinnamomum kanehirae*. Um composto derivado de 9,10-antracenediona isolado dos endofíticos *Halorosellinia sp.* e *Guignardia sp.*, fungos de manguezais, demonstrou forte atividade contra as células cancerígenas KB e KBv200, Outro composto, o Altersolanol A oriundo do endofítico *Stemphylium globuliferum*, obtido da planta *Mentha pulegium*, foi ativo contra as células K562

(leucemia mielóide crônica) e A549 (câncer de pulmão). Verificou-se também atividade anticancerígena de dois novos norsesquiterpenos, nomeados de talaperoxide B e D), isolado de *Talaromyces flavus*, endofítico de *Sonneratia apétala*, contra cinco linhagens celulares cancerígenas humanas, MCF-7, MDA-MB-435, HepG2, HeLa, e PC-3.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. OBTENÇÃO E PRESERVAÇÃO DOS FUNGOS

Os fungos endofíticos utilizados no presente trabalho foram obtidos a partir de uma parceria com a Universidade Federal do Ceará, onde foi realizado o isolamento desses microrganismos.

Inicialmente os fungos foram incubados em meio de cultura semissólido BDA por 7 dias em seguida preservados em óleo mineral para evitar a desidratação dos mesmos. As culturas fúngicas assim preservadas serviram de matriz para todos os estudos realizados nesse trabalho.

### 4.2. SELEÇÃO E PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

O fungo B4-2N foi crescido em três diferentes meios de cultivo: batata-dextrose (BD), sabouraud-dextrose (SBD) e extrato de carne e peptona (MEP). O crescimento dos fungos ocorreu em 10 frascos de Erlenmeyers para os diferentes meios de cultura líquido (BD, MEP e SBD), contendo em cada 50 mL de caldo dos meios, sendo um utilizado como controle e os outros 9 utilizados para inóculo e extração.

### 4.3. INOCULAÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO

Previamente, os fungos foram colocados para crescer durante 7 dias em meio semissólido Ágar Sabourad (SBA). Após o período de crescimento, com o auxílio de uma pipeta de vidro cortou-se o micélio em pequenos discos de aproximadamente 6 mm e realizou-se o inóculo de modo que um disco foi adicionado a cada um dos 9 frascos Erlenmeyers com os diferentes meios de cultura.

### 4.4. EXTRAÇÃO

Após os 22 dias de cultivo, o micélio crescido nos meios líquidos foi separado do meio de cultura por filtração à vácuo. O micélio foi extraído com 20 mL da mistura binária acetato de

etila/ metanol na proporção 1:1 (AcOEt/MeOH 1:1). Para o meio de cultura líquido obtido realizou-se partição líquido-líquido com 25 mL de AcOEt.

Foram utilizados três diferentes processos de extração: maceração (M), ultrassom (U) e ultrassom + maceração (U+M). Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

#### 4.4.1. MACERAÇÃO

Os micélios foram expostos a uma mistura binária de 20 mL AcOEt/MeOH 1:1 e deixados em repouso. O solvente foi trocado de dois em dois dias, e a remaceração ocorreu 2 vezes após a primeira exposição. Em seguida utilizou-se o evaporador rotativo para obtenção dos extratos secos.

#### 4.4.2. ULTRASSOM

Os micélios foram expostos a uma mistura binária de 20 mL AcOEt/MeOH 1:1 e em seguida colocados no ultrassom durante 30 minutos. Logo após, utilizou-se o rotaevaporador para obtenção dos extratos secos.

#### 4.4.3. ULTRASSOM + MACERAÇÃO

Os micélios foram expostos a uma mistura binária de 20 mL AcOEt/MeOH 1:1, em seguida, colocados no ultrassom durante 30 minutos. Posteriormente permaneceram em maceração, onde o solvente foi trocado de dois em dois dias. A remaceração ocorreu 2 vezes após a primeira exposição. Utilizou-se o rotaevaporador para obtenção dos extratos secos.

