



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
FACULDADE DE QUÍMICA

DAYANE RODRIGUES DE BRITO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDO BIOLÓGICO DA BIOMASSA DO
FUNGO $I_1S_7S_1A_1$ ISOLADO A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO
MINERALIZADO.**

MARABÁ-PA
2015

DAYANE RODRIGUES DE BRITO

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ESTUDO BIOLÓGICO DA BIOMASSA DO
FUNGO *I₁S_YS₁A₁* ISOLADO A PARTIR DE AMOSTRAS DE SOLO
MINERALIZADO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Química da Universidade Federal
Do Sul e Sudeste do Pará como parte de requisito
para obtenção do Grau de Licenciado em
Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilene Nunes Oliveira

MARABÁ-PA
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca II da UNIFESSPA. CAMAR, Marabá, PA

Brito, Dayane Rodrigues de

Caracterização química e estudo biológico da biomassa do fungo I1SYS1A1 isolado a partir de amostras de solo mineralizado / Dayane Rodrigues de Brito ; orientadora, Marilene Nunes Oliveira. — 2015.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus Universitário de Marabá, Instituto de Ciências Exatas, Faculdade de Química, Curso de Licenciatura em Química, Marabá, 2015.

1. Fungos do solo - Canaã dos Carajás (PA). 2. Alelopatia. 3. Sementes - Testes. 4. Esteróides. I. Oliveira, Marilene Nunes, orient. II. Título.

CDD: 23. ed.: 579.5098115

DAYANE RODRIGUES DE BRITO

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Data da apresentação: 02 de Fevereiro de 2015

Conceito: EXCELENTE

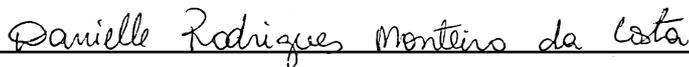
Banca Examinadora



Prof. Dr. Marilene Nunes Oliveira
Faculdade de Química/Unifesspa - Orientadora



Prof. Dr. Sebastião da Cruz Silva
Faculdade de Química/Unifesspa - Membro



Prof. Dr. Danielle Rodrigues Monteiro da Costa
Departamento de Ciências Naturais/UEPA - Membro

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Ruidário
Fernandes de Brito e Lucivone Rodrigues Brito, pela
dedicação, exemplo de força, coragem e sabedoria.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

À minha orientadora por ter aceitado me orientar e me dado todo o auxílio que foi possível. Sendo uma verdadeira mãe.

Aos professores Sebastião e Simone por todo apoio e orientação dada de início a fim do meu TCC, sendo parte fundamental no meu aprendizado, e pela oportunidade dada.

À minha família, meus pais Ruidario, Lucivone e minha irmã Dariany por todo apoio concedido, por me ajudar de forma psicológica e financeira, sempre acreditando em mim.

Ao Torben Ulisses por estar sempre ao meu lado me apoiando e auxiliando de todas as formas possíveis.

Aos meus amigos Thiago Felipe e Allan Raniere por sempre me ajudar, aconselhar e garantir meus momentos de descontração.

Ao meu acompanhante e colega de laboratório Elevelton por ter me ajudado nas realizações dos trabalhos em laboratório.

Aos meus colegas de Universidade por toda a ajuda durante o decorrer do curso e pelos momentos de alegria. Em especial: Janine, Thaianne, Jaciele, Mailson, Vanessa, Maria e Ruberney.

A todos os professores do colegiado de Química por todo o conhecimento dado e por fazerem parte da minha formação.

À professora Alessandra e suas alunas por toda dedicação concedida durante os ensaios realizados em seu laboratório.

Ao laboratório de Minas e Meio Ambiente e em especial ao professor Kidelmar por disponibilizar o laboratório.

Aos laboratórios da UFPA-Belém e universidade de São Carlos-SP pelas análises dos espectros de RMN e aos seus professores e alunos por toda ajuda e conhecimento passado.

Ao professor Antônio Pedro da EMBRAPA e sua equipe por me acolher tão bem e pelos ensinamentos.

Aos guardas e faxineiras da universidade pela paciência e ajuda.

A todos, muito obrigada!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão
uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe
faltasse uma gota”.*

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Os fungos compreendem um grupo heterogêneo de micro-organismos heterotróficos, atuando como sapróbios, parasitas ou, menos frequentemente, como simbiontes vivendo em associação com outros organismos. Considerando-se a escassez de trabalhos no Brasil que tratam da micota filamentosa, bem como a necessidade do conhecimento da diversidade desses fungos, este trabalho teve como objetivo o estudo químico e biológico da linhagem I₁S_γS₁A₁ que foi isolada de amostra de solo mineralizado coletado em Canaã dos Carajás/PA. Para a obtenção da biomassa fúngica foi realizado cultivo em meio sólido (arroz). Os extratos etanólicos obtidos a partir da biomassa foram submetidos aos testes de caracterização (screening) e cromatografia clássica à procura por novas substâncias que possam apresentar propriedades biológicas úteis. Nesse sentido, foram realizados bioensaios alelopáticos e citotóxicos. A avaliação do potencial alelopático foi realizada utilizando sementes das espécies *Senna obtusifolia* (mata-pasto) e *Mimosa pudica* (malícia), visando à inibição da germinação de sementes; nos testes de citotoxicidade, linhagens de células tumorais HCT-116 (côlon humano), AGP (Ascite gástrica), MCF7 (mama humano), SKMEL (melanoma humano), e a linhagem normal MRC5 (fibroblasto humano) foram utilizadas. Os testes para caracterização química levaram a constatação da presença de esteróides. O extrato apresentou resultado satisfatório no teste alelopático frente às sementes de malícia. Não foi observado atividade do extrato frente às células tumorais testadas. Na separação cromatográfica foram obtidas duas substâncias, uma delas sendo o ergosterol, o que está de acordo com a caracterização química realizada. Atualmente o trabalho encontra-se em andamento na tentativa de identificação de demais substâncias.

Palavras-chave: Fungos, alelopatia, citotoxicidade.

ABSTRACT

The fungi comprise a heterogeneous group of heterotrophic microorganisms that act as saprobes, parasites or, less frequently, as symbionts living in association with other organisms. Considering the lack of studies in Brazil dealing with filamentous mycota as well as the need for knowledge of the diversity of these fungi, this study aimed to chemical and biological study of I₁S_γS₁A₁ lineage that was isolated from mineralized soil sample collected in Canaã dos Carajás/PA. To obtain the fungal biomass cultivation was performed on solid environment (rice). The ethanol extracts obtained from biomass were submitted to the characterization tests (screening) and classical chromatography looking for new substances that may present useful biological properties. In this sense, were performed cytotoxic and allelopathic bioassays. The evaluation of allelopathic potential was performed using seeds of the species *Senna obtusifolia* (obtusifolia) and *Mimosa pudica* (malice), aimed at inhibiting seed germination; in cytotoxicity assays, tumor cell lines HCT-116 (human colon), AGP (gastric ascites), MCF7 (breast, human), SKMEL (human melanoma), and normal line MRC5 (human fibroblast) were used. Tests for chemical characterization led to finding of steroids. The extract showed satisfactory results in the allelopathic test with malice seeds. There was no activity of the extract with the tested tumor cells. In the chromatographic separation were obtained two substances, one being ergosterol, which is in agreement with the chemical characterization undertaken. Currently work is underway in an attempt to identify other substances.

Key-words: Fungi, allelopathy, cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
AGP-01	Linhagem de células de câncer de ascite gástrica
BDA	Batata dextrose e ágar
CC	Coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CO ₂	Dióxido de Carbono
<i>d</i>	dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
DMEM	Meio Eaglemodificado por Dulbecco
Doxo	Doxorrubicina
DMSO	Dimetilsufóxido
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EtOH	Etanol
HCT-116	Linhagem de células de câncer de cólon humano
Hex	Hexano
<i>m</i>	multipleto
m/v	Relação massa e volume
MCF7	Linhagem de células de câncer de mama-humano
MeOH	Metanol
MRC5	Linhagem de células de câncer de fibroblasto humano

MTT	brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
p.	Página
PA	Pará
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	singleto
S1	Substância 1
S2	Substância 2
SKMEL-19	Linhagem de células de câncer de melanoma humano
UFPA	Universidade Federal do Pará
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
Unifesspa	Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
%G	Porcentual de germinação
%G _{sem}	Porcentual de Germinação da semente
%G _{test}	Porcentual de Germinação da testemunha
δ	Deslocamento químico
\pm	Mais ou menos
°C	Grau Celsius
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
cm	Centímetro
g	Gramma
<i>h</i>	Altura
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Kg	Quilograma
L	Litro
m	Massa
mg	Miligramas
\emptyset	Diâmetro
ppm	Partes por milhão

SG Sementes Germinadas

ST Sementes por placa

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Fungo reativado para cultivo em meio sólido arroz. A) Verso / B) Frente.....	30
Figura 02 - 24 dias após o cultivo.....	30
Figura 03 - Obtenção do extrato de EtOH.	31
Figura 04 - Sementes das espécies invasoras de pastagens: a) Mata-pasto e b) Malícia.	32
Figura 05 – Modelo de estufa de cultivo a 5% de CO ₂	34
Figura 06 - Fracionamento da coluna filtrante (C1).	39
Figura 07 - Fracionamento do extrato Hex/AcOet 40% (C2).	40
Figura 08 - Gráfico do percentual de inibição das espécies estudadas.....	41
Figura 09 - Teste para carotenoides e triterpenoides.	42
Figura 10 – Ergosterol (S1)	44
Figura 11 - Espectro de RMN 1H de S1, 300 MHz, CDCl ₃	46
Figura 12 - Expansão do espectro de RMN 1H de S1, 300 MHz, CDCl ₃	47
Figura 13 - Espectro de RMN ¹³ C de S1.	48
Figura 14 - Expansão do espectro de RMN ¹³ C de S1.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Produtos naturais com as respectivas fontes produtoras, semi-sintéticos importantes na terapêutica.	19
Tabela 02 - Estruturas de substâncias bioativas.....	23
Tabela 03 - Valores do percentual de inibição obtidos através do teste do MTT.....	42
Tabela 04 - Dados de RMN ¹ H de S1(CDCl ₃ , 300 MHz).....	44
Tabela 05 - Dados de RMN ¹³ C de S1.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	PRODUTOS NATURAIS	18
3.2	FUNGOS DO SOLO	21
3.3	ALELOPATIA.....	22
3.4	PRODUTOS NATURAIS, ALTERNATIVA TERAPÊUTICA DO CÂNCER ...	24
4	PARTE EXPERIMENTAL	27
4.1	MATERIAIS UTILIZADOS	27
4.2	METODOLOGIA.....	29
4.2.1	Isolamento e seleção do fungo para o estudo	29
4.2.2	Reativação da linhagem fúngica	29
4.2.3	Cultivo da linhagem em arroz	30
4.2.4	Obtenção dos extratos	31
4.3	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DO EXTRATO EtOH.	32
4.4	TESTE DE CITOTOXICIDADE.....	33
4.5	TESTE DE CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA SEGUNDO BARBOSA, 2004, MATOS, 1997, e COSTA, 2004.	34
4.5.1	Utilizando água destilada como solvente	35
4.5.1.1	Teste para polissacarídeos.....	35
4.5.1.2	Teste para taninos	35
4.5.2	Utilizando metanol como solvente	35
4.5.2.1	Teste para catequinas	35
4.5.2.2	Teste para flavonoides	36
4.5.2.3	Teste para sesquiterpelactonas e outras lactonas	36
4.5.3	Utilizando clorofórmio como solvente	36
4.5.3.1	Teste para carotenoides.	36
4.5.3.2	Teste para esteroides e triterpenoides.	36
4.5.4	Utilizando éter etílico como solvente	37
4.5.4.1	Teste para depsídeos e depsidonas.....	37
4.5.4.2	Teste para cumarinas	37
4.5.4.3	Teste para purinas.....	37
4.5.5	Utilizando solução hidroalcoólica como solvente	38

