

# Produção e Controle de Produtos Naturais

Natiéli Piovesan  
Vanessa Bordin Viera  
(Organizadoras)

some

 **Atena**  
Editora

Ano 2018

**NATIÉLI PIOVESAN**  
**VANESSA BORDIN VIERA**  
(Organizadores)

# **Produção e Controle de Produtos Naturais**

Atena Editora  
2018

2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

**Editora Chefe:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira

**Diagramação e Edição de Arte:** Geraldo Alves e Natália Sandrini

**Revisão:** Os autores

#### **Conselho Editorial**

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
P964	Produção e controle de produtos naturais [recurso eletrônico] / Organizadoras Natiéli Piovesan, Vanessa Bordin Viera. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018.  Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-85107-59-8 DOI 10.22533/at.ed.598181510  1. Biodiversidade. 2. Plantas – Cultivo e manejo. I. Piovesan, Natiéli. II. Viera, Vanessa Bordin.  CDD 577.27
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

O conteúdo do livro e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

O Brasil possui uma das floras mais ricas e diversificadas do mundo – quase 19% da flora mundial. Nosso conhecimento sobre a diversidade, o cultivo e os benefícios que as plantas, frutos e sementes podem proporcionar ainda são incompletos. Dessa forma ressaltamos a importância de se continuar a explorar e conhecer o potencial que a flora brasileira possui.

Nesse intuito o e –book Produção e Controle de Produtos Naturais é composto por 13 artigos científicos que abordam assuntos de extrema importância relacionados à flora brasileira. O leitor irá encontrar assuntos que abordam temas como a atividade toxicológica de fungos, a composição química, biológica, atividade antioxidante, alelopática, citotóxica, anticitotóxica, teor de fenólicos totais e teor de flavonoides totais de plantas, além de fatores que podem ter influência sobre esses aspectos.

O e-book Produção e Controle de Produtos Naturais também apresenta artigos com intuito de orientação e incentivo ao uso, cultivo e manejo de plantas medicinais, além de temas relacionados à Gestão Ambiental e Sustentabilidade.

Diante da importância de discutir a biodiversidade, os artigos relacionados neste e-book, visam disseminar o conhecimento acerca da constituição da flora brasileira e promover reflexões sobre os temas. Por fim, desejamos a todos uma excelente leitura!

Natiéli Piovesan e Vanessa Bordin Viera

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
ANIDROCOCHLIOQUINONA A E ATIVIDADE ANTAGONISTA DO FUNGO ENDOFÍTICO <i>BIPOLARIS</i> SP. ASSOCIADO A <i>CYMBOPOGON NARDUS</i>	
<i>Vanessa Mara Chapla</i> <i>Sara Bruna Sousa Dantas</i> <i>Gabriel Leda de Arruda</i> <i>Aloísio Freitas Chagas Junior</i>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>12</b>
A PODA DO SISTEMA RADICULAR MELHORA A QUALIDADE DAS PLANTAS DE CACAU ( <i>THEOBROMA CACAO</i> L.; MALVACEAE)	
<i>Luana Linhares Negreiro</i> <i>Dheyson Prates da Silva</i> <i>Iselino Nogueira Jardim</i>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>15</b>
ATIVIDADE ALELOPÁTICA E ANTIOXIDANTE DAS FOLHAS DE <i>METRODorea nigra</i> A. ST. HILL	
<i>Rodrigo de Souza Miranda</i> <i>Roberto Carlos Campos Martins</i> <i>Naomi Kato Simas</i> <i>Anne Caroline Candido Gomes</i>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>29</b>
AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO DE COPAÍBA ( <i>COPAIFERA</i> SP.) COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE MARABÁ-PARÁ POR GC-MS	
<i>Danielle Rodrigues Monteiro da Costa</i> <i>Simone Yasue Simote Silva</i> <i>Sebastião da Cruz Silva</i> <i>João Marcos Dichtl Oliveira</i> <i>Ianara Viana Vieira</i> <i>Mayra Ellen dos Santos Neres</i>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>42</b>
<i>BAUHINIA</i> SP. SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE SAZONALIDADE INDUZ ATIVIDADE ANTICÂNCER EM SARCOMA-180 <i>IN VITRO</i>	
<i>Judá Ben-Hur de Oliveira</i> <i>Jean Carlos Vencioneck Dutra</i> <i>Suiany Vitorino Gervásio</i> <i>Mirieli Bernardes Xavier</i> <i>Paula Roberta Costalonga Pereira</i> <i>Mainã Mantovanelli da Mota</i> <i>Maria do Carmo Pimentel Batitucci</i>	
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>60</b>
CHEMICAL PROFILE OF CRUDE EXTRACTS OF <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> BIOMASSES CULTIVATED IN DIFFERENT CULTURE MEDIA	
<i>Laura Patrício de Almeida Nunes Cavalcanti</i> <i>Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira</i> <i>Roberto Carlos Campos Martins</i>	
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>69</b>
<i>CORIANDRUM SATIVUM</i> EM ESTÁDIO VEGETATIVO E FLORAÇÃO INDUZ ATIVIDADE ANTICÂNCER <i>IN VITRO</i>	
<i>Vanessa Silva dos Santos</i> <i>Jean Carlos Vencioneck Dutra</i>	