### 4.5. ATIVIDADE CITOTÓXICA

A atividade citotóxica dos extratos orgânicos do fungo endofítico B4-2N foi realizada em parceria com a Universidade Federal do Ceará- UFC. As linhagens de células tumorais utilizadas, HCT-116 (Cólorretal), SF295 (Glioblastoma), PC3 (Próstata) foram cedidas pelo

Instituto Nacional do Câncer (EUA) e HL 60 (leucêmica), tendo sido 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 CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as amostras de extratos foram diluídas em DMSO puro para concentrações de estoque de 5 mg/mL para todos os compostos.

A análise de citotoxicidade foi realizada pelo método do MTT- ensaio da atividade metabólica mitocondrial, método comumente utilizada nos ensaios de citotoxicidade. As células foram plaqueadas nas concentrações de  $0,7 \times 10^5$ ,  $0,3 \times 10^6$  e  $0,1 \times 10^6$  céls/mL para as linhagens HCT-116, hL 60 e SF295/PC3, respectivamente. O tempo de incubação do ensaio foi de 72h.

Os experimentos de concentração única foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism 5*.

#### 4.6. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA PLANAR

A análise cromatográfica em camada delgada analítica (CCDA) foi feita sobre cromatofolhas de alumínio cobertas com gel de sílica 60 F254 – Merck (espessura de 0,2 mm). Como fase móvel foi utilizada hexano/acetato de etila 1:1. A revelação das substâncias nas placas analíticas foi realizada através de exposição a uma lâmpada ultravioleta – 25 da Mineral Light, no comprimento de onda 365 nm e imersão com solução de vanilina em HClO<sub>4</sub>/EtOH.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MASSAS DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO FUNGO B4-2N

As massas dos extratos orgânicos obtidos no experimento variaram de 0,0036 g a 0,2345 g (Tabela 1), sendo que as maiores massas ( $> 0,2000$  g) foram obtidas do isolado fúngico crescido em sabouraud-dextrose (SBD) e as menores ( $< 0,0200$  g) foram obtidas no crescimento fúngico cultivado no caldo do extrato de carne e peptona (MEP).

Do ponto de vista ótico, o meio que melhor favoreceu o crescimento de massa micelial do fungo B4-2N foi o BD, porém, a partir da comparação das duplicatas das massas dos extratos, observou-se que a maior média obtida (0,17 g) foi a do fungo crescido em SBD, entretanto, o meio BD forneceu a segunda maior média (0,13g) não apresentando diferença significativa se comprada ao SBD. Isso era esperado, já que o SBD é um meio de cultura próprio para o crescimento fúngico, sendo rico em peptonas e possuindo um pH ótimo para a sua fermentação e inibição de bactérias, assim como o BD.

Em relação ao método de extração, esperava-se que o método combinado entre maceração e ultrassom fosse o mais eficiente em relação a quantidade de massa obtida de extrato, mas o método de maceração foi o mais adequado. Entretanto, as diferenças entre as massas dos extratos obtidos para cada meio comparando-se apenas esses dois métodos não são tão diferentes.

Para os extratos obtidos a partir do meio líquido, através partição líquido-líquido, o melhor resultado foi o extraído do BD (0,02 g), pois assim como o SBD é um meio de cultura rico em nutrientes.

**Tabela 1** – Médias e desvio padrão das massas de extratos.

| Meio de cultura | Método de extração | Média das triplicatas | Desvio Padrão |
|-----------------|--------------------|-----------------------|---------------|
| BD              | M                  | 0,13 g                | $\pm 0,01$    |
| BD              | U                  | 0,07 g                | $\pm 0,01$    |
| BD              | U+M                | 0,11g                 | $\pm 0,02$    |
| BD              | MLS                | 0,02 g                | $\pm 0,00$    |
| SBD             | M                  | 0,17 g                | $\pm 0,06$    |
| SBD             | U                  | 0,07 g                | $\pm 0,02$    |

|            |     |        |        |
|------------|-----|--------|--------|
| <b>SBD</b> | U+M | 0,14 g | ± 0,02 |
| <b>SBD</b> | MLS | 0,01 g | ± 0,00 |
| <b>MEP</b> | M   | 0,02 g | ± 0,00 |
| <b>MEP</b> | U   | 0,01 g | ± 0,00 |
| <b>MEP</b> | U+M | 0,05 g | ± 0,02 |
| <b>MEP</b> | MLS | 0,01 g | ± 0,00 |

