

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas
CiPharma

**Estudo químico de extratos e frações de *Maytenus imbricata*
Mart. ex. Resseik e de seus fungos endofíticos**

IZABEL CRISTINA TRINDADE

OURO PRETO - MG

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA

Estudo químico de extratos e frações de *Maytenus imbricata*

Mart. ex. Resseik e de seus fungos endofíticos

Izabel Cristina Trindade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, linha de pesquisa: Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas

Orientador: Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Silvia Ribeiro de Souza (UNB)

OURO PRETO

2013

“Penso no que faço, com fé. Faço o que devo fazer, com amor. Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende. Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é decidir.” (Cora Coralina)



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto



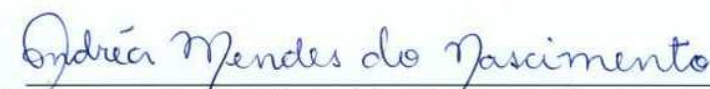
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia




Sessão de defesa da 78ª dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas a IZABEL CRISTINA TRINDADE com a defesa da dissertação intitulada: "Estudo químico de extratos e frações de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek e de seus fungos endofíticos", avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 12 de setembro de 2013.


Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos
UFMG


Prof. Dr. Andréa Mendes do Nascimento
UFOP


Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho
UFOP

T833eTrindade, Izabel Cristina.

Estudo químico de extratos e frações de *Maytenusimbricata* Mart. ex.Reissek e de seus fungos endofíticos [manuscrito]/Izabel Cristina Trindade- 2013.
90f.:il. color.; graf.; tab.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho.

Coorientadora: ProfªDrªSilvia Ribeiro de Souza.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

1. Plantas medicinais - Teses. 2. Celastraceae - *Maytenusimbricata* - Teses. 3. Fungos endofíticos - Teses. 4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) - Teses. I. Vieira Filho, Sidney Augusto. II. Souza, Silvia Ribeiro de. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 615.3:582.766.5

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

AGRADECIMENTOS

À Deus, presença constante em minha vida e meu porto seguro.

À minha querida e amada mãe, por ter me ensinado a ser corajosa.

Ao meu pai Rubem pela constante presença espiritual em minha vida.

Ao meu pai de coração Geraldo e minha irmã Giovana por tornar meus dias mais solares.

Às minhas tias amadas, Lourdes e Odenir, que mesmo a distância mantém a torcida por meu sucesso.

Ao meu orientador e grande amigo professor Sidney Augusto Vieira Filho, que me proporcionou crescimento profissional e pessoal. Seus ensinamentos jamais serão esquecidos. Agradeço também por sua generosidade, compreensão e incentivo.

A minha co-orientadora professora Silvia Ribeiro de Souza, por ceder suas valiosas frações de *Maytenus imbricata* permitindo o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao professor Luiz Fernando Teixeira de Medeiros, por ceder gentilmente seu Laboratório de Microbiologia para desenvolvimento dos trabalhos com fungos endofíticos e por colaborar com os estudos relacionados à microbiologia.

Às professoras Sueli Yamada-Oggatta e Adriana Akemi Okuma pela colaboração com os estudos com fungos endofíticos.

À Roberta Lambertucci Glueck e Djalma Menezes de Oliveira pela ajuda com as análises e identificação dos compostos trabalhados.

À colega Regina Assenço, por dividir comigo sua experiência na área de Microbiologia.

Aos técnicos do Cipharma Leonardo Teixeira e Patrícia Capelari pela cordialidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e à CAPES pela oportunidade de ser aluna de mestrado.

À secretária Mirela Pena pela gentileza e prontidão.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia e ao professor Gustavo Henrique Bianco por proporcionar harmonia no ambiente de trabalho.

Aos amigos que fiz no mestrado: Lúcia Coelho, Shiara Martins, Diego Xavier, Flávia Monteiro, Karen Carvalho. A caminhada foi bem melhor na companhia de vocês!

Agradecimentos

Aos velhos e bons amigos: Mariana Moreira, Carlos Araújo, Marcos Simi, Caio Mentone, Giovana Lopes, Mônica Campos e Cíntia Navarro. A torcida de vocês para que tudo desse certo fez a diferença.

Aos amigos da República Copo Sujo pelos momentos de descontração.

À minha amiga-irmã Ananda Xavier. Você é meu anjo da guarda, meu exemplo de sucesso, minha companheira de todas as horas. Tenho sorte de ter você na minha vida.

Ao meu melhor amigo e amor da minha vida Douglas Gualberto. Você foi fundamental na minha conquista, pois fez com que eu acreditasse em mim mesma.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | i |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | iv |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | v |
| RESUMO..... | vii |
| ABSTRACT..... | viii |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| Referências..... | 5 |
| | |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | |
| Importância da família Celastraceae..... | 7 |
| O gênero <i>Maytenus</i> | 8 |
| A espécie <i>Maytenus imbricata</i> | 9 |
| Produtos naturais de origem microbiana..... | 12 |
| Fungos endofíticos..... | 13 |
| Interação planta-microrganismo..... | 14 |
| Perspectivas para exploração dos fungos endofíticos..... | 15 |
| Referências..... | 16 |
| | |
| 3. OBJETIVOS..... | 25 |

4. PARTE EXPERIMENTAL

| | |
|--|----|
| 4. Parte Experimental..... | 26 |
| 4.1 Materiais e instrumentos..... | 27 |
| Elaboração das frações de <i>Maytenus imbricata</i> | 27 |
| Métodos cromatográficos..... | 27 |
| Solventes e reagentes..... | 27 |
| Espectrometria de RMN..... | 27 |
| Cromatogramas obtidos por CG-EM..... | 28 |
| Difratometria de raios-X de sólido..... | 28 |
| Coleta e identificação do material vegetal para isolamento de fungos endofíticos..... | 28 |
| Isolamento dos fungos endofíticos de <i>Maytenus</i> | 29 |
| Preservação dos fungos endofíticos isolados..... | 29 |
| Identificação dos fungos endofíticos..... | 29 |
| Cultivo dos fungos endofíticos isolados, para produção de extratos..... | 29 |
| 4.2. Métodos utilizados no estudo fitoquímico de <i>Maytenus imbricata</i> | 30 |
| Estudo químico de frações oriundas de extratos de <i>Maytenus imbricata</i> | 30 |
| Fração C _{5/67-105} | 30 |
| Fração C _{16/5-6} | 31 |
| Fração C _{16/7-8} | 31 |
| Fração C _{16/19-20} | 32 |
| Fração C _{16/21-23} | 32 |
| 4.3 Metodologia de estudo de fungos endofíticos de <i>Maytenus imbricata</i> | 33 |
| Coleta e preparo do material vegetal para isolamento dos fungos endofíticos. | 33 |
| Isolamento dos fungos endofíticos..... | 34 |
| Preservação dos fungos endofíticos..... | 34 |
| Método de Catellani..... | 34 |
| Criopreservação..... | 35 |
| Técnica do microcultivo para identificação dos fungos endofíticos..... | 36 |
| Preparo dos extratos dos fungos endofíticos..... | 37 |

| | |
|------------------|----|
| Referências..... | 38 |
|------------------|----|

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

| | |
|--|----|
| 5.1 Identificação das substâncias isoladas de frações de <i>Maytenus imbricata</i> | 39 |
| Constituinte 21C: 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona..... | 39 |
| Constituinte P56: Friedelina..... | 44 |
| Constituinte 29C: Lupeol..... | 48 |
| Constituinte C52b: Mistura de 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e (20R)-3-oxolupan-30-al..... | 54 |
| Contituinte IC1: 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona..... | 60 |
| 5.2 Fungos isolados de folha, caule, raiz e fruto de <i>M. imbricata</i> | 65 |
| 5.3 Análise por CG-EM dos extratos dos fungos endofíticos de <i>M. imbricata</i> | 69 |
| Referências..... | 75 |

| | |
|---------------------------|----|
| 6. CONCLUSÃO | 76 |
|---------------------------|----|

| | |
|------------------------------|----|
| 7. PERSPECTIVAS | 76 |
|------------------------------|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Introdução

| Figura | Título da Figura | Página |
|--------|---|--------|
| 1.1 | Estrutura química da emetina (A), vincristina (B), colchicina (C), rutina (D), artemisina (E), paclitaxel (F) e forscolina (G)..... | 4 |

2. Revisão da literatura

| Figura | Título da Figura | Página |
|--------|---|--------|
| 2.1 | Fotos de <i>Maytenus imbricata</i> : a) aspecto geral da planta, salientando o crescimento em touceiras; b) folhas; c) fruto capsular e bivalvar e d) flor..... | 10 |

4. Parte experimental

| Figura | Título da Figura | Página |
|--------|---|--------|
| 4.1 | Esquema do processo de execução de estudo químico de frações ainda não estudadas e do isolamento, caracterização química, identificação e estocagem de fungos endofíticos de <i>M.imbricata</i> | 26 |
| 4.2 | Esquema do processo de coleta de <i>Maytenus imbricata</i> , preparo e isolamento de fungos endofíticos..... | 35 |
| 4.3 | Esquema da montagem utilizada para o microcultivo de fungos endofíticos..... | 36 |
| 4.4 | Esquema do preparo de extratos de fungos endofíticos isolados de <i>M. imbricata</i> , para análise por CG-EM..... | 37 |

5. Resultados e discussão

| Figura | Título da Figura | Página |
|--------|---|--------|
| 5.1 | Espectro de RMN de ^1H de 21C (CDCl_3 , 200 MHz)..... | 40 |
| 5.2 | Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 21C, entre δ_{H} 0,60 e δ_{H} 2.80..... | 40 |
| 5.3 | Espectro de RMN de ^{13}C de 21C (CDCl_3 , 50 MHz)..... | 41 |
| 5.4 | Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 21C, entre δ_{C} 10,00 a δ_{C} 70,00..... | 41 |
| 5.5 | Subespectro DEPT de 21C (CDCl_3 , 50 MHz).)..... | 42 |
| 5.6 | Espectro de RMN de ^1H de P56 (CDCl_3 , 200 MHz)..... | 45 |
| 5.7 | Espectro de RMN de ^{13}C de P56 (CDCl_3 , 50 MHz)..... | 45 |
| 5.8 | Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de P56, entre δ_{C} 6,84 a δ_{C} 59,46..... | 46 |
| 5.9 | Subespectro DEPT de P56 (CDCl_3 , 50 MHz)..... | 46 |
| 5.10 | Espectro de RMN de ^1H de 29C (CDCl_3 , 400 MHz)..... | 49 |
| 5.11 | Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 29C, entre δ_{H} 0,94 e δ_{H} 1,68..... | 49 |
| 5.12 | Espectro de RMN de ^{13}C de 29C (CDCl_3 , 100 MHz)..... | 50 |
| 5.13 | Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 29C, entre δ_{C} 14,57 a δ_{C} 55,33..... | 50 |
| 5.14 | Subespectro DEPT de 29C (CDCl_3 , 100 MHz)..... | 51 |
| 5.15 | A) Difrátograma do lupeol e B) Estrutura do lupeol em forma de agulhas, caracterizada através dos dados obtidos por difratometria de raios-X de sólido.... | 53 |
| 5.16 | Espectro de RMN de ^1H de C52b (CDCl_3 , 200 MHz)..... | 55 |
| 5.17 | Ampliação de RMN de ^1H de C52b (CDCl_3 , 200 MHz)..... | 55 |
| 5.18 | Espectro de RMN de ^{13}C de C52b (CDCl_3 , 50 MHz)..... | 56 |
| 5.19 | Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de C52b, entre δ_{C} 14,29 e δ_{C} 65,05..... | 56 |
| 5.20 | Subespectro DEPT de C52b (CDCl_3 , 50 MHz)..... | 57 |
| 5.21 | Coeficiente de correlação obtidos para os dados de deslocamento químico dos constituintes 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (Acima) e (20R)-3-oxolupan-30-al de C52b (Abaixo), encontrados em C52b..... | 58 |
| 5.22 | Espectro de RMN de ^1H de IC1 (CDCl_3 , 200 MHz)..... | 61 |
| 5.23 | Espectro de RMN de ^{13}C de IC1 (CDCl_3 , 50 MHz)..... | 61 |
| 5.24 | Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de IC1, entre δ_{C} 14,37 a δ_{C} 55,72..... | 62 |
| 5.25 | Subespectro DEPT de IC1 (CDCl_3 , 50 MHz)..... | 62 |