4.5.5.1	Teste para saponinas	38
4.6	FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS	38
4.6.1	Fracionamento de Hex/AcOEt 40% (C2)	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
5.1	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DO EXTRATO.....	41
5.2	TESTE DE CITOTOXICIDADE.....	41
5.3	TESTE DE CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA SEGUNDO BARBOSA 2004, MATOS 1991, COSTA 2004.	42
5.4	IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA ISOLADA.....	43
6	CONCLUSÃO.....	50
7	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXO A – TRABALHOS DIVULGADOS EM EVENTOS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são responsáveis por uma variedade enorme de produtos naturais conhecidos. São cosmopolitas e componentes importantes dos ecossistemas. Eles habitam os mais variados substratos, sendo que a maioria das espécies vive no solo, tendo um importante papel onde interagem com as plantas, atuam como decompositores fundamentais e são consideradas fontes promissoras de novas substâncias que são utilizadas como drogas para usos terapêuticos e, de fato, diversos medicamentos utilizados nos centros de saúde são derivados de metabólitos de fungos (STROBEL et al., 2004; FERRARA, 2006).

Essas substâncias têm merecido uma atenção especial, pois além de ter utilidade na farmacologia, as novas substâncias, muitas vezes, oferecem um enorme potencial para o controle de plantas daninhas e de outras enfermias que comprometem o desempenho da agricultura e auxiliam na diminuição da utilização do uso de pesticidas que, na maioria das vezes, apresentam longa persistência no meio ambiente, especialmente em solos, podendo tornar o mesmo inviável (SOUZA FILHO, 2006). Além de estudos comprovarem que muitas dessas substâncias têm se mostrado ativas para prevenir ou tratar o câncer, pois a maioria destas substâncias apresenta baixa toxicidade, representando, portanto, uma alternativa terapêutica (WANG et al., 2006).

Com a descoberta da penicilina, isolada do fungo *Penicillium notatum*, houve um crescimento na investigação dos fungos, sendo hoje, uma das principais fontes de produtos naturais, o que ocasionou um avanço de medicamentos originários destes.

Portanto, faz-se necessário pesquisar e buscar métodos alternativos a partir de produtos naturais, uma vez que, representam uma oportunidade para diminuir os danos causados ao meio ambiente e a saúde humana em função do uso de produtos sintéticos.

Neste contexto, pretende-se contribuir para o conhecimento da biodiversidade da Amazônia, investigando o potencial químico e biológico da biomassa obtida a partir do fungo I₁S_YS₁A₁ isolado de solo mineralizado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho consistiu em explorar a linhagem fúngica I₁S_YS₁A₁ isolada do solo como produtor de substâncias bioativas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar e identificar substâncias químicas a partir da biomassa fúngica;
- b) Avaliar o extrato em testes alelopáticos;
- c) Avaliar o potencial de citotoxicidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PRODUTOS NATURAIS

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os produtos naturais. A Química de Produtos Naturais (QPN) é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores (PINTO et al., 2002).

Os produtos farmacêuticos juntamente com os agroquímicos são hoje considerados os dois pilares de sustentação da civilização moderna. A frase *mens sana in corpore sano* é, certamente, o produto ideal de um projeto científico interdisciplinar, cujo resultado final é a qualidade de vida da espécie humana. Neste contexto, os produtos naturais isolados de micro-organismos, de uma forma geral, têm uma importância sem precedentes, não só como medicamentos (exemplo antibióticos), mas, principalmente como agroquímicos menos danosos à saúde humana (PINTO et al., 2002).

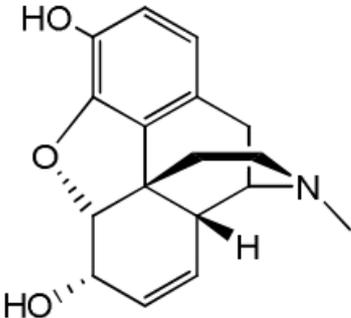
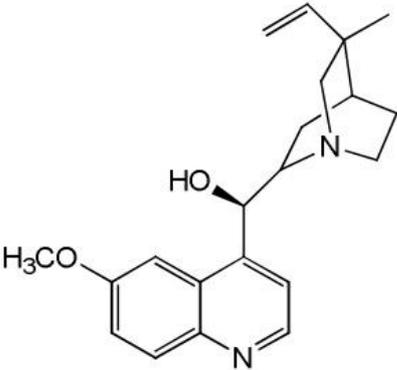
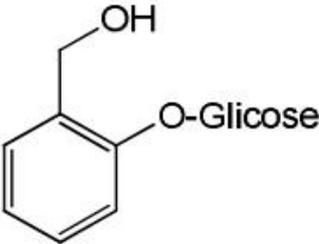
O início da utilização e investigação de fungos na indústria farmacêutica se deu inicialmente com a descoberta acidental da penicilina, por Fleming em 1928, isolada do fungo *Penicillium notatum*, descobrindo uma das fontes mais prolíficas de produtos naturais. Pesquisas mostram o enorme potencial dos fungos em produzir diversas classes de substâncias que podem ser utilizadas tanto na medicina como na agricultura (CHAPLA et al., 2012).

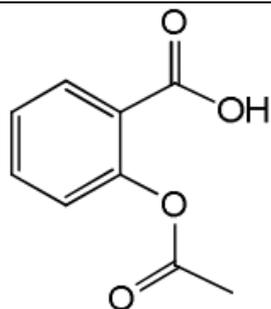
Os micro-organismos são responsáveis por uma variedade enorme dos produtos naturais conhecidos. Existem 50.000 metabólitos secundários de micro-organismos, sendo que, 12.000 são antibióticos conhecidos. Destes, 55% foram produzidos por actinomicetos e 22% por fungos filamentosos (DEMAIN, 1999). Os fungos são considerados fontes promissoras de novas drogas para usos terapêuticos e, de fato, diversos medicamentos utilizados nos centros de saúde são derivados de metabólitos de fungos (STROBEL e DAISY, 2003; FERRARA, 2006).

Sendo essa contribuição dos produtos naturais bastante evidentes, a Tabela 01, p. 19 ilustra o potencial dessas substâncias para o tratamento de doenças, como por exemplo: o potencial analgésico da morfina (1); a quinina (2); que serviu como guia para o desenvolvimento sintético de vários antimaláricos; a salicina (3) que

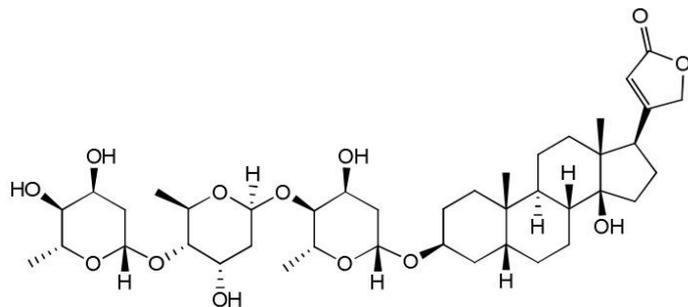
motivou o desenvolvimento do ácido acetilsalicílico (4) – fármaco amplamente utilizado como analgésico e anti-inflamatório; o cardiotônico digitoxina (5), os anticancerígenos paclitaxel (6) e alcaloides da vinca (vincristina, 7 e vimblastina, 8). Recentemente, a galantamina (9), foi aprovada para o tratamento da doença de Alzheimer (BUTLER, 2005; VIEGAS-JR et al., 2006).

Tabela 01 - Produtos naturais com as respectivas fontes produtoras, semi-sintéticos importantes na terapêutica.

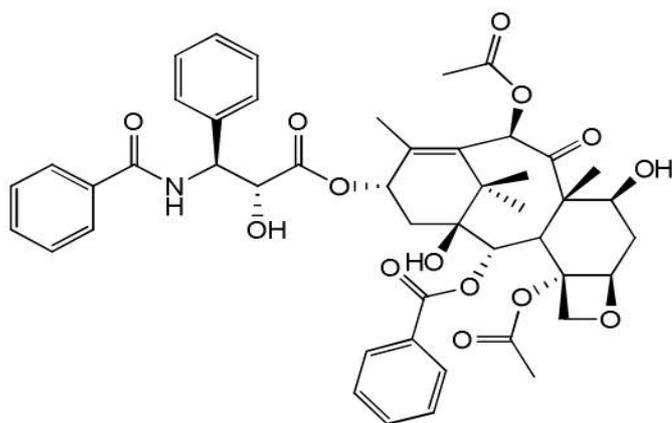
Estruturas	Nomenclatura
 <p>The image shows the chemical structure of morphine, a complex pentacyclic alkaloid. It features a morphine ring system with a hydroxyl group at the 3-position, a methoxy group at the 3-position, and a hydroxyl group at the 6-position. The nitrogen atom is methylated.</p>	<p>(1) Morfina (<i>Papaver somniferum</i>)</p>
 <p>The image shows the chemical structure of quinine, a cinchonine alkaloid. It consists of a quinoline ring system with a methoxy group at the 8-position and a quinuclidine ring system attached at the 6-position. The quinuclidine ring has a hydroxyl group at the 4-position and a vinyl group at the 2-position.</p>	<p>(2) Quinina (<i>Cinchona sp.</i>)</p>
 <p>The image shows the chemical structure of salicylic acid, which is a benzene ring with a hydroxyl group at the 1-position and a hydroxymethyl group at the 2-position. The hydroxyl group is labeled as 'O-Glucose', indicating its glycosylated form.</p>	<p>(3) Salicina (<i>Salix alba</i>)</p>



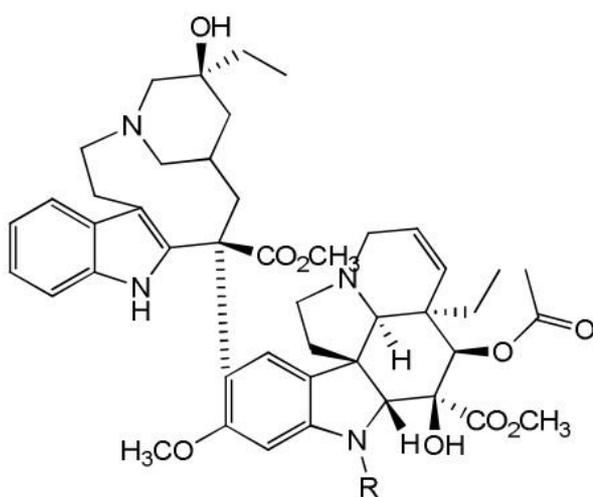
(4) Ácido Acetilsalicílico



(5) Digitoxina

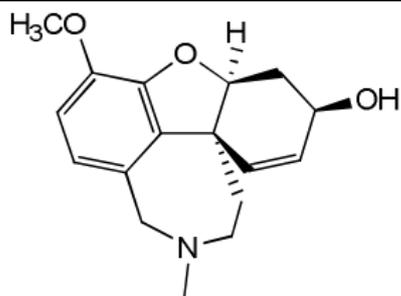
(Digitalis purpurea)

(6) Paclitaxel

(Taxus brevifolia)

(7) R=CHO Vincristina e (8) R=

CH₃ Vinblastina*(Catharantus roseus)*



(9) Galantamina
(*Galantus nivalis*)

Além disso, os produtos naturais também têm aplicações na agricultura, no controle biológico de pragas e doenças em plantas. Extratos provenientes de plantas ou de seus componentes ativos têm sido utilizados como forma de se praticar uma agricultura sustentável.