*Suíany Vitorino Gervásio*  
*Paula Roberta Costalonga Pereira*  
*Mainã Mantovanelli da Mota*  
*Patrícia Carara dos Santos*  
*Maria do Carmo Pimentel Batitucci*

**CAPÍTULO 8 ..... 83**

CULTIVO E USO DAS PLANTAS MEDICINAIS TRADICIONAIS NA COMUNIDADE IPAMERINA, GOIÁS

*Marcos Vinícios Faleiro*  
*Wesley Costa Silva*  
*Mateus de Sousa Mendes Alves do Nascimento*  
*Alcione da Silva Arruda*  
*Nivaldo Estrela Marques*

**CAPÍTULO 9 ..... 97**

FUNGOS DE SEDIMENTOS MARINHOS DA ANTÁRTICA: PRODUÇÃO DE EXTRATOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA *XANTHOMONAS AXONOPODIS* PV. *PASSIFLORAE*

*Daiane Cristina Sass*  
*Gabrielle Vieira*  
*Jelena Puríc*  
*Vítor Rodrigues Marin*

**CAPÍTULO 10 ..... 106**

IRIDOIDES E CUMARINAS DO CAULE DE *TOCOYENA HISPIDULA*

*Elcilene Alves de Sousa*  
*Mariana Helena Chaves*  
*Luanda Ferreira Floro da Silva*  
*Gerardo Magela Vieira Júnior*  
*Buana Carvalho de Almeida*  
*Ruth Raquel Soares de Farias*

**CAPÍTULO 11 ..... 120**

O GÊNERO *VIROLA* NO BRASIL: NEOLIGNANAS E ATIVIDADE BIOLÓGICA

*Luana Carvalho Batista*  
*Maria Raquel Garcia Vega*

**CAPÍTULO 12 ..... 137**

PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO EM N-HEXANO DE FOLHAS DE *PIPER SOLMSIANUM* C.DC. E AVALIAÇÃO CONTRA LARVAS DE *AEDES AEGYPTI*

*Arthur Ladeira Macedo*  
*Rodrigo Coutinho Duprat*  
*Larissa Ramos Guimarães da Silva*  
*Davyson de Lima Moreira*  
*Maria Auxiliadora Coelho Kaplan*  
*Thatyana Rocha Alves Vasconcelos*  
*Laine Celestino Pinto*  
*Raquel Carvalho Montenegro*  
*Norman Arthur Ratcliffe*  
*Cícero Brasileiro Mello*  
*Alessandra Leda Valverde*

**CAPÍTULO 13 ..... 153**

UMA INTER-RELAÇÃO POSSÍVEL: PLANTAS MEDICINAIS, GESTÃO AMBIENTAL, DESENVOLVIMENTO E SUSTENTABILIDADE

*Viviane Mallmann*  
*Lucas Wagner Ribeiro Aragão*  
*Roberta Fernanda Ribeiro Aragão*

*Edineia Messias Martins Bartieres*  
*Valdeci José Pestana*  
*Shaline Séfara Lopes Fernandes*  
*Rogério César de Lara da Silva*

**SOBRE AS ORGANIZADORAS..... 169**

## ANIDROCOCHLIOQUINONA A E ATIVIDADE ANTAGONISTA DO FUNGO ENDOFÍTICO *BIPOLARIS* SP. ASSOCIADO A *CYMBOPOGON NARDUS*

**Vanessa Mara Chapla**

Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi-Tocantins

**Sara Bruna Sousa Dantas**

Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi-Tocantins

**Gabriel Leda de Arruda**

Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi-Tocantins

**Aloísio Freitas Chagas Junior**

Universidade Federal do Tocantins (UFT), Gurupi-Tocantins

**RESUMO:** O gênero *Bipolaris* tem fornecido um grande número de micotoxinas, como as pertencentes a classe das cochlioquinonas. O fungo endofítico *Bipolaris* sp. isolado da planta medicinal *Cymbopogon nardus* foi submetido a ensaio de antagonismo *in vitro* contra três fungos fitopatogênicos, o fungo *Bipolaris* sp. apresentou potencial antagonista contra o fungo *Fusarium oxysporum*. Anidrocochlioquinona A foi isolada do extrato bruto AcOEt obtido do cultivo do endófito *Bipolaris* sp. em PDB (potato dextrose broth). A estrutura do composto foi elucidada baseada em técnicas de RMN 1D e 2D. Anidrocochlioquinona A é descrita como antitumoral por apresentar atividade citotóxica contra células HeLa.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Bipolaris* sp.;

Anidrocochlioquinona A; fungos endofíticos; antagonismo.