| | | |
|------|--|----|
| 5.26 | Agrupamento de fungos endofíticos macroscopicamente semelhantes isolados de <i>M.imbricata</i> | 65 |
| 5.27 | Foto de fungos isolados de caule (MIC), folhas (MIF), raiz (MIR) e frutos (MIFR) de <i>Maytenus imbricata</i> | 66 |
| 5.28 | Mudança de coloração observada na colônia do fungo MIR43 após 72 h e 360 h (15 dias) de cultivo em meio BDA. À direita, uma ampliação da foto obtida após 360 h..... | 67 |
| 5.29 | Número de fungos endofíticos isolados de <i>M. imbricata</i> , separados de acordo com sua origem, cujos extratos foram analisados por CG-EM..... | 69 |
| 5.30 | Espectros de massas de constituintes isolados de fungos endofíticos comparados ao banco de dados NIST. A) ácido acético butil éster, B) ácido hidroxiaacético hidrazida, C) 4,4-dimetil-2-fenil-oxazolina, D) 1,5,5-trimetil-biciclo-2,2,1-heptan-2-ol..... | 72 |
| 5.31 | Constituintes identificados em extratos de colônias de fungos endofíticos isolados de <i>M. imbricata</i> e de <i>Xylaria sp.</i> e <i>Penicilium sp.</i> I = Biciclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,5,5-trimethyl, II = sitosterol, III = hexanal, IV = ácido hexadecanóico, V = ergosterol, VI = decanal..... | 74 |

ÍNDICE DE TABELAS

2. Revisão da literatura

| Tabela | Título da Tabela | Página |
|--------|--|--------|
| 2.1 | Constituintes isolados de diferentes partes de <i>M. imbricata</i> | 11 |

5. Resultados e discussão

| Tabela | Título da Tabela | Página |
|--------|--|--------|
| 5.1 | Dados de RMN de ^1H de ^{13}C de 21C, 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al (G2) e 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G4) (SILVA, 2007) e MAHATO (1994)..... | 43 |
| 5.2 | Dados de RMN de ^{13}C de P56 comparados à literatura DUARTE (2000) e SILVA (2007)..... | 47 |
| 5.3 | Dados de RMN de ^1H de ^{13}C de 29C comparado com os publicados por SHAHLAEI (2013)..... | 52 |
| 5.4 | Dados de RMN de ^1H de ^{13}C de C52b: [30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona e (20R)-3-oxolupan-30-al] comparados a literatura SILVA (2007) e MUTAI (2007)..... | 59 |
| 5.5 | Dados de RMN de ^1H de ^{13}C de IC1 comparados com G5 e MS13 publicados na literatura..... | 63 |
| 5.6 | Códigos das colônias de fungos endofíticos de folhas, caule, raiz e frutos de <i>M. imbricata</i> , listados de acordo com a ordem de isolamento..... | 68 |
| 5.7 | Compostos voláteis identificados por CG-EM no extrato acetato de etila e metanólico* de cultura de fungos endofíticos isolados de <i>M. imbricata</i> | 70 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------------------|--|
| AcOET | Acetato de etila |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| BDA | Batata dextrose Agar |
| C | Caule |
| °C | Graus Celsius |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CC | Cromatografia em coluna |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| CH ₂ Cl ₂ | Diclorometano |
| CHCl ₃ | Clorofórmio |
| CDCl ₃ | Clorofórmio deuterado |
| CG | Cromatografia gasosa |
| CG-EM | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| CIM | Concentração inibitória mínima |
| δ | Deslocamento químico |
| δ_c | deslocamento químico do carbono-13 |
| δ_H | deslocamento químico do hidrogênio |
| DEPT | “Distortionless enhancement by polarization transfer” |
| EM | Espectrometria de massas |
| EtOH | Etanol |
| F | Folha |
| FDA | “Food and Drug Administration” |
| Fig. | Figura(s) |
| Fr | Fruto |
| g | Gramas(s) |
| Hex | Hexano |
| h | Hora(s) |
| Hz | Hertz |
| HMBC | “Heteronuclear multiple bond correlation” |

| | |
|------------------------|---|
| HMQC | “Heteronuclear multiple quantum correlation” |
| <i>J</i> | Constante de acoplamento |
| k | Kelvin |
| MI | <i>Maytenus imbricata</i> |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligrama(s) |
| MHz | Megahertz |
| m | Metro(s) |
| µm | micrômetro |
| mm | Milímetro |
| mL | Mililitro |
| min | Minuto |
| <i>m/z</i> | Razão entre a massa do fragmento e sua carga elétrica |
| NIST | “National Institute of Standards and Technology” |
| nº | Número |
| pág. | Página(s) |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| pO ₂ | Pressão de oxigênio |
| pCO ₂ | Pressão de dióxido de carbono |
| % | Porcentagem |
| R | Raiz |
| R ² | Coefficiente de correlação |
| R _f | Fator de retenção em cromatografia em camada delgada |
| RMN de ¹³ C | Ressonância magnética nuclear de carbono-13 |
| RMN de ¹ H | Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 |
| TTPC | Triterpeno(s) pentacíclico(s) |
| TMS | Tetrametilsilano |
| Tr | Tempo de retenção |
| USA | “Unite States of America” |
| UV | Ultravioleta |
| ZDF | “Zucker diabetic fatty” |

RESUMO

Neste trabalho, teve-se como objetivo dar continuidade a estudos realizados com *Maytenus imbricata*. Durante o desenvolvimento do trabalho foram realizados experimentos envolvendo a purificação de frações obtidas através de fracionamento de extratos polares e apolares de *Maytenus imbricata*. O isolamento dos constituintes das folhas foi realizado utilizando-se métodos cromatográficos clássicos como cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada. A determinação estrutural foi realizada utilizando-se dados obtidos através de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN de ^1H e de ^{13}C). Foi possível o isolamento e identificação de 5 constituintes pertencentes a classe dos triterpenos pentacíclicos. Foram realizados estudos inéditos com fungos endofíticos isolados de diferentes partes de *M. imbricata*. Os fungos foram cultivados com o objetivo de se obter extratos metanólicos e em acetato de etila. Os extratos foram submetidos a fracionamento através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) e os constituintes isolados foram analisados através do banco de dados NIST. Foram identificados 27 constituintes de diferentes classes químicas. Os fungos também foram cultivados em lâminas para posterior identificação microscópica.

Palavras chave: *Maytenus imbricata*, Celastraceae, fungos endofíticos, RMN, CG-EM.

ABSTRACT

This work had as objective to continue studies done with *Maytenus imbricata*. During the development of this work, the experiments were performed involving purification of fractions obtained by polar and nonpolar extracts fractionation of *M. imbricata*. The isolation of the constituents of the sheets was performed by classical chromatographic methods like column chromatography and thin layer chromatography. The structure determination was performed using data obtained through nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon (^1H and ^{13}C NMR). It was possible the isolation and identification of five constituents pentacyclic triterpenes. Unpublished studies were performed with isolated endophytes from different parts of *M. imbricata*. The fungi were grown in order to obtain methanol extracts and ethyl acetate extracts. The extracts were subjected to fractionation by Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry (GC-MS) and the isolated constituents were analyzed using the NIST database. Were identified 27 constituents of different chemical classes. The fungi were cultured on slides for subsequent microscopic identification.

Keywords: *Maytenus imbricata*, Celastraceae, endophytic fungi, MR, GC-MS.

1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos da pré-história, plantas medicinais são utilizadas nos cuidados com a saúde e ainda constituem a mais importante alternativa encontrada pela maioria da população mundial, principalmente as de países em desenvolvimento (UPRETY, 2012).

Os fármacos derivados de produtos naturais estão envolvidos no tratamento de cerca de 87 % das enfermidades que acometem seres humanos, sendo usados como antibacterianos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossuppressores, anticancerígenos e outros (BRANDÃO, 2010).

Estudos mostraram que 50 % dos medicamentos aprovados entre 1981 e 2006, pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos, são direta ou indiretamente derivados de produtos naturais (FERREIRA e PINTO, 2010) e que mais de 60 % dos medicamentos anticancerígenos têm sua origem em uma fonte natural (CRAGG e NEWMAN, 2009).

Neste contexto muitas plantas da família Celastraceae se destacam por possuírem inúmeras atividades biológicas. MIRANDA e colaboradores (2009) estudaram a espécie *Austroplenckia populnea* da família Celastraceae resultando no isolamento de triterpenos pentacíclicos friedelanos (friedelina, friedelinol, 28- hidroxifriedelina e ácido populnônico), ursano (α -amirina) e quinonametídeo (pristimerina), dentre outros. Todas estas substâncias apresentaram propriedade antibacteriana.

Na região amazônica, espécies pertencentes ao gênero *Maytenus* (Celastraceae) tem sido utilizadas na medicina tradicional, contra distúrbios gastrintestinais, reumatismos, inflamação e no tratamento de câncer (PIACENTE, 2006). Um dos primeiros estudos pré-clínicos destinados a confirmar os efeitos gástricos de espécies do genero *Maytenus* foi realizado por SOUZA-FORMIGONI e colaboradores (1991). Foram preparadas infusões, de quantidades iguais de folhas de *M. aquifolium* e *M. ilicifolia*, usadas para tratar úlceras em ratos, as quais foram induzidas por indometacina e estresse por resfriamento controlado (SOUZA-FORMIGONI, 1991).

MORITA e colaboradores (2008) relata, em seus estudos, que extratos de *Maytenus chuchuhuasca* possuem constituintes que inibem a polimerização de tubulina promovendo um efeito antimitótico. Os compostos responsáveis por essa atividade são triterpenos pentacíclicos (TTPCs) como 28-hidroxi-olean-12-en-3,11-diona (*Krukovina A*) e 6-oxo-tingenol.

Estudos realizados por SILVA (2007) mostram que extratos de *M. imbricata* possuem propriedade antioxidante e herbicida.

Além de plantas, outra fonte de produtos naturais também tem sido explorada: os fungos endofíticos. Estes fungos são microrganismos que durante seu ciclo de vida colonizam tecidos internos de seus hospedeiros, sem lhes causar sintomas (PETRINI, 1992), o que caracteriza uma simbiose perfeita.

O interesse por estes fungos iniciou-se na década de 90 com a descoberta de que o fungo *Taxomyces andreanae*, encontrado na planta *Taxus brevifolia*, produzia o paclitaxel (Taxol®) (STIERLE, 1993). O paclitaxel é um diterpeno com alta propriedade antitumoral (CORRÊA, 1995).