Assim, constatou-se nos últimos anos uma prioridade de pesquisa sobre a química dos fungos, temendo-se a perda da biodiversidade. Muitas espécies ameaçadas de plantas superiores e insetos estão associadas com a flora específica dos fungos e, se estas perdas ocorrerem, poderá resultar no desaparecimento das espécies de fungos (PINTO et al., 2002).

3.2 FUNGOS DO SOLO

Os fungos, durante muito tempo foram considerados como vegetais e somente a partir de 1969 eles passaram a ser classificados em um reino à parte, denominado reino fungi (PELCZAR et al., 1981). O reino fungi é o reino onde enquadra não só os fungos como também os micélios e cogumelos, sendo este, o ramo da Biologia denominada de micologia ou micetologia (LACAZ et al., 2002).

Dentre os micro-organismos que compõem a biomassa do solo, os fungos merecem destaque por se tratar do principal grupo decompositor da matéria orgânica complexa, degradando a celulose e a lignina, além de outros polímeros amplamente encontrados em áreas florestais. São essenciais para a ciclagem e transporte de nutrientes para as plantas, além de exercer papel importante na supressão de doenças (THORN, 1996; DORAN; HILL et al., 2000). Uma das suas propriedades mais importantes está associada à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas.

Os fungos habitam os mais variados substratos. A maioria das espécies vivem no solo. Acredita-se que existe algo próximo a 1,5 milhões de espécies de fungos. Estes organismos possuem diversos sistemas de sobrevivência nos mais diferentes ambientes, sendo descrita a tolerância até mesmo às condições ambientais extremas, como temperaturas variando de -5 a $+60$ °C, pH 1,0 a 9,0, baixa umidade, e até mesmo uma quantidade mínima de oxigênio (por exemplo 0,2%). Com isto, a presença e o desenvolvimento dos fungos são capazes de influenciar na composição das comunidades de plantas e em processos chaves para o funcionamento dos ecossistemas (SMITH et al., 1997; HAWKSWORTH, 2001; VAN DER HEIJDEN et al., 2008; ZAITZ et al., 1998).

Além da importância para os ecossistemas, muitos estudos têm buscado descrever os fatores que geram e mantêm a diversidade de fungos no ambiente. A distribuição da biodiversidade através de gradientes ambientais como latitude, altitude, produtividade e salinidade tem sido alvo de grande interesse para os ecólogos (FISHER, 1961; ROSENZWEIG, 1995). Alguns trabalhos destacam dentre os diferentes parâmetros ambientais, a importância da disponibilidade de nitrogênio mineral (ALLISON et al., 2007), a fonte nutricional (WALDROP et al., 2006) e a concentração de CO₂ atmosférico (KLAMER et al., 2002), como os principais fatores capazes de interferir na ocorrência de fungos no ambiente.

Tendo em vista a importância dos fungos, e sua potencialidade na degradação de compostos orgânicos e poluentes, o conhecimento da diversidade biológica e funcional desses organismos no ecossistema é de grande relevância (TRESEDER, 2005; WATLING, 2005; HARMS et al., 2011).

3.3 ALELOPATIA

As plantas daninhas afetam a produção das culturas pela interferência sobre a produtividade primária, pelos danos na colheita e pela depreciação da qualidade do produto, contaminando com suas sementes e impurezas (FERREIRA 1998; RIZZARDI et al., 2003).

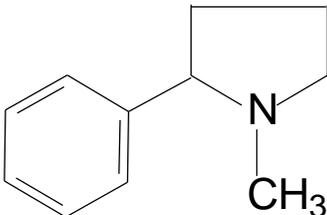
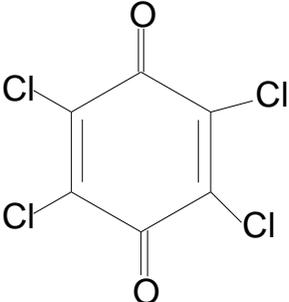
O controle de plantas daninhas em áreas de pastagens cultivadas tem sido há muito tempo realizado pelo uso do fogo e da roçadeira e, mais recentemente, empregando herbicidas sintéticos. Porém, o uso de herbicidas sintéticos, embora seja considerado um método de controle eficaz para um número considerável de espécies

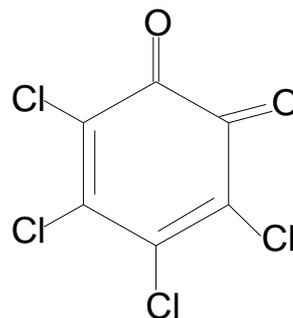
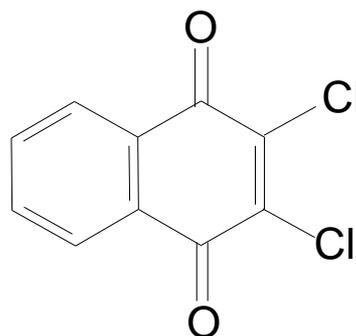
de plantas daninhas, tem sido questionado quanto ao seu impacto ambiental (SOUZA FILHO, 2006). Assim, a alelopatia representa uma oportunidade de minimizar o impacto ambiental causado por essas atividades.

O termo alelopatia é definido como qualquer efeito causado por uma planta, ou microrganismo, sobre outras plantas, por meio de compostos químicos lançados no meio ambiente. Esses compostos são conhecidos como aleloquímicos ou agentes aleloquímicos (PUTNAM e DUKE, 1978; RICE, 1984).

Aleloquímicos têm sido empregados como ferramentas no controle de plantas daninhas em diversas culturas. Entre os mais conhecidos encontram-se os derivados fenólicos, taninos, flavonóides, quinonas, terpenóides, alcalóides, poliacetilenos e esteróides (RICE 1984; INDERJIT 1996; MIZUTANI 1999; KING-DIAZ et al., 2001). A título de exemplo, a nicotina (Tabela 02, p. 23 e 24) extraída das folhas do fumo (*Nicotiana tabacum*) é utilizada no combate de pulgões de árvores frutíferas, e a partir da planta conhecida como noqueira (*Juglans nigra*) é extraída a substância juglona que devido ao seu efeito herbicida deu origem aos fungicidas comerciais diclona e cloranil, conforme mostra as estruturas na Tabela 02 a seguir (PRATES, 2008).

Tabela 02 - Estruturas de substâncias bioativas.

Substância	Estrutura
Nicotina	
<i>p</i> -cloranil	

o-cloranil*p*-diclona

Fonte: PRATES, 2008.

O mecanismo de ação das substâncias alelopáticas sobre outras plantas não é totalmente conhecido (RICE, 1984). Alguns autores afirmam que os aleloquímicos interferem no metabolismo, reduzindo a oferta de energia e, conseqüentemente, impedindo o desenvolvimento normal desses organismos. Pesquisas têm demonstrado que a interferência dos aleloquímicos ocorre com frequência na assimilação de nutrientes, na inibição da fotossíntese (EINHELLIG, 1993; TAWAHA e TURK, 2003; ANAYA, 2005), na respiração (NEAVE e DAWSON, 1989), na síntese de proteínas, na permeabilidade da membrana celular e em atividades enzimáticas, afetando, como consequência, o desenvolvimento da planta (CALDIZ e FERNÁNDEZ, 1999).

Por isso, a investigação de propriedades alelopáticas em plantas, fungos e etc., vêm sendo bastante estudada e pode representar uma solução para esses problemas.

3.4 PRODUTOS NATURAIS, ALTERNATIVA TERAPÊUTICA DO CÂNCER

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo. Dividindo-se

rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INCA, 2012).

Nas últimas décadas, o câncer vem se apresentando como um problema de saúde pública mundial, despertando o interesse urgente na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral. A descoberta de medicamentos para o câncer está relacionada a pesquisas de produtos naturais, sendo que cerca de 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância, sua origem relacionada a uma fonte natural. Dada à biodiversidade do país, as fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Estima-se a existência de mais de dois milhões de espécies de plantas, animais e micro-organismos ocorrentes na biodiversidade brasileira, o que contribui para o aumento das oportunidades de identificação de produtos com possível utilização econômica (GUERRA e NODARI, 2007).

Houghton et al., (2007) afirmam que uma parte significativa das descobertas de drogas nos últimos quarenta anos tem sido focada em agentes para prevenir ou tratar o câncer, já que na maioria dos países desenvolvidos e, cada vez mais nos países em desenvolvimento, o câncer está entre as três causas mais comuns de morte e morbidade. Como formas de tratamento para esta doença estão a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e, frequentemente, uma combinação de duas ou as três são empregadas. Nesse sentido, a descoberta de drogas eficazes representa a possibilidade de diminuir o tempo de tratamento, bem como, a reincidência.

Algas, fungos, líquens e plantas superiores representam importantes fontes para pesquisas de novas moléculas bioativas. As substâncias do metabolismo secundário destacaram-se como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos (CRAGG e NEWMAN, 2005).

Atualmente, produtos naturais, especialmente as ditas anticâncer, têm chamado atenção de institutos farmacêuticos à medida que cientistas percebem que elas são uma fonte quase infinita para o desenvolvimento de drogas e que a toxicidade destas é muito baixa, sem apresentar efeito colateral (WANG et al., 2006). Enquanto drogas sintéticas contra o câncer causam uma morte não específica das células (REDDY et al., 2003). Portanto, drogas anticâncer em amplo uso clínico são

fundamentalmente citotóxicas e agem principalmente inibindo a proliferação celular através de diferentes mecanismos (HOUGHTON et al., 2007).

Nesse contexto, justifica-se a realização dos testes citotóxicos apresentados no presente estudo.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS UTILIZADOS

- **Materiais diversos:**

Erlenmeyers;

Provetas;

Pipetas;

Becker's;

Funis;

Placas de Petri;

Papel filtro.

- **Materiais utilizados para o teste antitumoral:**

Pipetas automáticas

Frascos para cultura de células;

Placa ELISA 96 poços;

Linhagem celular:

HCT-116 (cólono humano);

AGP-01 (Ascite gástrica);

MCF7 (mama-humano);

SKMEL-19 (melanoma humano);

MRC5 (fibroblasto humano).

Reagentes:

Doxorrubicina (Sigma);

Soluções:

Sal tetrazólico MTT (Sigma)

Meio de cultura celular:

DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina);

Solventes:

Clorofórmio;

Metanol;

DMSO (Dimetilsulfóxido);

- **Materiais utilizados para CC:**

Suporte para cromatografia em coluna;

Sílica em gel;

Coluna de vidros com diâmetros variados

Reveladores utilizados:

Iodo líquido;

Iodo sólido.

Solventes para cromatografia:

Solventes orgânicos comerciais: (acetato de etila, diclorometano, etanol, hexano e metanol, PROMIQUIS).