**ABSTRACT:** *Bipolaris* genus has afforded many types of mycotoxin as cochlioquinone class. The endophytic fungus *Bipolaris* sp. isolated from medicinal plant *Cymbopogon nardus* was submitted to *in vitro* antagonism assay against three phytopatogenic fungi, the fungus *Bipolaris* sp. showed antagonism activity against *Fusarium oxysporum*. Anhydrocochlioquinone A was isolated from the crude EtAcO extract obtained from *Bipolaris* sp. cultured in PDB (potato dextrose broth) medium. The structure was established conclusively by 1D and 2D NMR spectra analysis. Anhydrocochlioquinone A was described as antitumor by showed cytotoxicity activity against HeLa cells.

**KEYWORDS:** *Bipolaris* sp.; Anhydrocochlioquinone A; endophytic fungi; antagonism.

### 1 | INTRODUÇÃO

O gênero *Bipolaris* contém mais de 100 espécies fúngicas associadas a diversas plantas com uma distribuição mundial. Segundo Manamgoda et al. (2014) este gênero é composto por fungos filamentosos Ascomicetos, da classe Dothideomycetes, ordem Pleosporales e família



Pleosporaceae. As espécies do gênero *Bipolaris* estão muitas vezes associadas ao desenvolvimento de doenças em espécies vegetais, principalmente em culturas de alto valor na família Poaceae, e ainda à agentes etiológicos de doenças em seres humanos (BERBEE; PIRSEYEDI; HUBBARD, 1999; CAMPOS, 2009). Entretanto, apesar de estar associado ao desenvolvimento de patologias, esse gênero fúngico têm alcançado crescente interesse biotecnológico por sua relação com a produção de diferentes metabólitos biologicamente ativos, como as cochlioquinonas (JUNG et al., 2003), paecilin B (GUO et al., 2007), curvulina (VARMA et al., 2006), emodina (GUO et al., 2011), 6-epi-3anhydrophiobolina B (SHEN et al., 1999), crisofanol (GUO et al., 2011) e bipolarinona (ARUNPANICHLERT et al., 2012).

As cochlioquinonas são importantes fitotoxinas fúngicas associadas a doenças graves em cereais, são produzidas principalmente por *Bipolaris* spp. e outros gêneros relacionados (PHUWAPRAISIRISAN et al., 2007). Segundo Koyama et al. (2005), apresentam esqueleto terpenóidico, contendo uma benzoquinona em sua estrutura. Grande parte de seus análogos são caracterizadas por um par de derivados do 1-álquil-3,5-di-hidroxifenila com uma unidade farnesil (WANG et al., 2016).

As cochlioquinonas apresentam muitas propriedades biológicas, tais como inibição da atividade sobre a enzima Acil-CoA e da atividade contra colesterol aciltransferase (FUJIOKA et al., 1996), inibição da atividade contra diacilglicerol kinase (MACHIDA; HIGASHI; OGAWARA et al., 1995), atividade fitotóxica (LIM et al., 1996), nematicida (SCHAEFFER et al., 1990), citotóxica (WANG et al., 2016) e antiangiogênica (JUNG et al., 2003). Campos et al. (2017) também demonstrou a ação larvicida dessas substâncias contra Leishmaniose, além de sua atividade antibacteriana e antitumoral. Estes estudos corroboram para a grande aplicabilidade biotecnológica dessas substâncias, considerando os usos biológicos e farmacêuticos.

Os fungos do gênero *Bipolares*, compreendem uma série de espécies que são classificadas como endofíticas em diversas plantas (WANG et al., 2016). O termo endófito ou endofítico está associado a microrganismos que vivem no interior de tecidos e órgãos vegetais sem aparentemente causar danos aos seus hospedeiros (RUDGERS E CLAY, 2007).

As interações entre o endófito e a planta hospedeira, ainda não estão completamente compreendidas, mas acredita-se que possam ser simbióticas, neutras ou antagônicas, podendo variar de um hospedeiro para o outro (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). Segundo Lacava, Sebastianes e Azevedo (2004) nas interações simbióticas o crescimento do endófito no interior da planta envolve contínua interação metabólica entre o endófito e o hospedeiro, onde ambos se beneficiam desta associação. Em decorrência dessas interações, os endófitos são capazes de produzir um grande número de substâncias de interesse biotecnológico, com propriedades biológicas ou farmacêuticas, o que os tornaram alvos de muitos estudos nos últimos anos, considerando-os como fontes prolíficas de produtos naturais novos e bioativos (BORGES et al., 2009; PAMPHILE et al., 2018).