Existe um grande interesse pela continuidade de estudos relacionados com plantas da família Celastraceae, como a espécie *M. imbricata*, foco deste trabalho e de fungos endofíticos da mesma. O estudo de fungos endofíticos de *M. imbricata* é um trabalho inédito, que abre perspectivas para a descoberta de novas fontes de produtos naturais bem como de metabólitos secundários ainda desconhecidos.

O uso de substâncias naturais para curar doenças tem sido uma prática antiga. Comparado com compostos sintéticos, produtos naturais contém de forma inerente uma ampla diversidade estrutural e desempenham um papel chave na descoberta de compostos para novas pesquisas de drogas (NEWMAN, 2012).

Acredita-se que a terapia com plantas medicinais esteja baseada em descobertas empíricas de milhares de anos. É provável que o profundo conhecimento sobre remédios de plantas por culturas tradicionais se desenvolveu por meio da observação cuidadosa e da experimentação, através de tentativa e erro, por muitos séculos, e que as curas mais importantes foram transmitidas verbalmente de uma geração para outra (OLIVEIRA, 2010).

Historicamente, todas as preparações medicinais foram derivadas da natureza e, atualmente, plantas, microrganismos, organismos marinhos e insetos continuam sendo importantes fontes para o descobrimento de novos fármacos, além de atuarem no setor de nutracêuticos e na indústria de higiene pessoal e cosméticos (BARREIRO, 2001).

As plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica, como a emetina, vincristina, colchicina e rutina (Fig. 1.1).

Outras moléculas de relevante ação farmacológica são descritas na literatura, tais como a forscolina, o paclitaxel e a artemisinina (CECHINEL FILHO, 1998).

Entre os diversos exemplos de importantes substâncias originárias de plantas, a forscolina, isolada de *Coleus barbatus*, apresentou efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores (DE SOUZA, 1993), a artemisinina (Fig. 1.1), presente em *Artemisia annua*, exerce potente atividade antimalárica (KAMCHONWONGPAISON, 1996).

O diterpeno anticancerígeno paclitaxel (Fig. 1.1), isolado de plantas do gênero *Taxus*, que após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico, constitui-se numa grande esperança para pessoas portadoras de câncer nos ovários e pulmões (KINGSTON, 1991; HORWITZ, 1994; CORRÊA, 1995). O uso de extratos vegetais no tratamento de doenças é generalizado no Brasil e isto se deve em função de sua rica medicina tradicional (ANDRADE, 2007).

A indústria farmacêutica, motivada pela descoberta de quimioterápicos eficazes, aumentou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, como a vimblastina e a vincristina, alcaloides antitumorais isolados da vinca (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Neste contexto, o estudo de plantas como fonte de medicamentos continua sendo de grande importância não só para descoberta de novos fármacos, mas também para a melhoria de medicamentos e terapias já existentes. E, espécies da família Celastraceae tem sido alvo de muitos estudos, visto que muitas delas são empregadas na medicina tradicional.

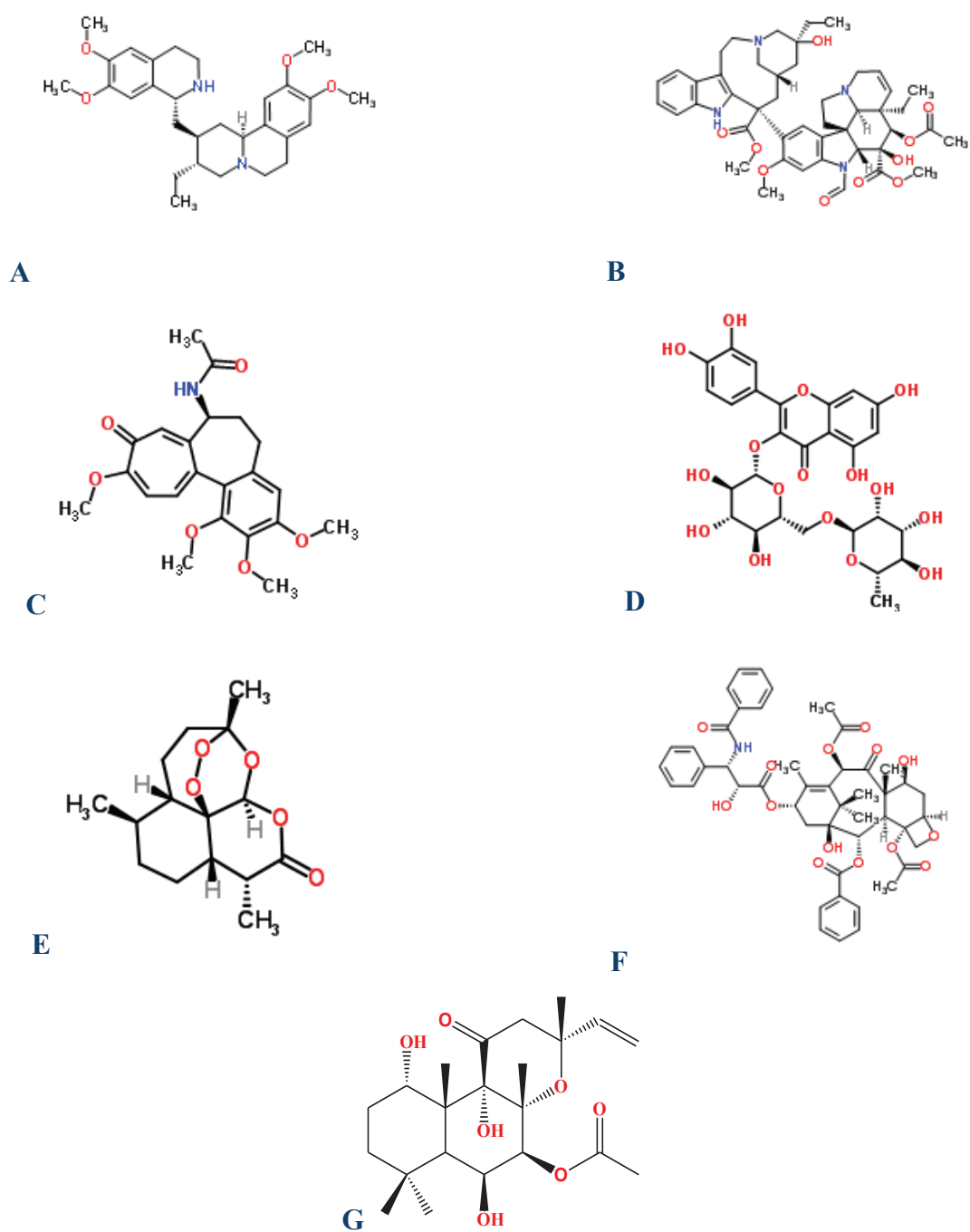


Figura 1.1: Estrutura química da emetina (A), vincristina (B), colchicina (C), rutina (D), artemisina (E), paclitaxel (F) e forscolina (G).

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. F., LEMOS, M., COMUNELLO, E., NOLDIN, V. F., FILHO, V. C.; NIERO, R., Evaluation of the antiulcerogenic activity of *Maytenus robusta* (Celastraceae) in different experimental ulcer models, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 252-257, 2007.
- BARREIRO, E.J., FRAGA, C. A., **Química Medicinal**, Ed. ArtMed, São Paulo, 243 p. 2001.
- BRANDÃO, H. N., DAVID, J. P., COUTO, R. D., NASCIMENTO, J. A. P., Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas, **Química Nova**, v. 33, n.6, p. 1359-1369, 2010.
- CECHINEL FILHO, V., Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade, **Química Nova**, V.21; n. 1, p. 99-105, 1998.
- CORRÊA, A. G., Taxol: da descoberta ao uso terapêutico, **Química Nova**, v. 18, n.5, p. 460-467, 1995.
- CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J., Nature: a vital source of leads for anticancer drug development, **Phytochemistry Reviews**, v. 8, p. 313-331, 2009.
- DE SOUZA, N.J., Industrial development of traditional drugs: the forskolin example, A mini-review, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, 177-180, 1993.
- FERREIRA, V. F., PINTO, A. C., A fitoterapia no mundo, **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.
- HORWITZ, S.B., How to make taxol from scratch, **Nature**, v. 367, p. 593-594, 1994.
- KAMCHONWONGPAISAN, S., MESHNICK, S. R., The mode of action of the antimalarial artemisinin and its derivatives, **Gen. Pharmacol.**, v. 27, p. 587-592, 1996.
- KINGSTON, D.G.I., Chemistry of taxol, **Pharmacology Therapy**, v.52, p. 1-34, 1991.
- MIRANDA, R. R. S., DUARTE, L. P., SILVA, G. D. F., VIEIRA FILHO, S. A., Carvalho, P. B., MESSAS, A. C., Evaluation of antibacterial activity of “Mangabarana” *Austroplenckia populnea* Reissek (Celastraceae), **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 370-375, 2009.
- MONTANARI, C. A., BOLZANI, V. S., Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais, **Química Nova**, v.24, n.1, p. 105-111, 2001.

- MORITA, H., HIRASAWA, Y., MUTO, A., YOSHIDA, T., SEKITA, S., SHIROTA, O.,
Antimitotic quinonoid triterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18, p. 1050-1052, 2008.
- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, **Journal of Natural Products**, v.75, p. 311-335, 2012.
- OLIVEIRA, P. C., Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anti-inflamatória de *Lychnophora paserina* (Mart ex DC) Gardn (Asteraceae), Ouro Preto, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFOP, **Dissertação Mestrado**, 112p., 2010.
- PETRINI, O., SIEBER, T.N., TOTI, L., VIRET, O., Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi, **Natural toxins**, v.1, p. 185-196, 1992.
- PIACENTE, S., CAMPANER DOS SANTOS, L., MAHMMOD, N., PIZZA, C., Triterpenes from *Maytenus macrocarpa* and evaluation of their anti-HIV activity, **Natural product communications**, v.1, n.12, p. 1073-1078, 2006.
- SILVA, S. R. S. Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico e herbicida de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG, **Tese de Doutorado**, 2007, 226p.
- SOUZA-FORMIGONI, M. L. O., OLIVEIRA, M. G., SILVEIRA-FILHO, N. G., BRAZ, S., CARLINI, E. A., Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 21-27, 1991.
- STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D., Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew , **Science** , v. 260, p. 214-216, 1993.
- UPRETY, Y., ASSELIN, H., DHAKAL, A., JULIEN, N., Traditional use of medicinal plants in the boreal forest of Canada: review and perspectives, **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 8, n. 7, p. 1-14, 2012.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Importância da família Celastraceae

A família Celastraceae encontra-se distribuída nas regiões tropical e subtropical, incluindo no norte da África, América do Sul e Ásia, particularmente na China (SPIVEY, 2002; DUARTE, 2010). Esta família é constituída por 98 gêneros e aproximadamente 1200 espécies (SIMMONS, 2008), sendo que, no Brasil, essa família é representada por quatro gêneros: *Maytenus* Juss., *Austroplenckia* Lund., *Franhoferia* Mart. e *Salacia* Mart. (OLIVEIRA, 2006). O interesse pelo estudo de espécies de Celastráceas tem ocorrido em função de propriedades farmacológicas apresentadas por várias delas, tais como: atividade anti-reumática, antitumoral (tratamento do câncer de pele), ação curativa em feridas de pele (MONACHE, 1972; GONZALES, 1982), dentre outras.

Pesquisas realizadas com extratos de casca de raízes de *Celastrus vulcanicola* e *Maytenus jelskii* demonstraram que estes possuem atividade antidiabética. Os constituintes destes extratos, responsáveis por essa atividade foram os triterpenos pentacíclicos (TTPCs) da série friedelano, os quais atuaram melhorando a sinalização da insulina (ARDILES, 2012).