Solventes para análise dos espectros de RMN:

CDCl_3 (Clorofórmio Deuterado).

• ***Substâncias e materiais utilizados para cultivo do fungo:***

Álcool 70%;

BDA;

Arroz (Tio João);

Água.

• ***Equipamentos utilizados:***

Câmara de UV (245 e 360 nm)- BOITTON BOIT-GAB01

Câmara de fluxo laminar (Veco, modelo CFLW09)

Centrífuga de placas (Eppendorf, Modelo Centrifuge 5403);

Evaporador rotativo Fisatom 801e QUIMIS

Autoclave vertical – Phoenix AV 75L

Estufa incubadora - BOD HidroSan TR-05401

Capela de fluxo laminar- Veco-Clean Plus CFLH 09

Leitor de microplacas- BIOTEK – SYNERGY HT

Balança analítica Edutec FA2204C

Balança analítica (Bioprecisa, Modelo JA3003n)

Incubadora de células (CO₂ Water- Jacket Incubator NUAIRE TS Autoflow)

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Isolamento e seleção do fungo para o estudo

Foram coletadas amostras de solo mineralizado da Mina do Sossego em Canaã dos Carajás a partir de três pontos. Para cada ponto foram retiradas quatro amostras, sendo uma amostra por profundidade. A amostra I₁S_YS₁A₁ (primeiro isolado do solo coletado no ponto 1, profundidade 1 em meio de cultura SABOURAUD) foi coletada do primeiro ponto, com profundidade 0-20 cm.

O tratamento da amostra de solo para o isolamento da espécie se deu a partir da preparação de uma suspensão mãe e a partir desta realizou-se duas diluições com concentrações de 10⁻² e 10⁻³. A suspensão mãe foi preparada utilizando 25 g da amostra de solo em 225 mL de água deionizada esterilizada contendo clorafenicol e tetraciclina, ambos na concentração de 100 mg.L⁻¹. A partir das concentrações, foram tomados 100 µL de cada uma delas e dispensados em placas de Petri contendo meio de cultura (BDA, MALTE, SABOURAUD e CZAPEK). Todas as dispersões foram feitas em duplicatas denominadas de X e Y.

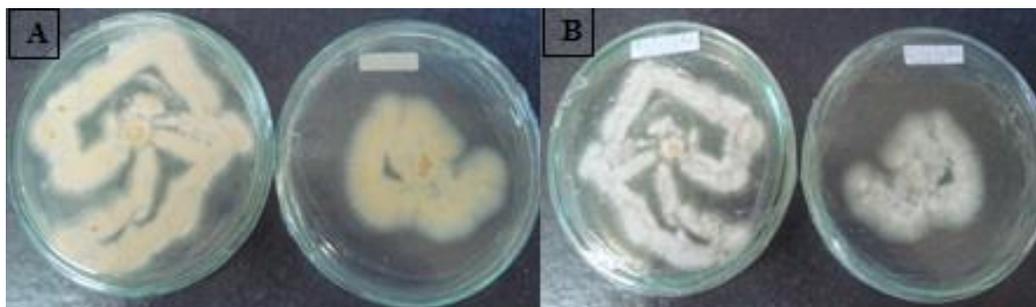
A linhagem I₁S_YS₁A₁ foi isolada a partir do meio de cultura SABOURAUD da placa de Petri denominada Y e preservada de acordo com a metodologia descrita por Castellani, 1939. Apenas essa linhagem fúngica apresentou desenvolvimento no meio citado.

O fungo foi selecionado para estudo devido suas características macromorfológicas, ou seja, apresentava um rápido crescimento e coloração diferenciada.

4.2.2 Reativação da linhagem fúngica

A linhagem I₁S_YS₁A₁ isolada do solo foi inoculada em duas placas de Petri contendo o meio BDA, utilizando a técnica de semeadura em superfície e incubadas a 25 °C por aproximadamente 7 dias. Após esse período, o fungo foi cultivado em meio sólido (Figura 01; p. 30).

Figura 01 - Fungo reativado para cultivo em meio sólido arroz. A) Verso / B) Frente.



Fonte: Autor.

4.2.3 Cultivo da linhagem em arroz

Para o cultivo em meio sólido (arroz Tio João) foram utilizados 10 Erlenmeyers de 1000 mL. Em cada frasco foram adicionados 200,0 g de arroz e 40,0 mL de água destilada. Estes foram devidamente vedados com “bonecas” de gaze e cone de papel para que fosse diminuído o risco de contaminação. Em seguida, esse material foi autoclavado por cerca de 50 min. a 120 °C. Após a etapa de esterilização e resfriamento até a temperatura ambiente foram introduzidos cerca de 3 a 4 fragmentos do fungo em cada frasco. O cultivo foi realizado em um período de 24 dias em modo estático, à temperatura ambiente (em torno de 25 °C) e ao abrigo da luz. Após o período de cultivo e consequentemente obtenção da biomassa fúngica foram obtidos os extratos. Todo o procedimento foi realizado na capela de fluxo laminar com o auxílio do bico de Bunsen para que fosse evitado qualquer risco de contaminação. A Figura 02 exibe as amostras 24 dias após o cultivo.

Figura 02 - 24 dias após o cultivo.

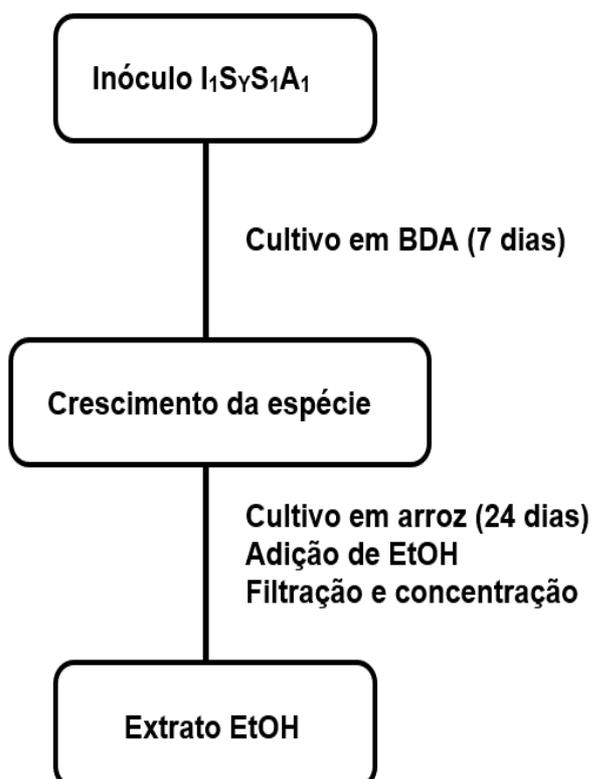


Fonte: Autor.

4.2.4 Obtenção dos extratos

Após os 24 dias foi adicionado EtOH aos erlenmeyers contendo a massa fúngica com dois objetivos: elimina o fungo garantindo a segurança durante a manipulação e o segundo é obtenção de um extrato orgânico. Após 48 h todo o material foi filtrado com o auxílio de papéis de filtro; posteriormente o filtrado foi concentrado utilizando o aparelho rota-evaporador. Depois da primeira adição de EtOH, adicionou-se mais uma vez EtOH nos frascos por um período de três dias, em seguida, realizou-se a extração, e mais uma concentração no rota-evaporador, obtendo-se os extratos (Figura 03). As extrações foram devidamente identificadas e guardadas em frascos. Dos extratos obtidos, foram feitas coluna cromatográfica (CC), teste de caracterização (Screening), avaliação do potencial alelopático e teste citotoxicidade.

Figura 03 - Obtenção do extrato de EtOH.



Fonte: Autor.

4.3 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DO EXTRATO EtOH.

Parte do extrato obtido a partir da biomassa produzida em meio sólido foi testado na concentração 1% (m/v) visando à inibição das sementes das espécies invasoras de pastagens, *Senna obtusifolia* (Mata-pasto) e *Mimosa pudica* (Malícia) (Figura 04).

Figura 04 - Sementes das espécies invasoras de pastagens: a) Mata-pasto e b) Malícia.



Fonte: Autor.

O ensaio foi realizado na EMBRAPA em Belém. Foram utilizadas 6 placas de Petri com 9,0 cm de diâmetro com dois papéis de filtros no fundo de cada placa. Em cada placa foram adicionados 3 mL da solução metanólica, esperou-se a evaporação do solvente, adicionou-se solução antifúngica. Distribuiu-se em triplicata nas placas, 20 sementes de *Mimosa pudica* (Malícia) e 20 sementes de *Senna obtusifolia* (Mata-pasto). A solução antifúngica foi adicionada sempre que necessária durante os cinco dias de teste. As placas foram colocadas em câmara de germinação à temperatura de 25 °C com acompanhamento de 24 horas durante um período de 5 dias para verificação do aparecimento da radícula (germinação fisiológica). A cada dia foram contadas e eliminadas as sementes germinadas. A germinação foi comparada com as testemunhas, controle utilizando apenas a solução antifúngica com o mesmo número de sementes.

O percentual de germinação (%G) foi calculado a partir da Equação 01, onde é feita a divisão da quantidade de sementes germinadas (S_G) pela quantidade total de sementes na placa (S_T), que foi vinte, e multiplicada por cem.

$$\%G = \frac{S_G}{S_T} \times 100 \quad (01)$$

A partir dos valores de percentual de germinação obtidos, foram calculados os percentuais de inibição (%In) das sementes de Malícia e de Mata-pasto. Obtiveram-se as médias do percentual de germinação para cada tipo de semente (%G_{sem}) e de sua respectiva testemunha (%G_{test}), sendo estes valores utilizados na Equação 02.

$$\% In = \left(\frac{\%G_{sem}}{\%G_{test}} - 1 \right) \times 100 \quad (02)$$

4.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE

Os experimentos foram realizados no laboratório de Oncologia do Hospital Barros Barretos e no laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará, no mês de julho de 2014. Utilizou-se 0,01g do extrato orgânico obtido, o mesmo foi dissolvido em DMSO e realizado um ensaio em dose única para concentração final de 50 µg/mL. Foram utilizadas cinco linhagens celulares antitumorais, sendo elas, HCT-116 (côlon humano), AGP-01 (ascite gástrica), MCF7 (mama-humano), SKMEL-19 (melanoma humano), e MRC5 (fibroblasto humano), todas foram cultivadas em meio DMEM, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. (Figura 05, p. 34).

Figura 05 – Modelo de estufa de cultivo a 5% de CO₂



Fonte: Ferreira, 2013.

Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades na seguinte concentração: 5×10^3 células/poço. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. Após um período de incubação de 72 h, as placas foram retiradas e centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e foi adicionado 100 μ L de solução de MTT 0,5 mg/mL em DMEM, sendo a placa colocada na estufa a 5% de CO₂ por um período de 3 horas. Em seguida, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado suspenso novamente em 100 μ L de DMSO e agitado por 10 minutos, até a completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placa a um comprimento de onda de 570 nm. A partir deste ensaio, foi obtido o percentual de inibição do extrato.

4.5 TESTE DE CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA SEGUNDO BARBOSA, 2004, MATOS, 1997, e COSTA, 2004.

O extrato etanólico da linhagem I₁S_YS₁A₁ foi submetido à análise qualitativa dos constituintes químicos por classes metabólicas, como: taninos, catequinas, esteroides e triterpenoides, flavonoides, polissacarídeos, sesquiterpelactonas e outras lactonas, carotenoides, derivados de cumarina, alcaloides, purinas, depsídeos e depsidonas.