BD- Batata-Dextrose; SBD- Sabouraud-Dextrose; MEP- Extrato de Carne e peptona; M- maceração; U- ultrassom; U+M- ultrassom + maceração; MLS- partição líquido-líquido.

## 5.2 ANÁLISE EM CCDA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS OBTIDOS DO FUNGO B4-2N

Abaixo estão as fotografias da análise dos perfis cromatográficos dos extratos obtidos da fermentação do isolado fúngico B4-2N de *H. ampla* em diferentes meios de cultura e métodos de extração.

Figura 2 – Fotografia das placas cromatográficas em solução de vanilina com  $\text{HClO}_4/\text{EtOH}$ . 1 - Método de extração U+M; 2 - Método de extração U; 3 - Método de extração M; 4 - Método de extração de partição líquido-líquido. Seguindo a sequência das duplicatas dos extratos orgânicos obtidos dos meios de cultura BD, SBD e MEP

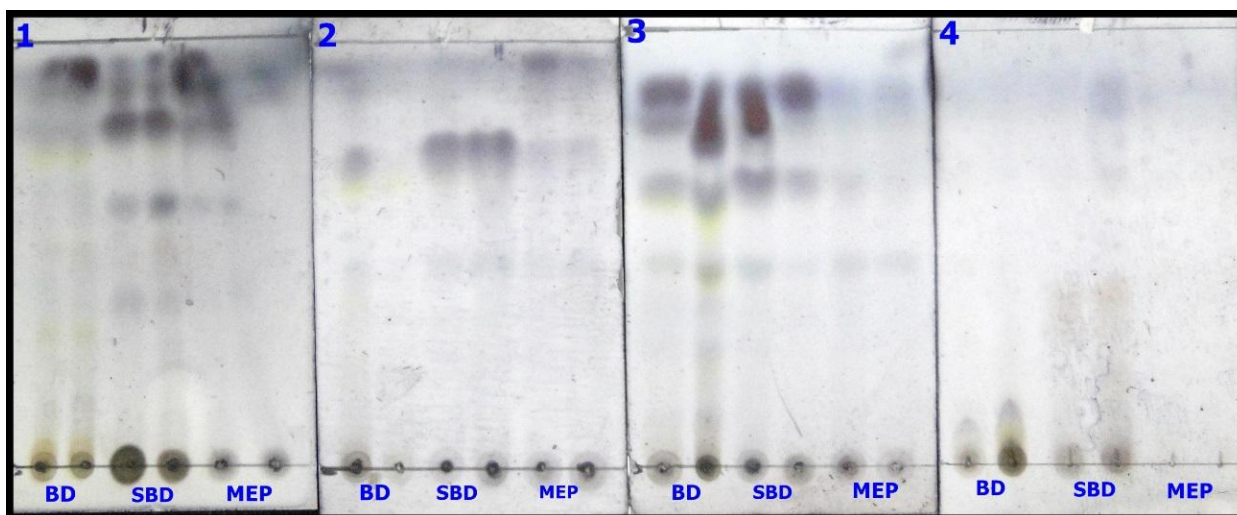
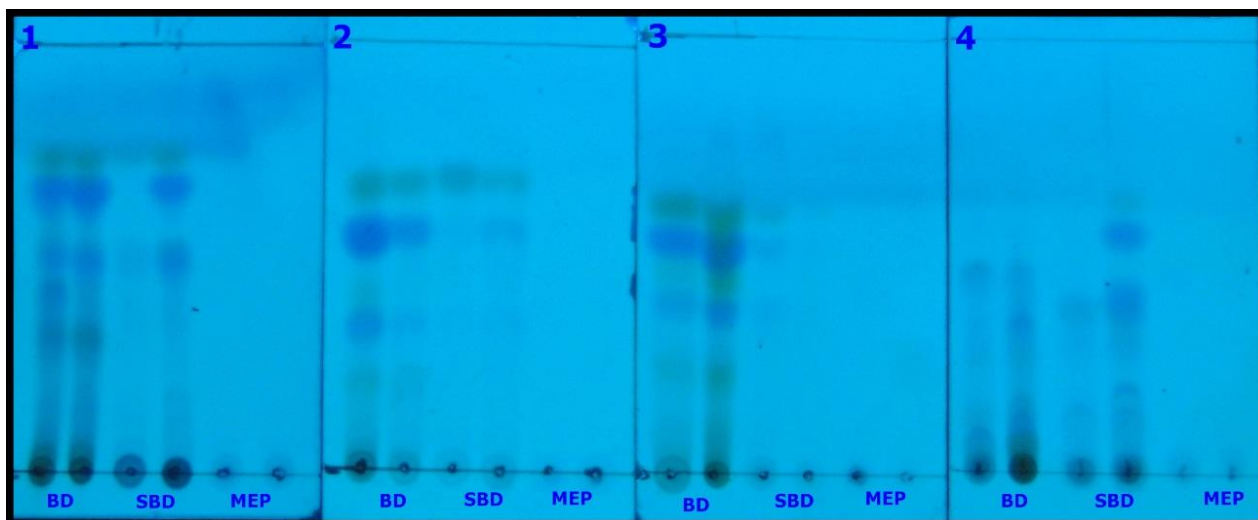