Austroplenckia populnea, uma espécie da família Celastraceae, naturalmente encontrada nas regiões de Cerrado do Brasil, apresenta propriedades biológicas que incluem ação antidisentérica (CORREA, 1969), efeito antitumoral (MONACHE, 1972), atividade antirreumática (GONZALES, 1982). Extratos de diferentes polaridades, obtidos de galhos e raízes desta planta bem como os TTPCs: friedelina, 3 β friedelinol, 28-hidroxifriedelina, ácido populnônico, ácido catonônico, ácido epicatonônico, pristimerina, abruslactona e α -amirina, isolados da mesma, foram testados contra espécies de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* utilizando-se o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Todos os extratos apresentaram boa atividade contra pelo menos um destes microrganismos (MIRANDA, 2009).

Pristimerina e celastrol, isolados de raízes de *Celastrus hypoleucus*, apresentaram potencial inibitório frente a diversos fungos fitopatogênicos, como *Rhizoctonia solani* e *Glomerella cingulata* (LUO, 2005).

Estudos químicos realizados com raízes de *Maytenus vitis-idaea* levaram ao isolamento de vários TTPCs, como 15 α -hidroxitingenona e tingenona. Pela comprovada ação citotóxica da

tingenona, 15 α -hidroxitingenona foi testada e apresentou também atividade antitumoral frente a células tumorais humanas (DE ALMEIDA, 2010).

Foi observado que o extrato aquoso de raízes da espécie *Salacia oblonga* tem a propriedade de atenuar a nefropatia diabética em ratos ZDF (*Zucker diabetic fatty*) (HE, 2011). HUANG e colaboradores (2008) também demonstraram que o extrato aquoso de raízes da *Salacia oblonga* induziu a regressão de hipertrofia cardíaca em ratos ZDF.

O gênero *Maytenus*

O gênero *Maytenus* é um dos maiores da família Celastraceae, contendo cerca de 80 espécies distribuídas em todo território brasileiro (CARVALHO-OKANO, 2005; SANTOS, 2007). A atividade biológica de espécies *Maytenus* tem sido atribuída a vários grupos de metabólitos secundários, como triterpenos (HUTCHINGS, 1996; SHIROTA, 1996; ORABI, 2001), sesquiterpenos (CORSINO, 1998; GONZALEZ, 2000), glicosídeos fenólicos (SANNOMIYA, 1998), alcalóides (HUTCHINGS, 1996; ORABI, 2001), flavonóides (TIBERTI, 2007; DE SOUZA, 2008; SOUZA, 2009) e taninos (DE SOUZA, 2008).

Este gênero é importante pelas atividades biológicas (SOUZA, 2005; DIAS, 2007) e, também, por ser utilizado na medicina popular como anti-séptico, antiasmático, antitumoral (JELLER, 2004; NAKAGAWA, 2004; PERESTELO, 2010), antiviral (HUSSEIN, 1999), no tratamento de problemas gástricos (BAGGIO, 2007; CIPRIANI, 2009) e anti-inflamatório (SOSA, 2007).

Maytenus rígida, popularmente conhecida como “bom-nome”, é uma árvore comumente encontrada na região nordeste do Brasil. Na medicina tradicional desta região, a casca é utilizada na forma de infusão ou simplesmente mastigada, para tratamento da dor (DELLE MONACHE, 1984). Além disso, a atividade inibidora de alimentação de insetos foi demonstrada por alcalóides isolados de *M. rígida* (DELLE MONACHE, 1984).

Extratos da casca de *Maytenus chuchuhuasca* inibiram a polimerização de tubulina - proteína associada a sustentação celular, ou seja ao “citoesqueleto” - desempenhando atividade antimitótica. Os compostos responsáveis pela inibição da polimerização da tubulina foram os triterpenos quinonametídeos tingenona, 22 β -hidroxitingenona, pristimerina e celastrol (MORITA, 2008).

Um recente estudo foi realizado com extratos obtidos de galhos de *Maytenus gonoclada*, propiciando o isolamento de seis triterpenos friedelanos oriundos do extrato hexânico: 3-oxofriedelano, 3 β -hidroxifriedelano, 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano, 3,11-dioxo-friedelano, 3,16-dioxofriedelano e 3-oxo-12 α , 29-di-hidroxifriedelano (SILVA, 2011). O extrato hexânico e as substâncias isoladas foram submetidos a testes de atividade contra *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans*. O extrato metanólico apresentou atividade antimicrobiana moderada frente a todas as espécies de bactérias testadas e o constituinte 3-oxo-12 α -hidroxifriedelano apresentou atividade inibitória do crescimento de *C. albicans* (SILVA, 2011).

Pesquisas comprovaram que raízes de *M. ilicifolia*, muito utilizadas no Brasil, possuem um potencial relacionado ao tratamento de câncer e também indicaram que essa parte da planta representa uma importante fonte de compostos com propriedades antioxidantes (VELLOSA, 2006). Estudos realizados por BAGGIO e colaboradores (2007) demonstraram *in vivo* a propriedade gastroprotetora de frações ricas em flavonóides, separadas de folhas de *M. ilicifolia*, contendo epicatequina (3,1 %), dulcitol ou galactiol (25 %) e catequina (2 %), como os constituintes presentes em maior quantidade. Estes constituintes foram correlacionados com a inibição *in vitro* de atividade H⁺,K⁺-ATPase em coelhos. Posteriormente, CRESTANI e colaboradores (2009) desenvolveram um estudo comprovando que a administração intravenosa de frações semi-purificadas de folhas de *M. ilicifolia* induziu uma redução da pressão arterial de ratos anestesiados. O mecanismo predominante desta ação foi a ativação da rota óxido nítrico/guanilato ciclase.

Trabalhos realizados por REYES e colaboradores (2006) com raízes de *Maytenus cuzcoinae* e folhas de *Maytenus chiapensis* levaram ao isolamento de TTPCs lupanos inéditos, sendo um deles a 3-*epi*-nepeticina, e outros dezesseis compostos já conhecidos. Foi realizado testes de atividade antiinflamatória com os compostos isolados e vários deles foram ativos.

A espécie *Maytenus imbricata*

Maytenus imbricata Mart, *ex. Reissek* encontra-se distribuída por toda a região de cerrado nos estados de Minas Gerais e Bahia. É um arbusto de porte inferior a 1,20 m de altura ou subarbusto com até 0,50 m (Fig.2.1).

CARVALHO-OKANO (1992), apresentou a descrição botânica e SILVA (2007a) desenvolveu estudos anatômicos desta espécie. Em paralelo, SILVA (2005, 2007a, 2007b) realizou estudos fitoquímicos de folhas, galhos e caules de *Maytenus imbricata*, que possibilitaram a separação de substâncias do extrato hexânico e de um material sólido a partir deste, assim como constituintes isolados de folhas, caules e galhos, dos extratos obtidos por extração com acetato de etila e etanol das folhas, além de efetuar uma análise do óleo essencial das folhas. Os constituintes isolados de *M. imbricata* encontram-se listados na Tabela 2.1.



Figura 2.1: Fotos de *Maytenus imbricata*: a) aspecto geral da planta, salientando o crescimento em touceiras; b) folhas; c) fruto capsular e bivalvar e d) flor. Fonte: (Silva, 2007).

Tabela 2.1: Constituintes isolados de diferentes partes de *M. imbricata*

| Constituinte | Parte da planta | | |
|--|-----------------|---------------|------|
| | Folha | Caule e galho | Raiz |
| Friedelina | * | | |
| 30-Hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona | * | * | * |
| 3 α ,30-Di-hidroxi-lup-20(29)-eno | * | | * |
| Ácido 3,4-secofriedelan-3-óico | * | | |
| Epicatequina | * | | |
| Dulcitol | * | | |

Para avaliação da atividade biológica de *M. imbricata*, SILVA (2007a) realizou testes de propriedade herbicida e antioxidante. O teste de propriedade antioxidante foi realizado com os extratos hexânico (Hex), clorofórmico (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt) e etanólico (EtOH), das folhas, extratos Hex e AcOEt dos galhos e extrato hidroalcoólico das raízes. Os constituintes testados foram o dulcitol e a epicatequina, obtidos das folhas, e mistura de proantocianidinas, obtida dos galhos. Os extratos AcOEt, EtOH e CHCl₃ das folhas, extratos hidroalcoólico das raízes, extrato AcOEt dos galhos e a epicatequina apresentaram propriedade antioxidante (SILVA, 2007a; SILVA, 2009).

O teste de efeito herbicida foi realizado com friedelina, epicatequina, dulcitol, 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona, 3 α ,30-di-hidroxi-lup-20(29)-eno e ácido 3,4-secofriedelan-3-óico. Apenas o último apresentou atividade inibitória na síntese de ATP, indicando que, este possui potencial para ser utilizado no desenvolvimento de herbicidas naturais (SILVA, 2007b; SILVA, 2009).

Estudos realizados com extratos e substâncias isoladas de raízes de *M. imbricata* apresentaram atividade contra as bactérias *Salmonella typhimurium*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereuse* e contra a levedura *Candida albicans*. Ainda neste estudo foi avaliada a propriedade citotóxica contra *Artemia salina* e a capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase de extratos e constituintes isolados. Alguns extratos e constituintes apresentaram atividade citotóxica e alguns compostos isolados causaram inibição da enzima acetilcolinesterase. (RODRIGUES, 2011, 2012).

Produtos naturais de origem microbiana

Os microrganismos compreendem uma enorme diversidade de espécies e, apesar das inúmeras aplicações biológicas já descritas na literatura (NEWMAN, 2000; BUTLER, 2004, CHIN, 2006; LAM, 2007; GALM; SHEN, 2007), os fungos e bactérias ainda constituem um dos grupos menos estudados sob o ponto de vista do metabolismo secundário (STROBEL, 1996).

Os fungos constituem uma fonte excepcionalmente rica de importantes fármacos incluindo: antibióticos antibacterianos (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclina, macrolídeos, glicopeptídeos e estreptograminas), antibióticos antitumorais (antraciclina, bleomicina, actinomicina e ácidos aureólicos), agentes redutores do nível de colesterol sanguíneo (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A), entre outros (NEWMAN, 2000; DEMAIN, 1999). Aproximadamente um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos conhecidos foram obtidos de fungos (KONGSAEREE, 2003).

Entre as classes de fungos, uma que merece destaque é a dos fungos endofíticos devido à grande ineditismo de seus constituintes, diversidade química, e suas atividades biológicas (TAN e ZOU, 2001; SCHULZ, 2002; STROBEL, 2002; STROBEL e DAISY, 2003; GUNATILAKA, 2006; PUPO, 2006; ZHANG, 2006; VALACHOVA, 2007; FIRAKOVA, 2007; GALLO, 2007; GUO, 2008; SANTOS FILHO, 2010).

Os microrganismos endofíticos vivem no interior das plantas, interagindo com diferentes espécies, sem causar dano ao seu hospedeiro. Esses microrganismos influenciam várias características das plantas e conferem certos benefícios ao vegetal hospedeiro, como, por exemplo, a produção de antibióticos (GOMES, 2008).

Há alguns anos não se conhecia a grande potencialidade dos endofíticos, entretanto, este interesse vem aumentando com a descoberta recente de características como a produção de compostos biologicamente ativos, antibióticos, fungicidas e herbicidas (GOMES, 2008).