A realização do teste ocorreu com a utilização de vários solventes extratores, de acordo com a polaridade de cada classe.

4.5.1 Utilizando água destilada como solvente

Uma solução mãe foi preparada a partir de um miligrama do extrato, diluindo-o em 50 mL de água destilada. A solubilização do extrato foi auxiliada com o equipamento ultrassom. Após a completa solubilização, foram realizados os testes para identificação de polissacarídeos e taninos.

4.5.1.1 Teste para polissacarídeos

Transferiu-se 5 mL da solução mãe para um tubo de ensaio e acrescentou-se duas gotas de reagente lugol. O aparecimento de uma coloração azulada na solução indica a presença de polissacarídeos no extrato.

4.5.1.2 Teste para taninos

Transferiu-se 10 mL da solução mãe para um tubo de ensaio e acrescentou-se uma gota da solução de cloreto férrico 1% (m/v). O aparecimento de uma coloração azulada, verde ou formação de um precipitado indica a presença de taninos.

4.5.2 Utilizando metanol como solvente

Uma solução mãe foi preparada a partir de um miligrama do extrato, diluindo-o em 50 mL de metanol. A solubilização do extrato foi auxiliada com o equipamento ultrassom. Após a completa solubilização, foram realizados os testes para identificação de catequinas, flavonoides, sesquiterpelactonas e outras lactonas.

4.5.2.1 Teste para catequinas

Transferiu-se 3 mL da solução mãe para um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução de vanilina 1% (m/v) e 1 mL de ácido clorídrico. O aparecimento de uma coloração vermelha indica a presença de catequinas.

4.5.2.2 Teste para flavonoides

Transferiu-se 10 mL da solução mãe para um tubo de ensaio. Foram adicionados cinco gotas de ácido clorídrico concentrado. Em seguida, foi acrescentado 1 cm de fita de magnésio ao tubo de ensaio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica a presença de flavonoides.

4.5.2.3 Teste para sesquiterpelactonas e outras lactonas

Transferiu-se 3 mL da solução mãe para um tubo de ensaio. Posteriormente adicionou-se duas gotas da solução de cloridrato de hidroxilamina 10% (m/v) e duas gotas de solução de hidróxido de potássio 10% (m/v). A solução resultante foi aquecida em banho-maria por dois minutos. Após resfriar, foi adicionada solução de ácido clorídrico 1N e uma gota de cloreto férrico 1% (m/v). O aparecimento de uma coloração violeta na solução indica a presença de sesquiterpelactonas e outras lactonas.

4.5.3 Utilizando clorofórmio como solvente.

Uma solução mãe foi preparada a partir de um miligrama do extrato, diluindo-o em 50 mL de clorofórmio. A solubilização do extrato foi auxiliada com o equipamento ultrassom. Após a completa solubilização, foram realizados os testes para identificação de carotenoides, esteroides e triterpenoides.

4.5.3.1 Teste para carotenoides.

Foi transferido 3 mL da solução mãe para um tubo de ensaio e, em seguida, adicionou-se gotas de ácido trifluoroacético concentrado. O aparecimento de uma coloração azul na solução indica a presença de carotenóides.

4.5.3.2 Teste para esteroides e triterpenoides.

Transferiu-se 3 mL da solução mãe para um tubo de ensaio e adicionou-se duas gotas de anidrido acético seguido de agitação. Pelas paredes do tubo, foi adicionado 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. A observação de uma rápida

mudança de cores que varia do azul ao verde persistente na solução indica a presença de esteroides e triterpenoides.

4.5.4 Utilizando éter etílico como solvente.

Uma solução mãe foi preparada a partir de um miligrama do extrato, diluindo-o em 50 mL de éter etílico. A solubilização do extrato foi auxiliada com o equipamento ultrassom. Após a completa solubilização, foram realizados os testes para identificação de depsídeos, depsidonas, cumarinas e purinas.

4.5.4.1 Teste para depsídeos e depsidonas

Transferiu-se 5 mL da solução mãe para um tubo de ensaio. Em seguida o tubo de ensaio foi levado para o banho-maria para que fosse evaporado todo o éter etílico. Após o término da evaporação do éter, foram acrescentados 3 mL de metanol e agitou-se. Por último, adicionou-se três gotas de cloreto férrico 1% (m/v). O surgimento de uma coloração verde, azul ou cinza na solução indica a presença de depsídeos e depsidonas.

4.5.4.2 Teste para cumarinas

Transferiu-se 5 mL da solução mãe para um tubo de ensaio. Em seguida, foi levado ao banho-maria com objetivo de obter uma solução mais concentrada, de aproximadamente 0,5 mL. Após concentrada a solução, foram aplicadas gotas da solução etérea em uma cromatoplaça. Em seguida, a cromatoplaça foi imersa no sistema de fase móvel constituído hexano:dicloro 7:3. A análise da cromatoplaça foi feita pela exposição à luz ultravioleta com $\lambda = 365$ nm, o aparecimento de uma mancha azul acima da mancha onde foi aplicado o extrato, indica a presença de cumarinas.

4.5.4.3 Teste para purinas

Foi aplicada uma pequena quantidade do extrato concentrado em uma cápsula de porcelana e, em seguida, adicionou-se três gotas de solução de ácido clorídrico 6N e duas gotas de peróxido de hidrogênio (30%). A cápsula contendo a solução foi

levada ao banho-maria até que fosse observada a formação de um resíduo de coloração vermelha. Em seguida, foram adicionadas três gotas da solução de hidróxido de amônio 6N. O aparecimento de uma coloração violeta indica a presença de Purinas.

4.5.5 Utilizando solução hidroalcoólica como solvente.

Uma solução mãe foi preparada a partir de um miligrama do extrato, diluindo-o em 50 mL de etanol hidratado 80%. A solubilização do extrato foi auxiliada com o equipamento ultrassom. Após a completa solubilização, foram realizados os testes para identificação de saponinas.

4.5.5.1 Teste para saponinas

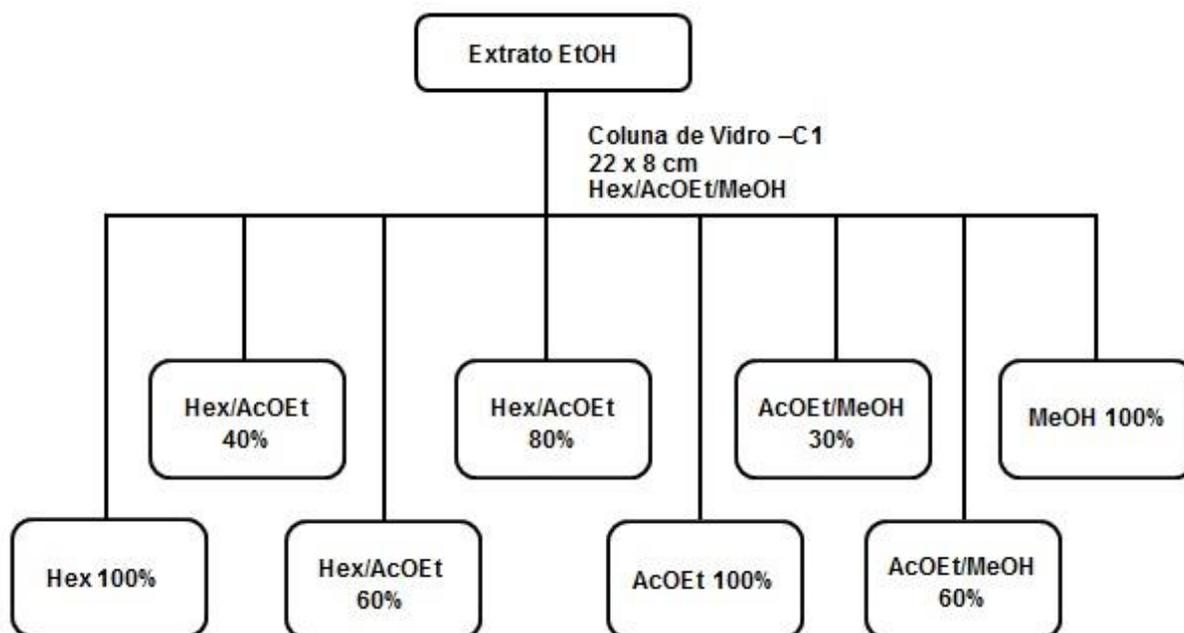
Adicionou-se à solução mãe 15 mL de água destilada. Em seguida, transferiu-se 5 mL para um tubo de ensaio e agitou-se vigorosamente durante 2 minutos em tubo fechado. Após os dois minutos, deixou-se o tubo de ensaio em repouso por 30 minutos para a verificação de espuma. O aparecimento da mesma indica a presença de saponinas.

4.6 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

Ao final da etapa de concentração, necessária a obtenção de um extrato seco, foi observado na superfície do extrato cristais na forma de agulha. Os referidos cristais foram retirados, lavados e analisados. Os estudos espectroscópicos dos cristais obtidos revelaram tratar-se uma substância (S1).

Dando continuidade à investigação química, o estudo cromatográfico clássico do extrato etanólico (34,59 g) foi realizado utilizando sílica gel (70 – 230 mesh) como fase estacionária e misturas de solventes em gradiente crescente de polaridade como fase móvel. Inicialmente, foi preparada e desenvolvida uma coluna filtrante ($h \times \varnothing = 22 \text{ cm} \times 8 \text{ cm}$) para obtenção de fases previamente determinadas (Hex 100%, Hex/AcOEt 40%, Hex/AcOEt 60%, Hex/AcOEt 80%, AcOEt 100%, AcOEt/ MeOH 30%, AcOEt/ MeOH 60%, MeOH 100%), (Figura 06, p. 39).

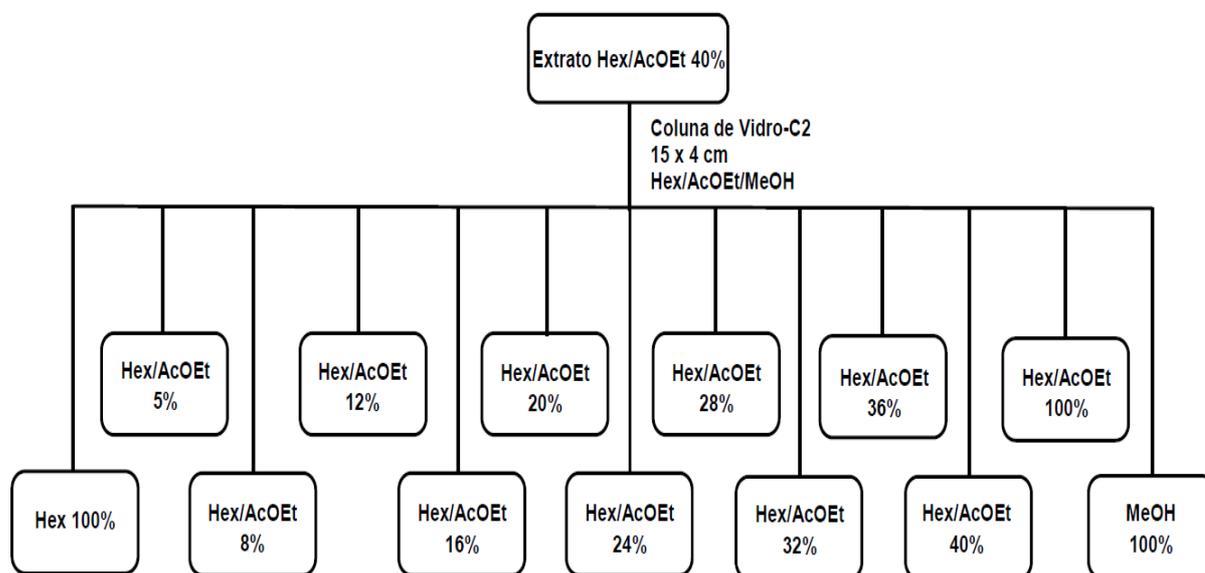
Figura 06 - Fracionamento da coluna filtrante (C1).