Com o objetivo de investigar a biodiversidade endofítica do Cerrado presente no estado do Tocantins, a planta medicinal *Cymbopogon nardus* foi submetida a isolamento de fungos endofíticos, sendo possível o isolamento e identificação de doze endófitos. O extrato bruto AcOEt obtido do fungo endofítico *Bipolaris* sp. apresentou alta atividade toxicológica, este resultado nos levou a investigação química do extrato na busca por metabólitos fúngicos bioativos, onde foi possível o isolamento da Anidrocochlioquinona A.

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Isolamento e Identificação Morfológica dos Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos foram isolados de folhas saudáveis de *Cymbopogon nardus* L. Rendle (capim citronela) disponível no herbário da UFT Campus de Gurupi, Tocantins. O material vegetal coletado foi submetido a assepsia, com imersão em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito de sódio 3% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos, por fim lavado em água destilada estéril, a fim de eliminar resíduos da solução de hipoclorito de sódio e utilizada como parâmetro de controle da assepsia (LOPES *et al.*, 2017).

Após assepsia, as folhas foram trituradas em 5 mL de solução tampão fosfato de sódio monobásico (pH 7,4) com auxílio de gral e pistilo. O material triturado foi plaqueado em meio sólido batata-dextrose-ágar (PDA), tratado com ampicilina (500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e incubado em incubadora BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 8 dias, seguido de sucessivos repiques até o isolamento das colônias fúngicas.

Para a identificação dos fungos a nível de gênero, foram analisadas culturas puras dos fungos em placa de Petri em meio PDA, foram observadas características morfológicas macroscópicas e microscópicas das colônias, como forma reprodutiva e características celulares das hifas, tomado como referências literaturas da área (HANLIN E MENEZES, 1996; BARNETT E HUNTER, 1998).

### 2.2 Teste de Antagonismo

A avaliação do antagonismo *in vitro* foi realizado em placas de Petri com confronto direto entre o fungo endofítico isolado *Bipolaris* sp. (UFT/MB.J11) contra três fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata* e *Bipolares oryzae* obtidos do banco de cepas microbianas do Laboratório de Fitopatologia da UFT Campus de Gurupi, Tocantins.

Em placas com meio PDA, foram inoculados em pontos equidistantes da placa 2 discos de micélio-ágar de 6 mm de diâmetro cada, sendo um referente ao fungo endofítico e o outro ao fitopatógeno confrontado, além de testemunhas (controle), onde somente o fitopatógeno foi inoculado. Após inoculação, as placas foram incubadas

em incubadora BOD a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 14 dias e avaliadas após as colônias controle ocupassem a placa por completo (LOPES *et al.*, 2017).

### 2.3 Cultivo e Obtenção do Extrato Bruto

O inóculo do fungo *Bipolaris* sp. foi incubado em placa de Petri com meio PDA a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 7 dias. Em seguida, o fungo endofítico foi cultivado em Meio líquido PDB (potato dextrose broth) em frascos de Erlenmeyer (500 mL) com 300 mL de meio de cultura. Após inoculação, o cultivo foi mantido em incubadora BOD  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 28 dias, sobre suave agitação a cada 72 horas.

Após o período de cultivo, o caldo foi submetido a filtração a vácuo, separando-se o micélio do caldo fermentado. Em seguida o filtrado foi submetido a partição líquido/líquido com acetado de etila (AcOEt por 3 x 250 mL), a fase AcOEt foi concentrada em evaporador rotativo fornecendo o extrato bruto AcOEt.

### 2.4 Isolamento do Composto

O extrato bruto AcOEt (160,7 mg) foi submetido a cromatografia em coluna. O procedimento foi realizado em coluna de vidro (30 x 2,2 cm), utilizando sílica gel e fase móvel com gradiente de 100:0 (hexano:AcOEt) com o aumento da polaridade até a proporção 0:100 (hexano:AcOEt), e por fim uma solução AcOEt:MeOH (1:1 v/v).

As 52 frações obtidas, de aproximadamente 10 mL cada, foram analisadas em cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) em placas de sílica gel 60 F254 (Filter-Bio®), as frações que apresentaram similaridade foram reunidas. A fração 17 (4,8 mg) forneceu a substância **1**, esta foi submetida a análise de ressonância magnética nuclear (RMN, 1D e 2D) em espectrômetro Bruker Avance III HD 600.

### 2.5 Atividade Toxicológica

A atividade toxicológica do extrato bruto AcOEt foi realizada em organismo teste *Artemia salina*, sendo suas condições de eclosão e criação: solução salina de sal marinho a uma concentração de  $38 \text{ g.L}^{-1}$ ,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , oxigenação contínua pelo período de 24 horas. A solução salina preparada foi utilizada para eclosão dos ovos, criação, condição controle, preparo das soluções e diluições dos extratos brutos avaliados (MEYER *et al.*, 1982).