Plantas medicinais com propriedades antimicrobianas também são habitadas por microrganismos endofíticos, sugerindo que a ação antibacteriana ou antifúngica esteja associada ao endófito e não à planta, ou provavelmente em função da interação entre ambos (GOMES, 2008).

No Brasil vários autores reportaram a produção de fármacos por endófitos como *Xylaria* sp., *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp. e também *Phomopsis* sp. (GOMES, 2008).

Fungos endofíticos

Fungos endofíticos são microrganismos que vivem no interior de tecidos de plantas sem lhes causar efeitos negativos aparentes (PETRINI, 1991). Evidências de associação planta-microrganismo encontradas em tecidos fossilizados de talos e folhas revelaram que a associação endófito-planta aconteceu no tempo do surgimento das primeiras plantas superiores na Terra (REDECKER, 2000). A existência de fungos no interior do organismo de plantas assintomáticas é conhecida desde o final do século XIX (GUERIN, 1898).

Esta associação com plantas medicinais tem recebido maior atenção depois da descoberta de que os fungos endofíticos *Taxomyces andrenae* e *Tubercularia sp.* isolados de *Taxus brevifolia* e *T. mairei*, respectivamente, produzem o composto antitumoral paclitaxel (Taxol®) (STIERLE, 1995; WANG, 2000).

Estudos recentes demonstraram que comunidades de fungos endofíticos vivendo em tecidos de plantas medicinais produzem uma ampla gama de metabólitos portadores de diferentes tipos de atividades biológicas (HUANG, 2008; ROSA, 2010; VIEIRA, 2012).

A produção de compostos bioativos por endófitos, especialmente aqueles exclusivos de suas plantas hospedeiras, não é importante somente em termos de perspectivas ecológicas, mas também do ponto de vista bioquímico e molecular. Existe a possibilidade de emprego de fungos endofíticos para a produção abundante de novos metabólitos secundários biologicamente ativos. Por exemplo, utilizando condições controladas de fermentação, pela alteração da cultura acessível e parâmetros do processo (composição do meio de cultivo, aeração, pO₂, pCO₂, pH, temperatura, forma de agitação, amostragem e momento de coleta), a produção de compostos por fungos endofíticos é otimizada (KUSARI, 2012).

Entretanto, a produção comercial de compostos por fungos endofíticos ainda representa um desafio. A redução da produção de metabólitos secundários em subculturas sob condições de monoculturas axênicas é uma das mudanças que necessitam ser discutidas para estabelecer, restaurar e sustentar o potencial de endófitos para a biossíntese *in vitro* (KUSARI e SPITELLER, 2011).

Interação planta-microrganismo

As plantas respondem de diversas maneiras ao ataque por microrganismos. As formas de defesa mais conhecidas são o estabelecimento de barreiras físicas (enrijecimento da parede celular com acúmulo de ligninas) e químicas (produção de fitoalexinas). A indução da biossíntese de fitoalexinas é umas das possíveis maneiras de se aumentar a produção de metabólitos secundários em plantas (MANDAL, 2007). Por sua vez, o microrganismo invasor tende a degradar enzimaticamente essas barreiras, estabelecendo uma verdadeira “batalha” química, dificultando a identificação das fitoalexinas como metabólitos finais produzidos pelo hospedeiro (SNYDER, 1990).

Fisiologicamente, os fungos endofíticos apresentam e utilizam as mesmas estratégias de penetração ao hospedeiro que os fungos patogênicos e a planta responde a essa invasão com seus mecanismos de defesa e reconhecimento (PETRINI, 1992; PASCHOALATI, 1998).

A hipótese de “antagonismo balanceado” (SCHULZ, 1999; SCHULZ, 2006) foi inicialmente proposta para discutir como um endófito evita a ativação das defesas do hospedeiro, garantindo auto-resistência antes de ser incapacitado por metabólitos tóxicos do hospedeiro e possibilitando crescimento dentro do seu hospedeiro sem causar-lhe manifestações visíveis de infecção ou doença (SCHULZ, 1999, 2009; KUSARI, 2012). Através dessa hipótese propõe-se que a colonização assintomática seja um balanço de antagonismos entre o hospedeiro e o endófito (KUSARI, 2012).

Endófitos e patógenos possuem muitos fatores de virulência que são revertidos pelos mecanismos de defesa da planta. Se a virulência do fungo e a defesa da planta estão balanceadas, a associação permanece aparentemente assintomática e sem virulência. Se os mecanismos de defesa da planta se contrapõem completamente aos fatores de virulência do fungo, os mesmos irão perecer. No sentido inverso, se a planta sucumbe à virulência dos fungos, uma relação planta-patógeno levará a doença (KUSARI, 2012).

A produção de produtos naturais por fungos endofíticos, uma vez considerada como exclusivo de plantas, também levanta intrigantes questões a respeito da fonte original destes produtos. Atualmente, é possível que os vários então chamados “metabólitos de plantas” seriam de fato produtos biossintéticos de seus endófitos. Um importante exemplo é a produção do potente antitumoral maitansinóide ansamitocina, isolado originalmente de plantas superiores, pelo Actinomyce *Actinosynnema pretiosums auranticum* (YU, 2002). Através deste estudo sustentou-

se a possibilidade de que a verdadeira fonte biossintética do maitansinóide seria uma bactéria endofítica (KUSARI, 2012).

Perspectivas para exploração dos fungos endofíticos

A bioprospecção de endófitos que produzem os metabólitos secundários bioativos de maior interesse envolve a triagem de fungos endofíticos diferentes, isolados de uma única planta hospedeira, para identificar aquele mais competente e com os aspectos fisiológicos desejados (SCHERLACH e HERTWECK, 2009). Os demais, então chamados endófitos “incompetentes”, são descartados sem submetê-los a investigações mais detalhadas, o que provoca a perda de um conjunto inteiro de produtos naturais que são produzidos sob condições adequadas semelhantes ao *habitat* natural (KUSARI, 2012). Conclui-se então que um grande “reservatório enigmático” de produtos naturais, ainda é praticamente inexplorado.

É possível até mesmo que os fungos endofíticos produzam os compostos desejáveis, em quantidades abaixo do limite de detecção, algumas vezes junto a uma ampla gama de condições metabólicas e de diferentes condições de cultura. Portanto, é importante compreender e esclarecer as interações ecológico-químicas dos endófitos para explorar plenamente seu inesgotável potencial para biossíntese de produtos naturais (KUSARI, 2012).

Devido ao fato de que a interação entre fungo endofítico com a planta hospedeira e outros endófitos permanece versátil, mesmo leves variações nas condições de cultivo *in vitro* impactam no tipo e gama de metabólitos secundários que são produzidos. É bem estabelecido que o processo metabólico de microrganismos dependa criticamente dos parâmetros de cultivo (SCHERLACH e HERTWECK, 2009).

Recentemente, o termo “OSMAC” (*one strain many compounds*) foi sugerido para descrever os longos efeitos conhecidos de variação dos parâmetros de fermentação na biossíntese de metabólitos secundários por determinados microrganismos, aumentando o número de compostos produzidos para o acúmulo dos até então desconhecidos produtos naturais (BODE, 2000; GROND, 2002; RATEB, 2011). Assim sendo, estudos futuros para investigar ideias fundamentais entre a comunicação endófito-endófito e planta-endófito usando as ferramentas disponíveis e emergentes não somente permitiram a descoberta e sustentação da produção de produtos naturais desejáveis, como também de outros metabólitos secundários não estudados, confirmando o potencial dos endófitos (KUSARI, 2012).

REFERÊNCIAS

- ARDILES, A.E., GONZÁLEZ-RODRIGUEZ, A., NÚÑEZ, M.J., PERESTELO, N.R., PARDO, V., JIMÉNEZ, I.A., VALVERDE, A.M., BAZZOCCHI, I.L., Studies of naturally occurring friedelane triterpenoids as insulin sensitizers in the treatment type 2 *Diabetes mellitus*, **Phytochemistry**, v. 84, p. 116-124, 2012.
- BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., OTOFUJI, G. M., CIPRIANI, T. R., SOUZA, L. M., SASSAKI, G. L., IACOMINI, M., RIECK, L., MESIA-VELA, S., MARQUES, M. C., A flavonoid-rich fraction of *Maytenu salicifolia* Mart. ex. Reiss protect the gastric mucosa of rodents through inhibition of both H⁺, K⁺-ATPase activity and formation of nitric oxide, **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p. 433-440, 2007.
- BODE, H.B., WALKER, M., ZEECK, A., Structure and biosynthesis of mutolide, a novel macrolide from a UV mutant of the fungus F-240707, **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2000, p. 1451–1456, 2000.
- BUTLER, M.S., The role of natural product chemistry in drug discovery, **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004
- CARVALHO-OKANO, R. M., Estudos taxonômicos do gênero *Maytenus* Mol. Emend. Mol (Celastraceae) do Brasil Extra Amazônico, **Tese de Doutorado**, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo. p. 253, 1992.
- CARVALHO-OKANO, R.M., LEITÃO FILHO, H.F., O gênero *Maytenus* Mol.emend. Mol. (Celastraceae) no Brasil extra-amazônico, **Conservação e uso sustentável de Espinheira Santa**, p.11-51, 2005.
- CHIN, Y.W., BALUNAS, M.J., CHAI, H.B., KINGHORN, A.D., Drug discovery from natural sources, **AAPS Journal**, v.8, p. 239-253, 2006.
- CIPRIANI, T. R., MELLINGER, C. G., SOUZA, L. M., BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S., MARQUES, M. C. A., GORIN, P. A. J., SASSAKI, G. L., IACOMINI, M., Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*, **Carbohydrate Polymers**, v.5, p. 361-363, 2009.
- CORREA, M.P., **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil V**, Ministério da Agricultura, RJ, 152 p., 1969.

- CORSINO, J., FURLAM, M., BOLZANI, V. D. A. S., PEREIRA, A. M. S., FRANCA, S. E., Further sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus aquifolium*, **Phytochemistry**, v.49, p. 2181-2183, 1998.
- CRESTANI, S., RATTMANN, Y.D., CIPRIANI, T.R., SOUZA, L.M., ITACOMINI, M., KASSUYA, C.A.L., MARQUES, M.C.A., SILVA-SANTOS, J.E., A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus salicifolia*, **Vascular Pharmacology**, v.51, p. 57-63, 2009.
- DE SOUZA, L. M., CIPRIANI, T. R., IACOMINI, M., HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus salicifolia*, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.47, p. 59–67, 2008.
- DE ALMEIDA, M. T. R., RIOS-LUCI, C., PADRÓN, J. M., PALERMO, J. A., Anti-proliferative terpenoids and alkaloids from the roots of *Maytenus vitis-idaea* and *Maytenus spinosa*, **Phytochemistry**, v.71, p. 1741-1748, 2010.
- DELLE MONACHE, F., MARINI-BETTOLO, G.B., BERNAYS, E. Z., Isolation of insect antifeedant alkaloids from *Maytenus rigida* (Celastraceae), **Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie - Journal of Applied Entomology**, v.97, p. 406-414, 1984
- DEMAIN, A.L., Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 455-463, 1999.
- DIAS, K. S., MARQUES, M. S., MENEZES, I. A. C., SANTOS, T. C., SILVA, A. B. L., ESTEVAM, C. S.; SANT'ANA, A. E. G., PIZZA, C., ANTONIOLLI, A. R., MARCAL, R. M., Antinociceptive activity of *Maytenus rigida* stem bark, **Fitoterapia**, v.78, p. 460-464, 2007.
- DUARTE, L. P., FIGUEIREDO, R. C., DE SOUZA, G. F., SOARES, D. B. S., RODRIGUES, S. B. V., SILVA, F. C, SILVA, G. D. F., Chemical constituents of *Salacia elliptica* (Celastraceae), **Química Nova**, v. 22, n.4, p. 900-903, 2010.
- FIRAKOVA, S., STURDIKOVA, M., MUCKOVA, M., Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants, **Biologia**, v. 62, p. 251-257, 2007.
- GALM, U., SHEN, B., Natural product drug discovery: the times have never been better, **Chemistry & Biology**, v, 14, p. 1098-1104, 2007.
- GALLO, M.B.C., GUIMARAES, D.O., MOMESSO, L.S., PUPO, M.T., Natural Products from endophytic fungi, *In*: Ratul Saikai L. Bezbaruah; Tarun Ch. Bora. (Org). Microbial Biotechnology, New Delhi: New India Publishing Agency, 2007, p. 139- 168.