Fonte: Autor.

4.6.1 Fracionamento de Hex/AcOEt 40% (C2)

A fração Hex/AcOEt 40% foi submetida ao fracionamento cromatográfico clássico, $h \times \emptyset = 12 \times 8$ cm, utilizando-se sílica gel (70 - 230 mesh) como fase estacionária e gradiente de eluição: Hex 100%, Hex/AcOEt 5%, Hex/AcOEt 8%, Hex/AcOEt 12%, Hex/AcOEt 16%, Hex/AcOEt 20%, Hex/AcOEt 24%, Hex/AcOEt 28%, Hex/AcOEt 32%, Hex/AcOEt 36%, Hex/AcOEt 40%, AcOEt 100%, MeOH 100%, obtendo-se no total treze frações e uma substância (S2). (Figura 07, p. 40).

Figura 07 - Fracionamento do extrato Hex/AcOet 40% (C2).

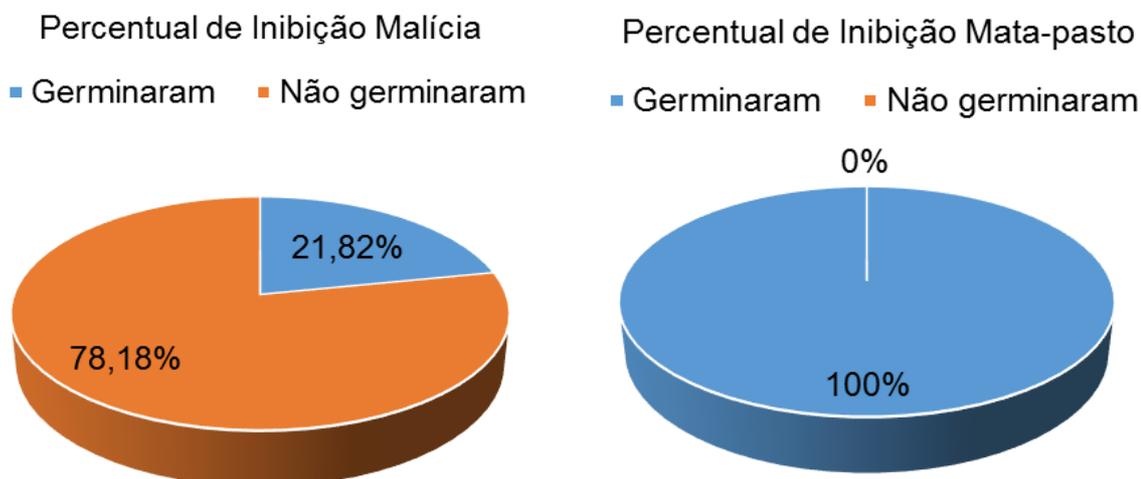
Fonte: Autor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ALELOPÁTICO DO EXTRATO

A partir do bioensaio realizado observou-se que a espécie malícia mostrou-se mais sensível ao efeito do extrato etanólico comparada a espécie mata-pasto, apresentando percentual de inibição da germinação de sementes igual 78,18%. Não foi observado nenhum efeito alelopático do extrato visando à inibição da germinação das sementes de mata-pasto (Figura 08).

Figura 08 - Gráfico do percentual de inibição das espécies estudadas.



Fonte: Autor.

5.2 TESTE DE CITOTOXICIDADE

No screening inicial, foram calculados os percentuais de inibição segundo suas médias e respectivos erros-padrão no programa *Excel*.

Na Tabela 03, p. 42, são apresentados os valores do percentual de inibição obtidos através do teste do MTT, após 72 horas de incubação para as linhagens celulares tumorais (AGP01, HCT-116, MCF7, SKMEL-19) e a linhagem normal MRC5.

Tabela 03 - Valores do percentual de inibição obtidos através do teste do MTT.

EXTRATO	MCF7		AGP-01		SKMEL-19		HCT-116		MRC5	
	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD	%	SD
I ₁ S _Y S ₁ A ₁	-10,35	5,35	7,22	-10,35	21,59	8,12	0,12	2,17	6,40	13,53
DOXO	86,57	0,45	75,98	0,66	92,46	0,10	87,70	0,61	94,44	0,23

Fonte: Autor.

O extrato não apresentou considerada citotoxicidade frente às linhagens testadas. Foi observada uma maior atividade do extrato na linhagem SKMEL-19, com 21,09% de percentual de inibição, porém esse resultado ainda é considerado abaixo do esperado.

5.3 TESTE DE CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA SEGUNDO BARBOSA 2004, MATOS 1991, COSTA 2004.

No teste de caracterização química, com objetivo de conhecer quais as classes de compostos químicos estariam presentes foi detectada a presença apenas da classe dos esteroides e triterpenoides, uma vez que, ao adicionar o ácido sulfúrico concentrado na solução mãe em clorofórmio contendo anidrido acético foi observada uma mudança na coloração, de transparente para verde (Figura 09). Não foram obtidos resultados positivos nos testes para as demais classes.

Figura 09 - Teste para carotenoides e triterpenoides.

Fonte: Autor.

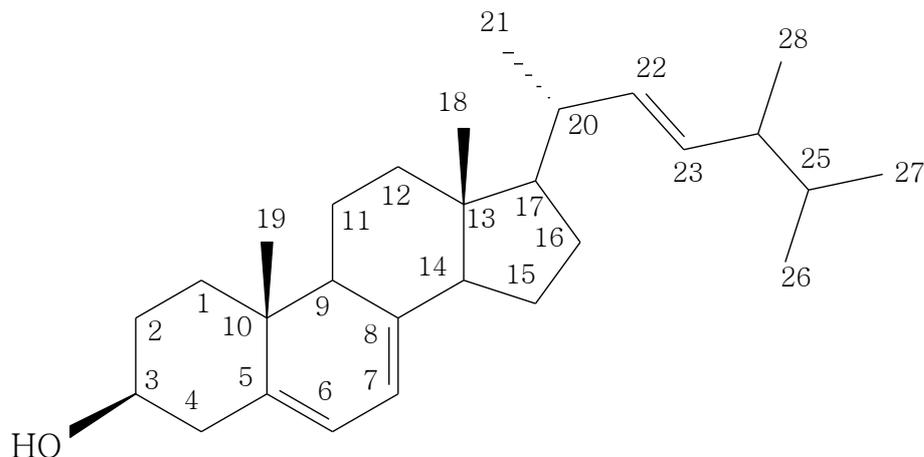
5.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA ISOLADA

O estudo cromatográfico do extrato etanólico obtido a partir da biomassa fúngica levou ao isolamento de duas substâncias. Das substâncias isoladas apenas a S1 será discutida, pois a S2 ainda encontra-se em fase de identificação estrutural. A S1 apresentou cristais em forma de agulha na superfície do extrato bruto, que após lavagem com hexano apresentou coloração amarelada. A substância S2 apresentou coloração rósea com textura de um sólido amorfo.

O espectro de RMN¹H de S1 foi obtido na Universidade Federal do Pará (UFPA) e da S2 na Universidade Federal de São Carlos (UFScar). A S1 foi discutida comparando-se o espectro obtido com um já identificado da literatura para a substância ergosterol (Figura 10, p. 44), um esteróide comumente produzido por fungos.

A análise do espectro de RMN¹H (Figuras 11 e 12, p. 46 - 47) deixa claro tratar-se de uma substância com esqueleto esteroidal, visto que os sinais característicos observados são: um multipletto centrado em δ 3,63 ppm referente ao hidrogênio ligado a carbono oximetínico (H-3), um multipletto em δ 5,20 ppm atribuído aos hidrogênios H-22 e H-23; foi observado também, a presença de multipletto em 5,38 ppm atribuído ao H-7 e um duplo dubleto em δ 5,57 ppm atribuído ao H-6 (*dd*, $J = 5,7; 2,7$ Hz). Na região de δ 0,5 – 1,1 ppm é possível observar a presença de dois singletos e quatro dubletos. Os singletos foram atribuídos às metilas 18 (δ 0,63 ppm) e 19 (δ 0,95 ppm). Os dubletos em δ 0,82 ppm ($J = 6,9$ Hz), δ 0,83 ppm ($J = 6,3$ Hz), δ 0,92 ppm ($J = 6,9$ Hz) e 1,04 ppm ($J = 6,6$ Hz) foram atribuídos às metilas 26, 27, 28 e 21, respectivamente. As atribuições dos deslocamentos químicos para os hidrogênios de S1 foram feitas por comparação com os dados da literatura (OLIVEIRA, 2008), (Tabela 04, p. 44).

Ao analisar o espectro de RMN ¹³C (Figuras 13 e 14, p. 48 - 49) observa-se a presença de 26 sinais. Entre os 26 sinais observados destacam-se seis carbonos olefínicos em δ 116,3 ppm, δ 119,6 ppm, δ 132,0 ppm, δ 135,5 ppm, δ 139,7 ppm e δ 141,4 ppm e ainda a presença de um carbono oximetínico em δ 70, 4 ppm atribuído ao carbono C-3. Os demais dados expressos no espectro de carbono encontram-se registrados na Tabela 05, p. 45.

Figura 10 – Ergosterol (S1)

Fonte: SOUZA, 2013.

Tabela 04 - Dados de RMN¹H de S1(CDCl₃, 300 MHz).

POSIÇÃO	δ (OLIVEIRA, 2008)	δ S1
3	3,63 (<i>m</i> , 1 H)	3, 63 (<i>m</i> , 1 H)
6	5,61 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5,4 e 2,4 Hz, 1H)	5, 57 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 5,7 e 2,7 Hz, 1H)
7	5,37 (<i>m</i>)	5,38 (<i>m</i>)
18	0,62 (<i>s</i> , 3H)	0,63 (<i>s</i> , 3H)
19	0,94 (<i>s</i> , 3H)	0,95 (<i>s</i> , 3H)
21	1,03 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,6 Hz, 3H)	1,04 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,6 Hz, 3H)
22	5,19 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 15 e 5,6 Hz, 1H)	5,20 (<i>m</i>)
23	5,23 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 15 e 5,6 Hz, 1H)	5,20 (<i>m</i>)
26	0,81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,6 Hz, 3H)	0,82 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H)
27	0,83 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H)	0,83 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,3 Hz, 3H)
28	0,91(<i>d</i> , <i>J</i> = 6,7 Hz, 3H)	0,92 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H)

Fonte: Autor.

Tabela 05 - Dados de RMN ^{13}C de S1.