Foram avaliadas 5 diferentes concentrações do extrato bruto, sendo elas 200, 100, 20, 10 e  $5 \text{ mg.L}^{-1}$ , solubilizadas em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e solução salina (1:1 v/v) e a concentração controle, somente a solução salina. Os ensaios foram conduzidos em triplicada, com 10 organismos por teste e avaliado quanto a letalidade dos microcrustáceos frente as concentrações preparadas no período de 24 horas de exposição.

Foi determinado a dose mínima necessária para a morte de 50% dos organismos

testados ( $DL_{50}$ ) pelo log da concentração dos extratos em função do percentual de organismos mortos, ajustando-se uma equação linear simples em comparação com a concentração controle.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Atividade Antagonista

Foram isolados doze fungos endofíticos originados de partes saudáveis da folha de *Cymbopogon nardus* (capim citronela) e classificados até o nível de gênero após observação dos aspectos macro e micro morfológicos. O fungo codificado como UFT/MB.J11 foi identificado morfológicamente como pertencente ao gênero *Bipolaris* sp. (LOPES et al., 2017).

Os testes realizados através do método *in vitro* revelaram o potencial antagonista do fungo endofítico *Bipolaris* sp., por pareamento direto, contra o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, constatado através da sobreposição das colônias do endófito ou pela formação de um halo de inibição, que reduziram o crescimento micelial do patógeno. O fungo endofítico inibiu 43,3% o crescimento do fitopatógeno após 14 dias de incubação. Para os demais fungos fitopatógenos *Curvularia lunata* e *Bipolaris oryzae* não houve inibição do crescimento significativo pelo endófito (tabela 1).

	Confronto direto			
	7 dias		14 dias	
	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PI (%) <sup>2</sup>	Diâmetro da colônia (mm) <sup>1</sup>	PI (%) <sup>2</sup>
Controle <i>Bipolaris oryzae</i>	28,0 a	-	70,0 a	-
<i>Bipolaris</i> sp. (UFT/MB.J11)	25,0 b	10,7	70,0 a	0,0
Controle <i>Curvularia lunata</i>	26,3 a	-	67,3 a	-
<i>Bipolaris</i> sp. (UFT/MB.J11)	26,0 a	1,3	70,0 a	0,0
Controle <i>Fusarium oxysporum</i>	44,0 a	-	50,0 a	-
<i>Bipolaris</i> sp. (UFT/MB.J11)	24,7 b	43,9	28,3 b	43,3

Tabela 1. Média do confronto direto do fungo endofítico *Bipolaris* sp. com os fitopatógenos

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. <sup>2</sup>PI = Porcentagem de inibição do crescimento micelial.

O potencial antagonista do endófito *Bipolaris* sp. encontrado pode estar relacionado à maior eficiência na competição por espaço e nutrientes ou pela liberação de metabólitos em comparação com o fitopatógeno. Alguns metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Bipolaris* demonstraram nas avaliações *in vitro* possuírem atividades antimicrobianas, como substâncias da classe das cochlioquinonas (CAMPOS et al., 2017), crisofanol e emodina (ARUNPANICHLERT et al., 2012), isto sugere que

em muitos casos o endófito é capaz de produzir compostos contra microrganismos fitopatogênicos ajudando o seu hospedeiro a se proteger (GUNATILAKA, 2006; LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010).

Os demais endófitos isolados de *C. nardus* foram também submetidos ao ensaio antagonista e várias linhagens demonstraram atividade antagonista como citado por Lopes et al. (2017). A atividade antagonista pode servir de base em futuros ensaios *in vivo* para a utilização destes endófitos no controle biológico de pragas em lavouras.

### 3.2 Identificação de Anidrocochlioquinona A

O fungo endofítico *Bipolaris* sp. foi cultivado em meio PDB durante 28 dias, após este período foi submetido a partição líquido/líquido com acetato de etila para obtenção do extrato bruto AcOEt. O extrato bruto AcOEt foi submetido a cromatografia em coluna e resultou no isolamento de um composto identificado por ressonância magnética nuclear como anidrocochlioquinona A (1) (Figura 1).