- GOMES, R.R., *Phomopsis* spp. Endófitos de plantas medicinais: diversidade genética e antagonismo ao fungo *Guignardia citricarpa*, Curitiba, Programa de Pós-Graduação em Genética, UFPR, **Dissertação Mestrado**, 142p., 2008.
- GONZÁLEZ, A. G., TINCUSI, B. M., BAZZOCCHI, I. L., TOKUDA, H., NISHINO, H., KONOSHIMA, T., JIMÉNEZ, I. A., RAVELO, A. G., Anti-tumor Promoting effects of sesquiterpenes from *Maytenus cuzcoina* (Celastraceae), **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.8, p. 1773-1778, 2000.
- GONZALEZ, J.G., DELLE MONACHE, G., DELLE MONACHE, F., MARINI-BETTOLO, G.B., Chuchuaska - a drug used in folk medicine in the Amazonic and Andean areas, A chemical study of *Maytenus laevis*, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 5, p. 73-77, 1982
- 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.
- GUERIN, P., Sur la presence d'un champignon dans l'ivraie, **Journal of Botanique**, v.12, p. 230–238, 1898.
- GROND, S., PAPASTAVROU, I., ZEECK, A., Novel a-L-rhamnopyranosides from a single strain of *Streptomyces* by supplement-induced biosynthetic steps, **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2002, p. 3237–3242, 2002.
- GUO, B.H., WANG, Y., SUN, X., TANG, K., Bioactive natural products from endophytes: a review, **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p. 136-142, 2008.
- HE, L., QI, Y., RONG, X., JIANG, J., YANG, Q., YAMAHARA, J., MURRAY, M., LI, Y., The Ayurvedic Medicine *Salacia oblonga* attenuates Diabetic Renal Fibrosis in rats: suppression of angiotensin II/AT1 signaling, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-12, 2011
- HUANG, T.H., HE, L., QIN, Q., YANG, Q., PENG, G., HARADA, M., QI, Y., YAMAHARA, J., ROUFOGALIS, B.D., LI, Y., *Salacia oblonga* root decreases cardiac hypertrophy in Zucker diabetic fatty rats: inhibition of cardiac expression of angiotensin II type 1 receptor, **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.10, p. 574–585, 2008
- HUSSEIN, G., NAKAMURA, N., MESELHY, M. R., HATTORIM, M., Phenolics from *Maytenus senegalensis*, **Phytochemistry**, v.50, p. 689–694, 1999.
- HUTCHINGS, A., SCOTT, A., LEWIS, A., CUNNINGHAM, A. B., Zulu Medicinal Plants: An Inventory, University of Natal Press, Pietermaritzburg, 1996.

- JELLER, A. H., SILVA, D. H. S., LIÃO, L. M., BOLZANI, V. S., FURLAN, M., Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*, **Phytochemistry**, v.65, p. 1977-1982, 2004.
- KONGSAEREE, P., PRABPAI, S., SRIUBOLMAS, N., VONGVEIN, C., WIYAKRUTTA, S., Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotricum* sp., an endophytic fungus of *Crassocephalum crepidioides*, **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 709-711, 2003.
- KUSARI, S., SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes?, **Natural Product Reports**, v.28, p.1203–1207, 2011.
- KUSARI, S., HERTWECK, C., SPITELLER, M., Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites, **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 792-798, 2012.
- LAM, K.S., New aspects of natural products in drug discovery, **Trends in Microbiology**, v. 69, p. 1273-1278, 2007.
- LUO, D. Q., WANG, H., TIAN, X., SHAO, H. J., LIU, J. K., Antifungal properties of pristimerin and celastrol isolated from *Celastrushypoleucus*, **Pest Management Science**, v.6, p. 85–90, 2005.
- MANDAL, S., MITRA, A., Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors, **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, p. 201-209, 2007.
- MIRANDA, R.R.S., DUARTE, L.P., SILVA, G.D.F., FILHO, S.A.V., CARVALHO, P.B., MESSAS, A.C., Evaluation of antibacterial activity of “Mangabarana” *Austroplenckia populnea* Rissek (Celastraceae), **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2A, p. 370-375, 2009.
- MONACHE, F.D., MELO, J.F., MARINI-BETTÓLO, G.B., GONÇALVES DE LIMA, O., D'ALBUQUERQUE, I.L., Populnonic acid, a new triterpenic acid with friedelane carbon skeleton, **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 102, p. 636-646, 1972.
- MORITA, H., HIRASAWA, Y., MUTO, A., YOSHIDA, T., SEKITA, S., SHIROTA, O., Antimitotic quinoidtriterpenes from *Maytenus chuchuhuasca*, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 1050-1052, 2008.
- NAKAGAWA, H., TAKAISHI, Y., FUJIMOTO, Y., DUQUE, C., GARZON, C., SATO, M., OKAMOTO, M., OSHIKAWA, T., Ahmed, S. U., Chemical constituents from the Colombian medicinal plant *Maytenus laevis*, **Journal of Natural Products**, v.67, p. 1919-1924, 2004.

- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M., SNADER, K.M., The influence of natural products upon drug discovery, **Natural Products Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.
- OLIVEIRA, D. M., SILVA, G. D. F., DUARTE, L. P., FILHO, S. A. V., Chemical constituents isolated from roots of *Maytenus acantophylla* Reissek (Celastraceae), **Biochemical Systematic and Ecology**, v.34, p. 661-665, 2006
- ORABI, K. Y., AL-QASOUMI, S. I., EL-OLEMY, M. M., MOSSA, J. S., MUHAMMAD, I., Dihydroagarofuran alkaloid and triterpenes from *Maytenus heterophylla* and *Maytenus arbutifolia*, **Phytochemistry**, v.58, p. 475-480, 2001.
- PASCHOALATI, S. F., STANGARLIN, J. R., LEITE, B., SCHAN-ESTRADA, K.R.F., Mecanismos de patogenicidade em fungos, **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.6, p. 1-47, 1998.
- PERESTELO, N. R., JIMÉNEZ, I. A., TOKUDA, H., HAYASHI, H., BAZZOCCHI, I. L., Sesquiterpenes from *Maytenus jelskii* as potential cancer chemopreventive agents, **Journal of Natural Products**, v.73, p. 127–132, 2010.
- PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews J, Hirano S.S. (eds) Microbial ecology of leaves. Springer, New York, p. 179–197, 1991.
- PETRINI, O., SIEBER, T.N., TOTI, L., VIRET, O., Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi, **Natural Toxins**, v.1, p. 185-196, 1992.
- PUPO, M.T., GUIMARAES, D.O., FURTADO, N.A.J.C, BORGES, W.S., Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds, In: Carlton A. Taft, (Org), Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry, Kerala: Research Signpost, 2006, 51-78.
- RATEB, M.E., HOUSSEN, W.E., HARRISON, W.T., DENG, H., OKORO, C.K., ASENJO, J.A., ANDREES, B.A., BULL, A.T., GOODFELLOW, M., EBEL, R., JASPARS, M., Diverse metabolic profiles of a *Streptomyces* strain isolated from a hyper-arid environment, **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 1965–1971, 2011.
- REDECKER, D., KODNER, R., GRAHAM, L. E., Glomalean fungi from the Ordovician, **Science**, v.289, p.1920-1921, 2000.
- REYES, C. P. NÚÑEZ, M. J., JIMÉNEZ, I. A., BUSSEROLLES, J., ALCARAZ, M. J., BAZZOCCHI, I. L., Activity of lupine triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E₂, **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.14, p. 1573-1579, 2006.

- RODRIGUES, V.G., Estudo fitoquímico e atividade biológica de raízes de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG, **Dissertação de Mestrado**, 170p., 2011.
- RODRIGUES, V.G. , DUARTE, L.P., SILVA, G.D.F., SILVA, F.C., GÓES, J.V., TAKAHASHI, J.A., PIMENTA, L.P.S., FILHO, S.A.V., Evaluation of antimicrobial activity and toxic potential of extracts and triterpenes isolated from *Maytenus imbricata*, **Química Nova**, v.35, p.1375-1380, 2012.
- ROSA, L.H., GONÇALVES, V.N., CALIGIORNE, R.B., ALVES, T.M.A., RABELLO, A., SALES, P.A., ROMANHA, A.J., SOBRAL, M.E.G., ROSA, C.A., ZANI, C.L. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41p.114–122, 2010.
- SANNOMIYA, M., VILEGAS, W., RASTRELLI, L., PIZZA, C., A flavonoid glycoside from *Maytenus aquifolium*, **Phytochemistry**, v. 49, p. 237–239, 1998.
- SANTOS, V. L., COSTA, V. B. M., AGRA, M. F., SILVA, B. A., BATISTA, L. M., Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.3, p. 336-342, 2007.
- SANTOS FILHO, F.C., Análise dos constituintes fixos e voláteis de fungos endofíticos dos gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e de suas plantas hospedeiras, São Carlos, Departamento de Química, UFSCar, **Dissertação de Mestrado**, 180p., 2010,
- SCHERLACH, K.,HERTWECK, C., Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms, **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 7, p.1753–1760, 2009.
- SCHULZ, B., ROMMERT, A.K., DAMMANN, U., AUST, H.J., STRACK, D., The endophyte-host interaction: a balanced antagonism, **Mycological Research**, v.103, p.1275–1283, 1999.
- SCHULZ, B., BOYLE, C., DRAEGER, S., ROMMERT, A.K., KROHN, K., Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolite. **Mycological Research**, v. 106, p. 996-1004, 2002.
- SCHULZ, B.J.E., BOYLE, C.J.C., What are endophytes? In *Microbial Root Endophytes*, B.J.E. Schulz, C.J.C. Boyle, and T.N. Sieber, eds. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 1–13, 2006.
- SHIROTA, O.,TAMEMURA, T., MORITA, H., TAKEYA, K., ITOKAWA, H., Triterpenes from Brazilian medicinal plant chuchuhauasi (*Maytenus krukovii*), **Journal of Natural Products**, v.59, p. 1072–1075, 1996.