CARBONOS	δ (OLIVEIRA, 2008)	δ (CDCI ₃)
C-1	38,3	38,4
C-2	31,9	32
C-3	70,4	70,5
C-4	40,7	40,8
C-5	139,7	139,8
C-6	119,6	119,6
C-7	116,3	116,3
C-8	141,4	141,4
C-9	46,2	46,3
C-10	37,0	37,0
C-11	21,1	21,1
C-12	39,0	39,1
C-13	42,8	42,8
C-14	54,5	54,6
C-15	23,0	23,0
C-16	28,3	28,3
C-17	55,7	55,7
C-18	12,0	12,0
C-19	16,3	16,3
C-20	40,4	40,4
C-21	21,1	21,1
C-22	135,5	135,6
C-23	131,9	132
C-24	42,8	42,8
C-25	33,1	33,1
C-26	19,9	19,9
C-27	19,6	19,6
C-28	17,6	17,6

Fonte: Autor.

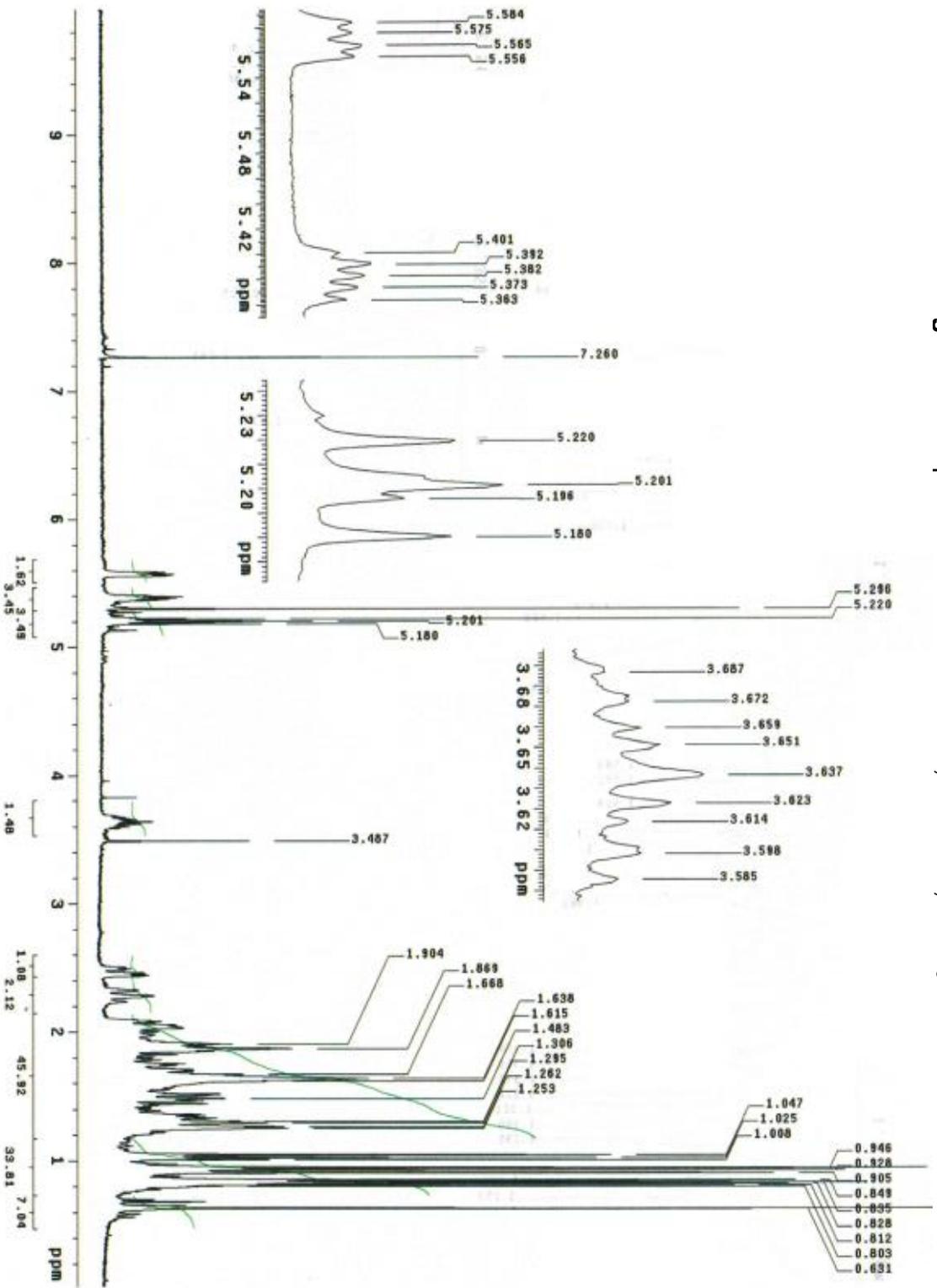
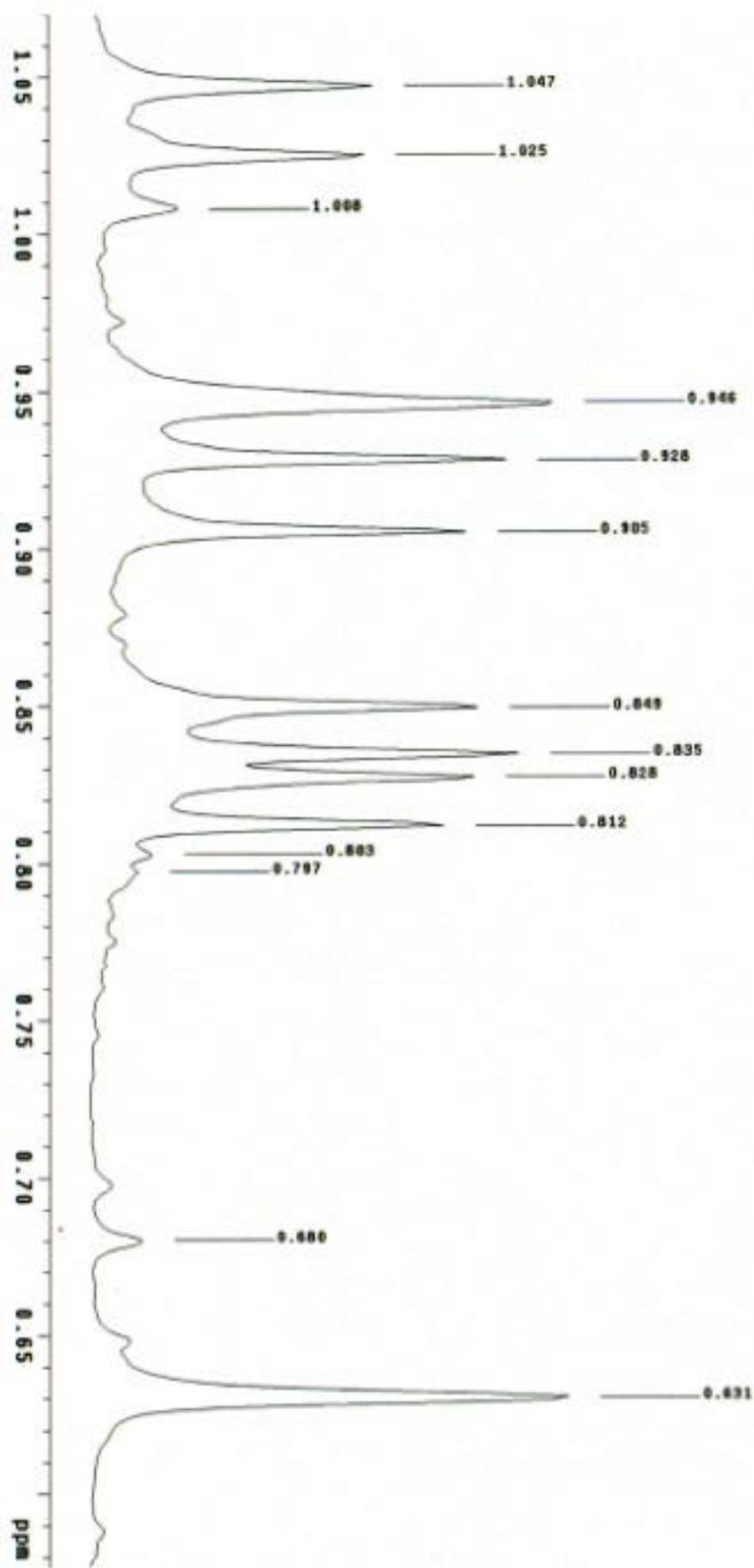


Figura 11 - Espectro de RMN 1H de S1, 300 MHz, CDCl₃.

Figura 12 - Expansão do espectro de RMN 1H de S1, 300 MHz, CDCl₃.



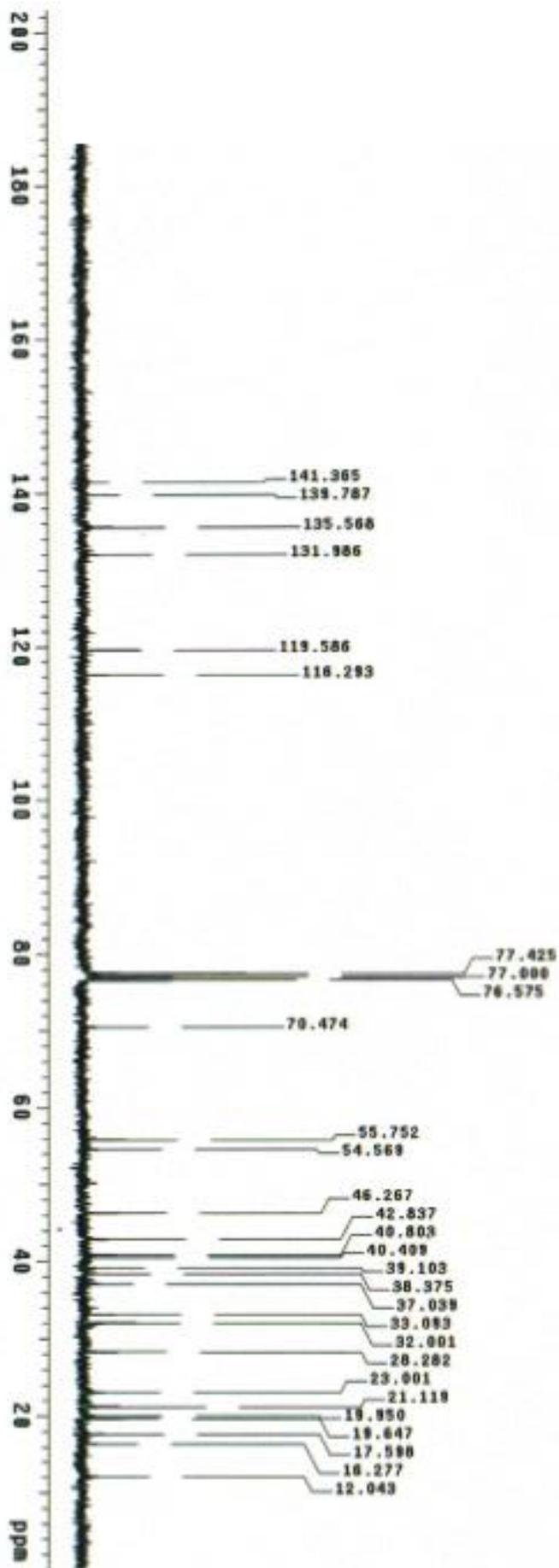
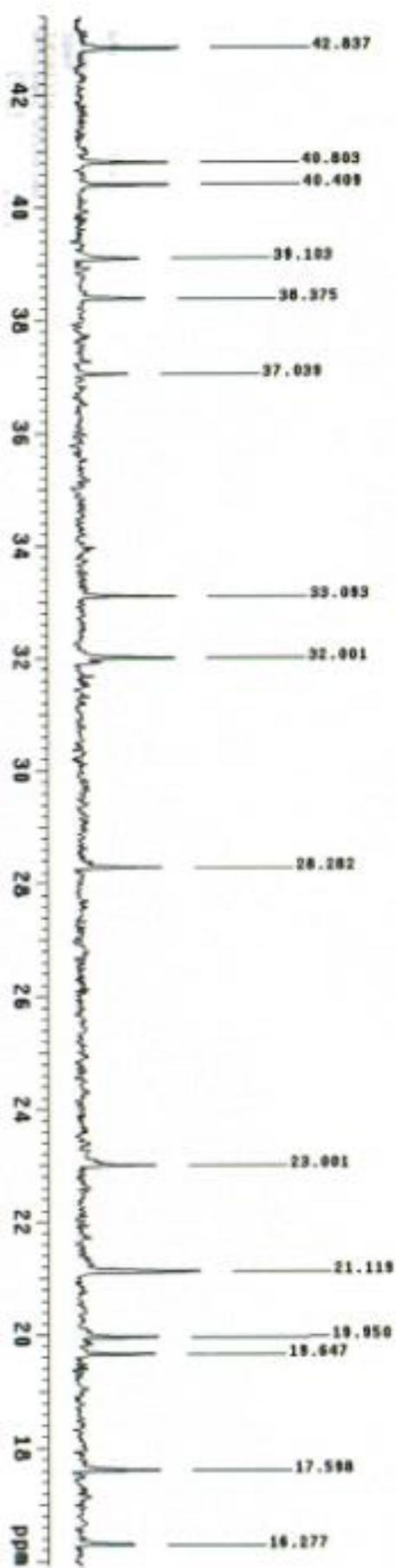