Figura 3 – Fotografia das placas cromatográficas reveladas no ultravioleta no comprimento de onda 365 nm. 1 - Método de extração U+M; 2 - Método de extração U; 3 - Método de extração M; 4 - Método de extração de partição líquido-líquido. Seguindo a sequência das duplicatas dos extratos orgânicos obtidos dos meios de cultura BD, SBD e MEP.



A análise em CCDA desse experimento tem caráter qualitativo, visto que não se teve cuidado de aplicar a mesma quantidade de extratos na placa cromatográfica. A determinação da mistura binária do eluente utilizado foi realizada a partir de experimentos iniciais com eluentes com menores polaridades, até chegarmos na mistura AcOEt/Hexano 1:1.

Desse modo, duplicatas dos extratos dos caldos BD, SBD e MEP derivados tanto do micélio quanto do meio líquido foram analisados e revelados em luz UV – 365 nm e solução de vanilina possibilitando a observação do perfil de eluição das substâncias presentes nos extratos que apresentaram baixa polaridade, observadas no topo do cromatograma e polaridades intermediárias (Figuras 2 e 3).

Podemos notar que o perfil cromatográfico das duplicatas são semelhantes, garantindo reprodutibilidade nos experimentos. Entretanto, quando comparou-se os cromatogramas dos diferentes métodos de extração apenas os derivados dos métodos de maceração e ultrassom + maceração apresentaram semelhança. Os extratos obtidos a partir da extração do caldo de cultura apresentaram perfis cromatográficos diferentes dos obtidos a partir do micélio, podendo haver uma diferença de substâncias produzidos pelo fungo dentro de suas células e liberadas por ela.

Nos extratos obtidos a partir do cultivo no meio MEP não foi observado um perfil cromatográfico interessante em relação aos outros meios. Assim, inicialmente, não sendo um bom extrato para investigações futuras para o isolamento de substâncias bioativas.



A partir da análise qualitativa em CCDA, podemos selecionar os extratos orgânicos obtidos tanto do caldo de crescimento como da massa micelial a partir dos dois meios de cultivo (BD e SBD) como promissores para isolamento de futuros metabólitos secundários.