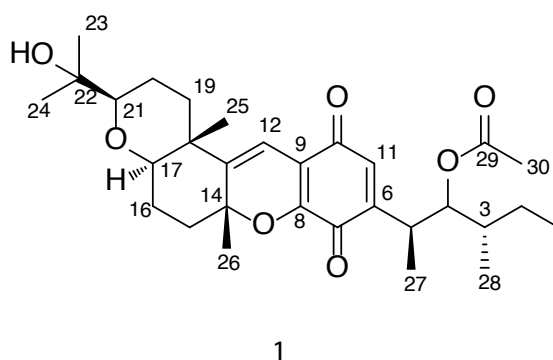


Figura 1: Estrutura da anidrocochlioquinona A

Anidrocochlioquinona A foi isolada como um sólido amorfo de coloração avermelhada. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Tabela 2) apresentou sinais de dois hidrogênios olefínicos ( $\delta_{\text{H}}$  6,53, s, H-11 e 6,31, s, H-12), três hidrogênios oximetínicos ( $\delta_{\text{H}}$  5,01, t, J = 6, H-4; 3,18, m, H-17 e 3,16, m, H-21) e oito grupos metílicos ( $\delta_{\text{H}}$  0,86, H-1; 1,19, s, H-23; 1,18, s, H-24; 1,11, s, H-25; 1,54, s, H-26; 1,13, d, J = 7,2, H-27; 0,86, m, H-28 e 1,96, s, H-30). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Tabela 2) apresentou dois sinais em  $\delta_{\text{C}}$  185,1 e 181,3 atribuídos a carbonos carbonílicos de quinona. As correlações observadas no espectro de HMBC (Figura 2) do H-11 com C-7 e C-9 juntamente com a do H-12 com C-8 e C-10 confirmaram o esqueleto quinona. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou ainda cinco carbonos oxigenados ( $\delta_{\text{C}}$  72,0; 78,7, 81,2; 81,6; 84,7). Estas informações juntamente com as análises dos espectros de RMN 2D sugeriram se tratar de um composto derivado do esqueleto cochlioquinona.

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou descolamento químico característico de uma carbonila de éster em  $\delta_{\text{C}}$  170,0 e de uma metila em  $\delta_{\text{C}}$  20,9 que foi atribuída a um resíduo acetato. O resíduo acetato foi conectado ao C-4 devido as correlações em HMBC do H-4 com o C-29, estabelecendo dessa forma a cadeia lateral C-1/C-5.

As correlações observadas em HMBC do H-5 com C-4, C-6, C-7 e C-11 e do H-11 com C-5 estabeleceram a conectividade da cadeia lateral alifática C-1/C-5 ao C-6 da quinona. Com os deslocamentos químicos em  $\delta_c$  110,7 e 149,6 referentes aos carbonos olefínicos em C-12 e C-13 foi possível constatar que se trata da anidrocochlioquinona A. A configuração absoluta do composto **1** foi atribuída comparando os deslocamentos químicos e constantes de acoplamento com os valores encontrados literatura (PHUWAPRAISIRISAN et al., 2007).

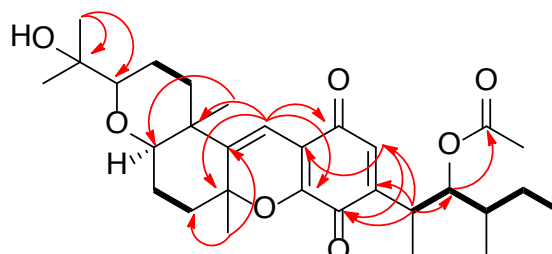


Figura 2: Correlações observadas em HMBC e COSY para a anidrocochlioquinona A

O composto **1** foi a primeira cochlioquinona que possui um resíduo de desidropiranobenzoquinona isolada. A literatura fornece apenas alguns compostos contendo o esqueleto desidropiranobenzoquinonas, que incluem metacromina J e galopiperone (PHUWAPRAISIRISAN et al., 2007). Do ponto de vista biossintético, as cochlioquinonas são formadas pela introdução de uma unidade farnesil em um precursor aromático cujo grupos metil (C-27 e C-28) derivam da metionina. A desidratação de 12-OH em cochlioquinona A resulta na formação da anidrocochlioquinona A (PHUWAPRAISIRISAN et al., 2007).

Posição	Anidrocochlioquinona A ( <b>1</b> )		
	$\delta_c$	$\delta_H$	HMBC
1	11,6	0,86 (m)	C-2, C-3
2	26,5	1,18 (s)	-
3	36,4	1,57 (m)	-
4	78,7	5,01 (t, 6)	C-6, C-29
5	34,2	3,26 (quint, 7,2)	C-4, C-7, C-11, C-27
6	148,7	-	-
7	181,3	-	-
8	149,2	-	-
9	117,2	-	-
10	185,1	-	-
11	132,5	6,53 (s)	C-7, C-9
12	110,7	6,31 (s)	C-8, C-10, C-14, C-18
13	147,6	-	-
14	81,6	-	-