- SILVA, F. C. Estudo fitoquímico e da atividade biológica do extrato hexânico de galhos de *Maytenus gonoclada* (Celastraceae). Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx, UFMG, **Dissertação de Mestrado**, 136p., 2011.
- SILVA, G. D. F., SILVA, S. R. S., BARBOSA, L. C. A., DUARTE, L. P., EIBEIRO, S. M. R., QUEIROZ, J. H., VIEIRA FILHO, S. A., OILIVEIRA, M. L. R. Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart. Celastraceae, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2B, p. 530- 536, 2009.
- SILVA, S. R. S., DE FÁTIMA SILVA, G.D. , BARBOSA, L. C. A., DUARTE, L. P., VIEIRA FILHO, S. A., Lupane Pentacyclic Triterpenes Isolated from Stems and Branches of *Maytenus imbricata* (Celastraceae), **Helvetica Chimica Acta**, v.88, p.1102-1109, 2005.
- SILVA, S. R. S. Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico e herbicida de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx, UFMG, **Tese de Doutorado**, 226p., 2007a.
- SILVA, S. R. S., SILVA, G. D. F., BARBOSA, L. C. A., DUARTE, L. P., KING-DIAZ, B., ARCHUNDIA-CAMACHO, F., LOTINA-HENNSSEN, B., Uncoupling and inhibition properties of 3,4-seco-friedelan-3-oic acid isolated from *Maytenus imbricata*, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.87, p. 109-114, 2007b.
- SIMMONS, M. P., CAPPA, J. J., ARCHER, R. H., FORD, A. J., EICHSTEDT, D., CLEVINGER, C.C., Phylogeny of the Celastreae (Celastraceae) and the relationships of *Catha edulis* (Kat) inferred from morphological characters and nuclear and plastid genes, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.48, p. 745-757, 2008.
- SNYDER, B.A., NICHOLSON, R.L., Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress, **Science**, v. 248, p. 1637, 1990.
- SOSA, S., MORELLI, C. F., TUBARO, A., CAIROLI, P., SPERANZA, G., MANITTO, P., Anti-inflammatory activity of *Maytenus senegalensis* root extracts and of maytenoic acid, **Phytomedicine**, v.14, p. 109–114, 2007.
- SOUZA, L. M., CIPRIANI, T. R., SANT’ANA, C. F., IACOMINI, M., GORIN, P. A. J. SASSAKI, G. L., Heart-cutting two-dimensional (size exclusion x reversed phase) liquid chromatography–mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifoli*,. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 99–105, 2009.
- SOUZA, S. A. M., CATTELAN, L. V., VARGAS, D. P. V., PIANA, C. F. B., BOBROWSKI, V. L., ROCHA, B. H. G., Atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de Espinheira

- Santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.), **Publicatio UEPG, Ciências Biológicas e da Saúde**, v.11(3/4), p. 7-14, 2005.
- SPIVEY, A. C., WESTON, M., WOODHEAD, S., Celastraceae sesquiterpenoids: biological activity and synthesis, **Chemical Society Reviews**, v.31, p. 43-59, 2002.
- STIERLE, A., STROBEL, G., STIERLE, D., GROTHAUS, P., BIGNAMI, G., The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*, **Journal of Natural Products**, v. 58, p. 1315–1324, 1995.
- STROBEL, G.A., Rain forest endophytes and bioactive products, **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 315-333, 1996.
- STROBEL, G.A., Rainforest endophytes and bioactive products, **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 315-333, 2002.
- STROBEL, G., DAISY, B., Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products, v. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 491-502, 2003.
- TAN, R.X., ZOU, W.X., Endophytes: a rich source of functional metabolites, **Natural Product Reports**, v. 18, p. 448-459, 2001.
- TIBERTI, L. A., YARIWAKE, J. H., NDJOKO, K., HOSTETTMANN, K., Short communication Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis, **Journal of Chromatography B**, v.846, p. 378–384, 2007.
- VALACHOVA, M., MUCKOVA, M., STURDIKOVA, M., Metabolity endofyticky mikroorganizm ovako biologicky ucinnelatky, **Chemicke Listy**, v. 101, p. 486-494, 2007.
- VELLOSA, J. C. R., KHALIL, N. M., FORMENTON, V. A. F., XIMENES, V. F., Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark, **Fitoterapia**, v.77, p. 243-244, 2006.
- VIEIRA, M.L.A., HUGHES, A.F.S., GIL, V.B., VAZ, A.B.M., ALVES, T.M.A., ZANI, C.L., ROSA, C.A., ROSA, L.H., Diversity and antimicrobial activities of the fungal endophyte community associated with the traditional Brazilian medicinal plant *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae), **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58p.1–13, 2012.
- WANG, J., LI, G., LU, H., ZENG, Z., HUANG, Y., SU, W., Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, p. 249–253, 2000.
- YU, T.W., BAI, L., CLADE, D., HOFFMANN, D., TOELZER, S., TRINH, K.Q., XU, J., MOSS, S.J., LEISTNER, E., FLOSS, H.G., The biosynthetic gene cluster of the

maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA , v.99, p.7968–7973, 2002.

ZHANG, H.W., SONG, Y.C., TAN, X., Biology and chemistry of endophytes, **Natural Product Report**, v. 23, p. 753-771, 2006.

3. OBJETIVOS

Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi dar continuidade ao estudo químico-biológico de constituintes de *Maytenus imbricata*.

Específicos

Inicialmente teve-se como objetivos específicos:

- Purificar frações obtidas de extratos de folhas de *Maytenus imbricata*, por métodos cromatográficos (CCD, CC) visando a obtenção de constituintes com alto grau de pureza
- Identificar os constituintes por métodos espectroscópicos (RMN de ^1H e de ^{13}C e EM)
- Efetuar o isolamento de fungos endofíticos de *M. imbricata*
- Obter extratos a partir das colônias de fungos isoladas
- Analisar por CG-EM os extratos de fungos endofíticos isolados de *M. imbricata*

4. PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental do presente trabalho envolve duas linhas de atuação, sendo uma relacionada ao estudo químico de frações anteriormente isoladas de diferentes partes de *M. imbricata*, por Silva (2007), durante a obtenção de sua tese de doutorado. E, o isolamento, caracterização química e identificação de fungos endofíticos de *M. imbricata* (Fig. 4.1).

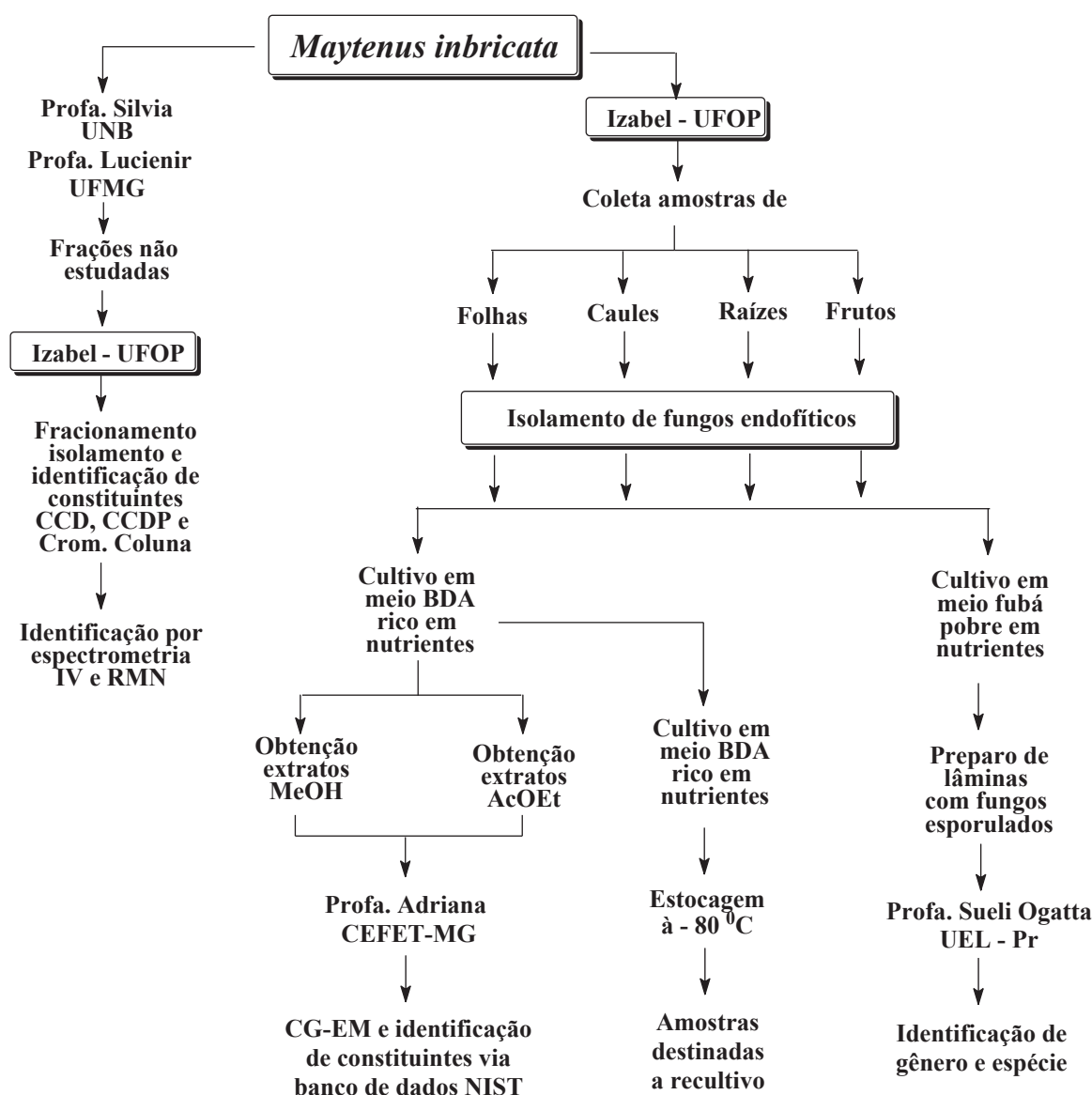


Figura 4.1: Esquema do processo de execução do estudo químico de frações ainda não estudadas e do isolamento, caracterização química, identificação e estocagem de fungos endofíticos isolados de *M. imbricata*.

4.1. Materiais e instrumentos

Elaboração das frações de *Maytenus imbricata*

Métodos cromatográficos

Para realização das cromatografias em camada delgada (CCD) foi utilizada sílica gel 60G (Merck) em placa de vidro de 0,25 mm de espessura (para CCD analítica) e 0,50 mm de espessura (para CCD preparativa). As placas com sílica foram ativadas em estufa (Biopar) a 100 °C. Nas cromatografias em coluna foram utilizadas colunas de vidro, empacotadas com fase estacionária sílica gel 60 (Vetec) de tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh).

Solventes e reagentes

Os solventes utilizados como eluente nos métodos cromatográficos ou para solubilizar as amostras foram: hexano (Hex), diclorometano (CH₂Cl₂), clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) e ácido acético glacial. Todos os solventes utilizados são das marcas Impex ou Vetec.

Os solventes utilizados para produção de extratos de fungos endofíticos isolados da planta *M. imbricata* foram: acetato de etila e metanol.

Para a obtenção de cromatoplasmas foram utilizados como reveladores a solução (1:1) de ácido perclórico (Proquimios) a 3 % em água e vanilina (Isofar) a 1 % em etanol; vapor de iodo (I₂) (Synth) e/ou identificação por irradiação com luz ultravioleta.

Espectrometria de RMN

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (¹H) e de carbono (¹³C) mono e bidimensional (1D e 2D) foram obtidos em espectrômetro Bruker *Avance* DPX-200 ou DRX-400, ambos pertencentes ao Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química da UFMG, operando a 300 K. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm, usando tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna ($\delta_H = \delta_C = 0$). As constantes de acoplamento (J) foram dadas em Hertz (Hz).