### 5.3. ATIVIDADE CITOTÓXICA

Através da análise do perfil cromatográfico, bem como dos resultados da atividade citotóxica, foi observado que dos extratos orgânicos analisados o mais promissor em citotoxicidade foi o obtido pelo crescimento em meio BD pelo método de maceração, inibindo duas das 4 linhagens de células tumorais testadas: 96,96% da linhagem leucêmica e 95,73% da linhagem de célula colorretal, sendo assim, um extrato interessante para uma investigação de metabólitos bioativos.

## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados do crescimento e da obtenção de extratos orgânicos do isolado fúngico B4-2N, determinou-se que a melhor condição de cultivo e extração é a que utiliza o meio de cultura SBD e o método de maceração pois forneceram maior média de massas (0,17g) dentre os extratos. Entretanto definiu-se como a segunda melhor, a condição em que utiliza-se o meio BD também pelo método de extração visto que a média obtida por essa condição (0,13g) não é tão diferente da alcançada em SBD.

Através da análise em CCDA definiu-se que pelo perfil cromatográfico, os extratos mais promissores para investigação de substâncias bioativas são os derivados do cultivado em SBD e BD. Por outro lado os extratos obtidos a partir do caldo de cultura apresentaram perfis cromatográficos diferentes dos obtidos a partir do micélio, indicando uma possível diferença de substâncias produzidos pelo fungo dentro de suas células e liberadas por ela.

Por fim através da análise citotóxica concluiu-se que o extrato orgânico mais promissor foi o obtido pelo crescimento em BD pelo método de maceração, inibindo duas das 4 células tumorais testadas: (inibição de 96,96% da linhagem leucêmica e 95,73% da linhagem de célula colorretal).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo, W. L.; Lacava, P. T.; Marcon, J.; Lima, A. O. S.; Sobral, J. K.; Pizzirani-Kleiner, A. A.; Azevedo, J. L. Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALO, 2010. 167 p.

Berg, J. M. T. e Lubert, J. (2008), Bioquímica. 6.Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p.

Borges, W. S. Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações. 2008. 350 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Chapla, V. M.; Biasetto, C. R.; Araujo, A. R.; Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. *Revista Virtual de química*, 11 de novembro de 2013. ISSN 1984-6835, pag. 421-437.

Chapla, V. M., Silva, D.H.S., Bolzoni, V.S., Ferreira, Lima, D., J., B., Pessoa, C., Moraes, M. O., Araujo, A. R. Bioprospection in endophytes associated with *Eugenia jambolana*, Brazilian Conference of Natural Products, Ouro Preto-MG, 2011.

Ji, H.; LI, X.; ZHANG, H. Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Reports*, Oxford, v. 10, n. 3, p. 194-200, 2009.

Marques, R. de A. Estudo Fitoquímico e Biológico de *Humirianthera ampla* Miers (Icacinaceae) / Ricardo de Araújo Marques. – 2007. 132 f.: il. Color. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza.

Newman, D. J.; CRAAG, G. M. (2007) Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70: 461-477.

Ownley, B. H.; Gwinn, K. D.; Vega, F. E. *BioControl* 2010, 55, 113.

Silva, P. I. Fungos Endofíticos: Fonte Alternativa a Metabólitos Secundários de Plantas. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico, Cuiabá, Brasil, 01 de julho de 2014. v.10, n.18; p. 3888 – 3905.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (2007), *Farmacognosia: da planta a medicamento*. Florianópolis: Editora da UFSC, 1102p.

Specian V.; Orlandelli C. R.; Felber C. A.; Azevedo L. J.; Pamphile A. J. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*; 16(4):345-51, 2014.

Taides Tavares dos Santos; Maurilio Antonio Varavallo; Application endophytic microorganisms in agriculture and production of substances of economic interest. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*, v. 32, n. 2, jul. /Dez. 2011, p. 199-212.

Viegas JR, C.; Bolzani, V.S.; Barreiro, E.J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Química Nova*, v. 29, p. 326-337, 2006.