15	37,9	2,30 (dl, 13,8) 2,03 (m)	C-13, C-14
16	24,6	1,70 (dt, 12,6 e 3,0) 1,80 (dd, 13,2 e 3,6)	C-14
17	81,2	3,18 (m)	C-19
18	38,7	-	-
19	34,9	2,10 (m) 1,57 (m)	C-20
20	21,8	1,70 (dt, 12,6 e 3,0) 1,57 (m)	-
21	84,7	3,16 (m)	C-20, C-22
22	72,0	-	-
23	26,2	1,19 (s)	C-21, C-22
24	23,9	1,18 (s)	C-23
25	20,3	1,11 (s)	C-13, C-17, C-19
26	27,1	1,54 (s)	C-13, C-14, C-15
27	17,6	1,13 (d, 7,2)	C-4, C-6
28	13,4	0,86 (m)	C-2, C-3, C-4
29	170,0	-	-
30	20,9	1,96 (s)	C-29

Tabela 2: Dados de RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz para  $^1\text{H}$ , 150 MHz para  $^{13}\text{C}$ ) obtidos para 1

Anidrocochlioquinona A foi descrita por PHUWAPRAISRISAN et al. (2007) como sendo um composto antitumoral por apresentar atividade citotóxica contra células de carcinoma cervical humana (HeLa) ( $\text{CI}_{50}$  de  $5,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Este composto também apresentou alta atividade citotóxica contra células cancerígenas humanas SK-OA-3, com inibição de 85% a uma concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e células A549, com inibição de 41% a uma concentração de  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (ZHOU et al., 2015). Além de apresentar forte atividade na indução de apoptose em células HCT 116 na faixa de 10 a  $30 \mu\text{M}$ , em concentração maiores como  $50 \mu\text{M}$  a atividade foi ainda maior, foi também detectado a ativação da caspase em células cancerígenas HCT 116 (QI et al., 2014).

Nascimento et al. (2015) descreve que a anidrocochlioquinona A apresenta atividade leishmanicida ( $\text{CI}_{50}$  de  $50,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Quando o autor compara a atividade deste composto com a atividade obtida para os compostos cochlioquinona A e isocochlioquinona A ( $\text{CI}_{50}$  de  $10,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), sugere que a ausência de um átomo de oxigênio (em C-12) em anidrocochlioquinona A possivelmente diminui a atividade leishmanicida, devido ao menor valor de  $\text{CI}_{50}$  encontrado.

### 3.3 Atividade toxicológica do extrato bruto AcOEt

O teste realizado permite a avaliação da toxicidade geral, portanto, é considerado como preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica. Neste estudo determinou-se a toxicidade do extrato bruto AcOEt utilizando o microcrustáceo

*Artemia salina*. A utilização de *A. salina* ocorre pois é uma espécie de fácil manipulação em laboratório e baixo custo econômico. Estudos comprovam a ação tóxica de várias substâncias naturais ao microcrustáceo *A. salina* (LOPES, SILVA, ECHEVARRIA 2016).

Com valores de porcentagem de larvas de *A. salina* mortas, em relação ao aumento da concentração do extrato, foi possível ajustar uma equação linear. A partir da equação foi possível calcular o valor de  $DL_{50}$  para o extrato. O resultado obtido apresentou atividade tóxica significativa, sendo o valor de  $DL_{50}$  de  $3,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A alta atividade toxicológica encontrada para o extrato bruto AcOEt frente ao microcrustáceo *A. salina* pode estar relacionada a presença da anidrocochlioquinona A, uma vez que já foram descritas diversas atividades citotóxicas para esse composto.

#### 4 | CONCLUSÃO

O fungo endofítico *Bipolaris* sp. apresentou atividade antagonista contra o fungo *F. oxysporum*, o que pode estar relacionado à maior eficiência na competição de nutrientes ou à liberação de produtos antimicrobianos.

Foi possível identificar a anidrocochlioquinona A produzido pelo endófito, o qual é descrita como um composto antitumoral, por apresentar diversas atividades contra diferentes linhagens cancerígenas, além de apresentar atividade leishmanicida. A alta atividade toxicológica encontrada para o extrato bruto AcOEt pode estar relacionada a presença da anidrocochlioquinona A, uma vez que já foram descritas atividades citotóxicas para esse composto.

#### 5 | AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta pesquisa contou com benefícios do Programa Novos Pesquisadores da UFT (Propesq/UFT). A Anathian G. S. D. Santos, André R. Pinheiro e Jeane C. Lopes pela contribuição no desenvolvimento do trabalho e Juliana C. Holzbach pelos espectros de RMN.

#### REFERENCIAS

ARUNPANICHLERT, J., et al. A dimeric chromanone and a phthalide: Metabolites from the seagrass-derived fungus *Bipolaris* sp. PSU-ES64. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 3, p. 604-608, 2012.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. 1998. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4. ed. St. Paul, MN. Am. Phytopatol. Soc. Press, 218p.

BERBEE M. L.; PIRSEYEDI M.; HUBBARD S. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**. V.91, p.964–977, 1999.