Figura 13 - Espectro de RMN ¹³C de S1.

Figura 14 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C de S1.

6 CONCLUSÃO

A partir das amostras de solo mineralizado foi isolado a linhagem I₁S_YS₁A₁, o cultivo em grande escala levou a obtenção de 83,3107 g. O extrato obtido foi submetido aos testes alelopáticos, citotóxico e de caracterização química. Nos testes alelopáticos realizados visando à inibição da germinação das sementes de das espécies *Mimosa pudica* (malícia) e *Senna obtusifolia* (mata-pasto) foi observado um percentual de inibição igual 78 % frente à espécie malícia. Não foi observado efeito alelopático frente à espécie mata – pasto. Nos testes de citotoxicidade não foram observados resultados satisfatórios frente às células tumorais testadas. Na investigação química a partir dos extratos foram obtidas duas substâncias: S1 e S2, sendo a S1 identificada como o esteróide ergosterol, o que está de acordo com a caracterização química realizada. A substância S2 encontra-se em fase de identificação estrutural.

7 REFERÊNCIAS

ALLISON, S.D.; HANSON, C.A.; TRESEDER, K.K. **Nitrogen fertilization reduces diversity and alters community structure of active fungi in boreal ecosystems.** Soil Biology Biochemistry, Oxford, v. 39, p. 1878–1887, 2007.

ANAYA, A. L. **Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula.** Phytochemistry, v. 66, p. 487-494, 2005.

BARBOSA, W.L.R., et al., **Manual Para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**, Revista Científica da UFPA, 2001.

BUTLER, M.S. **Natural products to drugs: natural products derived compounds in clinical trials.** Natural Products Reports, v. 22, n.2, p. 162-195, 2005.

CALDIZ, D. O.; FERNÁNDEZ, L. **Allelopathy as possible strategy for weed control in agriculture and forestry systems.** In: MACIAS, F. A. Recent advances in allelopathy. Cádiz: Universidad de Cádiz. p. 451- 462, 1999.

CASTELLANI, A. **Viability of mold culture of fungi in destiled water.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 42, 225, 1939.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. **Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais**, 2012.

CRAGG G.M, NEWMAN D.J. **Plants as a source of anti-cancer agents.** Journal of Ethnopharmacology. p.72-79, 2005.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.**; Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa 3, 1032 , 2004.

DEMAIN, A. L. **Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms.** Applied Microbiology and Biotechnology. p.52: 455-463, 1999.

DORAN, J.W.; ZEISS, M.R. **Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality.** Applied Soil Ecology, Amsterdam, v. 1, p. 3–11, 2000.

EINHELLIG, F. A. **Effects of root exudate sorgoleone on photosynthesis.** J. Chem. Ecol., v. 19, p. 369-375, 1993.

FERRARA, M. A., **Fungos Endofíticos. Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas.** In: Revista Fitos. Rio de Janeiro 73-79, 2006.

FERREIRA, M.L. **Síntese e avaliação da atividade herbicida de quinonas.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 151p, 1998.

FERREIRA, N. **Cultura de células humanas e animais,** 2013.

FISHER, A.G. **Latitudinal variations in organic diversity.** *Evolution*, New York, v. 14, p. 64–81, 1961.

GUERRA M. P, NODARI R.O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos** (cap.1). In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, Mentz LA, Petrovick PR, 2007.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L.Y. **Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals.** *Nature Reviews Microbiology*, London, v 9, p. 177–192, 2011.

HAWKSWORTH, D.L. **The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited.** *Mycology Research*, Cambridge, v. 105, p. 422–1432, 2001.

HILL, G.T.; MITKOWSKI, N.A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L.R.; JURKONIE, D.D.; FICKE, A.; MALDONADO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S.T.; NELSON, E.B. **Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities.** *Applied SoilEcology*, Amsterdam, v. 15, p. 25–36, 2000.

HOUGHTON P, FANG R, TECHATANAWAT I, STEVENTON G, HYLANDS PJ, LEE CC. **The sulphorhodamide (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anti cancer activity.** *Methods*, p. 377-387, 2007.

INCA. Estatísticas do Câncer. **Vigilância do Câncer e de Fatores de Risco.** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/vigilancia/>. Acesso em 4 de janeiro de 2012.

INDERJIT; DAKSHINI, K.M.M & FOY, C.L. (Eds.). **Principles and practices in plant ecology.** Boca Raton, CRC Press. p.75-98.

KING-DIAZ, B.; ESQUIVEL, B.; HERNÁNDEZ-TERRONES, M. & LOTINAHENNSEN, B. **Metabólitos secundários de plantas mexicanas como posibles agentes herbicidas.** In: BERNAL-LUGO, I. & LOZA-TAVERA, H. (Ed.) 2001. **Avances en Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.** Ciudad de México. p.111-132, 2001.

KLAMER, M.; ROBERTS, M.S.; LEVINE, L.H.; DRAKE, B.G.; GARLAND, J.L. **Influence of elevated CO₂ on the fungal community in a coastal scrub oak forest soil investigated with terminal-restriction fragment length polymorphism analysis.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 68, p. 4370–4376, 2002.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. ed. 9. São Paulo: Sarvier. 2002.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Fortaleza Editora UFC 2ª edição. 141, 1997

NEAVE, I. A.; DAWSON, J. O. **Juglone reduces growth nitrogenase activity, and root respiration of actinorhizal black alder seedlings**. J. Chem. Ecol., v. 15, n. 6, p. 1823-1826, 1989.

OLIVEIRA, M. N.; **Estudo químico e biológico da biomassa produzida por Pestalotiopsis guepinii Associado como endofítico da espécie Virola michelii**, 2008.

PELCZAR, M.; REID, R. & CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo, Mc Graw-Hill, 1981.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas**. Química Nova, vol. 25. Supl. 1, 45-61, 2002.

PRATES, Hélio teixeira. **Produtos Naturais na Agricultura**. Sete Lagoas: Embrapa. 2008.

PUTNAM, A. R., DUKE, W. D. **Allelopathy in agroecosystems**. Ann. Rev. Phytopathol., v.16, p. 431- 451, 1978.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2.ed. New York: Academic Press, 1984. 422 p.

RIZZARDI, M.A.; FLECK, N.G.; AGOSTINETTO, D. & BALBINOT JR., A.A. **Previsão da perda de rendimento de grãos de soja causada pela infestação de plantas daninhas utilizando variáveis foliares relativas**. Planta Daninha. p. 21:45-54, 2003.

ROSENZWEIG, M. **Species diversity in space and time**. Cambridge, England: Cambridge University Press, 1995.

SEBASTIANES, F.L.S. **Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos em manguezais do estado de São Paulo**. Tese (Doutorado); escola superior de agricultura, 2010.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**, London: Academic Press. 605p, 1997.

SOUZA FILHO, A.P.S. **Alelopatia e as plantas.** p.3, 2006.

SOUZA, N. P. **Estudo químico e biológico de um fungo endofítico associado à espécie de Timbó Derris nicou,** 2013.

STROBEL, G; B. DAISY, U. CASTILLO. J. **Natural products from endophytic microorganisms.** *Journal of Natural Products* p.67: 257-268, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B. **Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, New York, v.67, n. 4, p. 491- 502, 2003.

TAWAHA, A. M.; TURK, M. A. **Allelopathic effects of black mustard (*Brassica nigra*) on germination and growth of wild barley (*Hordeum spontaneum*).** *J. Agron. Crop Sci.*, v. 189, n. 5, p. 298-303, 2003.

THORN, R.G.; REDDY, C.A.; HARRIS, D.; PAUL, E. A. **Isolation of saprophytic basidiomycetes from soil.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 62, p. 4288-4292, 1996.

TRESEDER, K.K. **Nutrient acquisition strategies of fungi and their relation to elevated atmospheric CO₂.** DIGHTON, J.; WHITE, J.F.; OUDEMANS, P. (Ed.). *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem*, Boca Raton, FL, USA: CRC Press. p. 713–731, 2005.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; BARDGETT, R.D.; VAN STRAALLEN, N.M. **The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems.** *Ecology Letters*, Oxford, v. 11, p. 296–310, 2008.

VIEGAS-JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. **The natural products and the modern medicinal chemistry.** *Química nova*, v. 29, n.2, p. 326-337, 2006.

WALDROP, M.P.; ZAK, D.R.; BLACKWOOD, C.B.; CURTIS, C.D.; TILMAN, D. **Resource availability controls fungal diversity across a plant diversity gradient.** *Ecology Letters*, Oxford, v. 9, p. 1127–1135, 2006.

WANG L, LIN L, Ye B. **Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drugemodin with DNA.** *J Pharm Biomed Anal.* p. 625, 2006.

WATLING, R. **Fungal conservation: some impressions – a personal view.** In: DIGHTON, J.; WHITE, J.F.; OUDEMANS, P. (Ed.). *The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem* Boca Raton, FL, USA: CRC Press. p. 881–896, 2005.

ZAITZ, C.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M de. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: MEDSI, 1998.

ANEXO A – TRABALHOS DIVULGADOS EM EVENTOS

BRITO, DAYANE RODRIGUES, et al. **Investigação química e biológica da linhagem I₁S_γS₁A₁ isolada de solo mineralizado**. In: ENCONTRO REGIONAL SBQ – PA, 1., 2014. Belém, 2014.