- BORGES, W. D., et al. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p.1137-1163, 2009.
- CAMPOS, F. F. et al. In vitro leishmanicidal, antibacterial and antitumour potential of anhydrocochlioquinone A obtained from the fungus *Cochliobolus* sp. **Journal of Biosciences**, v. 42, n. 4, p. 657–664, 2017.
- 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**, p. 421-437, 2013.
- FUJIOKA, T., et al. Epi-cochlioquinone A, a novel acyl-CoA:cholesterol acyltransferase inhibitor produced by *Stachybotrys bisbyi*. **Journal of Antibiotics** v.49, p. 409-413, 1996.
- GUO, S., et al. Preparative isolation of three anthraquinones from *Rumex japonicus* by high-speed counter-current chromatography. **Molecules**, v. 16, n. 2, p. 1201-1210, 2011.
- GUO, Z., et al. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR signal assignments of Paecilin A and B, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp.(tree 1–7). **Magnetic resonance in chemistry**, v. 45, n. 9, p. 777-780, 2007.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 509-526, 2006.
- HANLIN, R.T.; MENEZES, M. 1996. **Gêneros ilustrados de ascomicetos**. UFRPE, Recife 274p.
- JUNG, H. J. et al. Cochlioquinone A1, a new anti-angiogenic agent from *Bipolaris zeicola*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, n. 22, p. 4743-4747, 2003.
- KOYAMA, N., et al. Stemphones, novel potentiators of imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, produced by *Aspergillus* sp FKI-2136. **Journal of Antibiotics**, v.58, p. 695-703, 2005.
- LACAVAL, P.T.; SEBASTIANES, F. L.S.; AZEVEDO, J.L. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. 535-569. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010, p. 533-569.
- LACAVAL, P. T.; SEBASTIANES, F. L. S.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. In: **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, Cap. 8, 2004.
- LIM, C. H. et al. Cochlioquinol: a new cochlioquinone derivative produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.60, p.724-725, 1996.
- LOPES, J. C. et al. Fungos endofíticos isolados do capim citronela e seleção de antagonistas a fitopatogênicos. **Biota Amazônia**, v. 7, n. 3, p. 84-88, 2017.
- LOPES, G.; SILVA, T. M. S.; ECHEVARRIA, A. Atividade Tóxica Frente à *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de Extratos Brutos e Frações Glicoalcaloidais de *Solanum* spp. **Revista Virtual Química**, v. 8, n. 1, p. 141-156, 2016.
- MACHIDA, T.; HIGASHI, K.; OGAWARA, H. Cochlioquinone A, an inhibitor of diacylglycerol kinase. **The Journal of antibiotics**, v. 48, n. 10, p. 1076-1080, 1995.
- MANAMGODA, D. S., et al. The genus bipolaris. **Studies in Mycology**, v. 79, p. 221-288, 2014.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

NASCIMENTO, A. M. do et al. Antileishmanial activity of compounds produced by endophytic fungi derived from medicinal plant *Vernonia polyanthes* and their potential as source of bioactive substances. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 1793–1800, 2015.

PAMPFILE, J. A., et al. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários Extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum* sp. **REVISTA UNINGÁ**, v. 53, 2018.

PHUWAPRAISIRISAN, P. et al. Anhydrocochlioquinone A, a new antitumor compound from *Bipolaris oryzae*. **Tetrahedron letters**, v. 48, n. 30, p. 5193-5195, 2007.

QI, Q. et al. Cochlioquinone Derivatives with Apoptosis-Inducing Effects on HCT116 Colon Cancer Cells from the Phytopathogenic Fungus *Bipolaris luttrellii* L439. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, p. 1892-1899, 2014.

RUDGERS, J. A.; CLAY, K. Endophytic symbiosis with tall fescue: how strong are the impacts on communities and ecosystems?. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p.107-124. 2007.

SCHAEFFER, J. M., et al. Cochlioquinone-A, a nematocidal agent which competes for specific [h-3] ivermectin binding-sites. **Journal of Antibiotics** v.43, p. 1179-1182, 1990.

SHEN, X. Y., et al. Characterization of 6-epi-3- anhydrophiobolin B from *Cochliobolus heterostrophus*. **Journal of Natural Products** v.62, p.895-897, 1990.

VARMA, G. B., et al. Production of phenylacetic acid derivatives and 4-epiradicinol in culture by *Curvularia lunata*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 17, p. 1925-1930, 2006.

WANG, M. et al. Cytotoxic cochlioquinone derivatives from the endophytic fungus *Bipolaris sorokiniana* derived from *Pogostemon cablin*. **Fitoterapia**, v. 110, p. 77-82, 2016.

ZHOU, L. et al. Chemical constituents of the fungus *Veronaea* sp. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 2, p. 270-272, 2015.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-85107-59-8