Cromatogramas obtidos por CG-EM

Os extratos dos fungos endofíticos isolados de *M. imbricata* por CG-EM foram analisados em cromatógrafo com detector de massas Agilent CG 7890/MSD 5975, equipado com torre de injeção automática e amostrador automático. Os parâmetros usados foram: coluna HP-5MS, 30 m, 0.25 mm de diâmetro interno, com fase estacionária de 0.25 µm espessura e He como fase móvel. Temperatura no injetor: 250 °C. Temperatura na interface: 280 °C. Programa de temperatura do forno: tempo de equilíbrio de 0.5 min, 80 °C durante 1 min, seguido de 10 °C mL min⁻¹ até 290 °C, mantendo isotérmico a 290 °C, durante 10 min; tempo total de corrida de 32 min. Para processamento dos cromatogramas obtidos do cromatógrafo a gás foi utilizado o banco de dados do National Institute of Standards and Technology (NIST).

Difratometria de Raios-X de sólido

Dados de difratometria de raios-X de sólido foram coletados utilizando difratômetro Siemens D5000, operado a 40KV, 30mA, utilizando Cu Ka ($\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$) acoplado a monocromador de grafite, escaneado sobre variação angular de 4-40° (2 θ) tamanho de espaçamento de 0.01° (2 θ) e com constante de tempo de 15 s passo⁻¹. A amostra foi submetida a velocidade de rotação de 60 ciclos por minuto para reduzir alguma orientação preferencial e minimizar efeitos de rugosidade. A matriz final foi averiguada em relação a três *scans* independentes.

Coleta e identificação do material vegetal para isolamento de fungos endofíticos

Folhas, frutos, caules, raízes de *Maytenus imbricata* foram coletadas no Morro do Santana, município de Ouro Preto, Minas Gerais no mês de julho de 2012. A região de coleta está localizada a 20°22'11.02"S (latitude) e 43°30'22.81"O (longitude) a 1387,5 m de altitude.

Uma exsiccata do material encontra-se depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob o número 27780, devidamente identificada pela botânica Dra. Rita Maria de Carvalho Okano.

Isolamento dos fungos endofíticos de *Maytenus imbricata*

Para o isolamento dos fungos endofíticos de folhas, frutos, caules e raízes de *M. imbricata* utilizou-se água destilada, álcool 70 %, hipoclorito de sódio, papel de filtro, pinça, béqueres, lâminas de bisturi (nº 12), placas de Petri (100 x 20 mm), meio de cultura Agar batata dextrosado (BDA) (Himedia), cabine de segurança biológica de classificação A2 (Biosafe), autoclave (Primatec) e estufa de cultivo biológico (Biociclo).

Preservação dos fungos endofíticos isolados

Os fungos isolados foram preservados para estudo futuros. Para a realização das técnicas de preservação foram utilizados frascos de penicilina com tampas de borracha, pipeta de Pasteur, lacres de alumínio, tubos de 2 ml (Eppendorf), lâminas de bisturi (nº 12), béqueres, erlenmeyers, água estéril, glicerol (Vetec), autoclave (Primatec), cabine de segurança biológica de classificação A2 (Biosafe), ultrafreezer – 80 °C (Thermo Scientific).

Identificação dos fungos endofíticos

Para identificação microscópica dos fungos endofíticos isolados foram utilizados meio de cultura com baixo teor de nutrientes, composto por Agar (Dinâmica) e fubá (Pachá), lâminas e lamínulas de vidro, pinça, algodão, placas de Petri (100 x 20 mm), suporte de vidro, solução azul de Lactofenol, água destilada estéril, esmalte transparente (Risqué), autoclave (Primatec), cabine de segurança biológica de classificação A2 (Biosafe), estufa (Biociclo), microscópio óptico (Olimpus).

Cultivo dos fungos endofíticos isolados, para produção de extratos

Para produção de extratos dos fungos isolados de *M. imbricata* foram utilizados placas de Petri (150 x 20 mm), meio de cultura BDA (Himedia), frascos de Erlenmeyer, algodão, funil, frascos de penicilina (10 mL) com tampas de borracha, estufa (Biociclo) e os solventes acetato de etila (Impex) e metanol (Impex). Para concentração dos extratos foram utilizados evaporador rotatório (Fisatom) e estufa de secagem (Fanem).

4.2. Métodos utilizados no estudo fitoquímico de *Maytenus imbricata*

Estudo químico de frações oriundas de extratos de *Maytenus imbricata*

Frações previamente obtidas por Sílvia Ribeiro de Souza e Silva, em sua tese de doutorado, foram submetidas à tentativa de refinamento. As frações escolhidas foram aquelas ainda não trabalhadas no estudo anteriormente realizado por Silva (2007) e que possuíam massa suficiente para os estudos subsequentes.

Fração C_{5/67-105}

A fração C_{5/67-105} é originária do extrato hexânico (14,20 g) obtido de galhos e caules de *M. imbricata*, por Silva (2007). Este extrato foi submetido à cromatografia em coluna (CC) de sílica gel 60 (70-230 Mesh), eluída com benzeno, Hex: AcOEt (7:3), Hex:AcOEt (1:1), AcOEt, AcOEt:MeOH (7:3) e MeOH, resultando em 11 grupos de frações, selecionadas de acordo com o perfil cromatográfico. A fração C_{5/67-105} foi originária do grupo 5 (1,13 g) e se apresentou como um material pastoso e de cor amarelada (102 mg), solúvel em CH₂Cl₂ (Silva, 2007).

Neste trabalho esta fração foi submetida à CCD analítica objetivando a visualização de constituintes presentes nela. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 G e como fase móvel Hex:AcOEt (7:3). Após a eluição, a placa foi revelada utilizando luz ultravioleta (UV), vapor de iodo ou vanilina em ácido perclórico. Nenhum constituinte foi revelado com a utilização de luz UV. Por outro lado, com os sistemas de revelação vapor de iodo e solução ácida de vanilina foram reveladas 5 manchas. Em função disso, a fração IM5 foi submetida a CCD preparativa objetivando-se separar as 5 manchas. O sistema de eluição escolhido foi o mesmo utilizado na CCD analítica. As 5 manchas visualizadas foram raspadas da placa, posteriormente filtradas em papel de filtro utilizando-se CH₂Cl₂ como solvente filtrante e recolhidas em frascos separados. Foi feita nova CCD analítica para confirmar a pureza das amostras e após este procedimento foi possível confirmar que das 5 manchas separadas, duas foram consideradas como puras. As frações puras foram pesadas, rotuladas como C51 (4,2 mg) e C52 (13,6 mg) e enviadas para obtenção de espectros de RMN de ¹H e de ¹³C.

Fração C_{16/5-6}

A fração C_{16/5-6} é originária de extrato hexânico (5,2 g) de folhas de *M. imbricata*. Este extrato foi submetido a CC, usando sílica gel 60 (70-230 Mesh) e os eluentes hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) puros ou em misturas de polaridades crescentes. Este processo resultou em 25 frações que foram reunidas em 11 grupos. A fração C_{16/5-6} foi originada a partir do grupo 10, apresentando-se como um sólido branco (14,6 mg) solúvel em acetato de etila (Silva, 2007).

Neste trabalho, a fração C_{16/5-6} foi submetida a cromatografia de camada delgada de sílica gel 60 G (CCD) analítica objetivando a visualização de substâncias contidas na amostra. A fase móvel escolhida foi CH₂Cl₂: AcOEt (4:6). Após a eluição a placa foi revelada por irradiação com luz ultravioleta (UV), seguido de exposição a vapor de iodo. Nos dois sistemas de revelação foi visualizada somente uma mancha, indicando pureza da amostra. A mesma foi pesada, rotulada como P56 (13,0 mg) e enviada para obtenção de espectros de RMN de ¹H e de ¹³C.

Fração C_{16/7-8}

A fração C_{16/7-8} é originária de extrato hexânico de folhas de *M. imbricata*, mesmo extrato da fração C_{16/5-6}. A fração C_{16/7-8}, originada a partir do grupo 10, trata-se de um sobrenadante, obtido por Silva (2007), que não foi trabalhado em estudos anteriores.

A fração C_{16/7-8} apresentou-se como um material pastoso de cor amarelada (430 mg) parcialmente solúvel em acetato de etila. O sobrenadante foi recolhido para realização de uma CCD analítica para visualizar substâncias contidas na parte solúvel em acetato de etila. A fase móvel e estacionária escolhidas foram CH₂Cl₂:AcOET (1:1) e sílica gel 60 G, respectivamente. Após a eluição a placa foi revelada sob luz ultravioleta (UV) e, em seguida, por vapor de iodo. Nos dois sistemas de revelação foi visualizada somente uma mancha, indicando pureza da amostra. A mesma foi pesada e rotulada como S78 (203,3 mg) e enviada para a obtenção de espectros de RMN de ¹H e de ¹³C.

A parte insolúvel em acetato de etila foi solubilizada em CH₂Cl₂ e submetida a CCD analítica. A fase móvel e estacionária escolhidas foram CH₂Cl₂:AcOET (1:1) e sílica gel 60 G, respectivamente.

Nos dois sistemas de revelação foi visualizada somente uma mancha, indicando pureza da amostra. A mesma foi pesada e rotulada P78 (208,4 mg) e enviada para obtenção de espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Fração C_{16/19-20}

A fração C_{16/19-20} é originária de extrato hexânico de folhas de *M. imbricata*, mesmo extrato que originou as frações C_{16/5-6} e C_{16/7-8}. A fração C_{16/19-20}, assim como as frações C_{16/5-6} e C_{16/7-8}, foi originada a partir do grupo 10, obtida por Silva (2007).

A fração C_{16/19-20} apresentou-se como um sólido branco esverdeado (380 mg) solúvel em CH₂Cl₂. Neste trabalho, a fração C_{16/19-20} foi submetida a CCD analítica com o objetivo de visualizar as substâncias contidas na amostra. A fase móvel e estacionária escolhidas foram CHCl₃:AcOET (8:2) e sílica gel 60 G, respectivamente. Após a eluição a placa foi revelada sob luz ultravioleta (UV), vapor de iodo e também por solução de vanilina em ácido perclórico. Nos três sistemas de revelação foram visualizadas várias manchas, indicando a necessidade de se preparar uma CC para separação de algum de seus constituintes, principalmente os majoritários.

A CC foi realizada utilizando-se como fase móvel CHCl₃:AcOET em eluição por gradiente de polaridade e como fase estacionária, sílica gel 60 de tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh). Foram recolhidas 56 frações, que depois de submetidas à CCD analítica foram agrupadas de acordo com perfil cromatográfico, obtendo-se 8 grupos. Destes grupos, dois foram considerados puros sendo pesados, rotulados como 21C (35,0 mg) e 29C (40,0 mg) e, em seguida, enviados para obtenção de espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Fração C_{16/21-23}

A fração C_{16/21-23} é originária de extrato hexânico de folhas de *M. imbricata*, mesmo extrato que originou as frações C_{16/5-6}, C_{16/7-8} e C_{16/19-20}. A fração C_{16/21-23} trata-se de um sobrenadante, obtido por Silva (2007), que não foi trabalhado anteriormente.

A fração C_{16/21-23} (794 mg) apresentou-se como um sólido verde e pegajoso solúvel em AcOEt. Este sólido foi submetido, neste trabalho, a CCD analítica objetivando visualizar substâncias contidas na amostra.

A fase móvel e estacionária escolhidas foram $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (7:3) e sílica gel 60 G, respectivamente. Após a eluição a placa foi revelada sob luz ultravioleta (UV), vapor de iodo e também por solução de vanilina em ácido perclórico. Nos três sistemas de revelação foram visualizadas várias manchas, indicando a necessidade de se preparar uma CC para separação de constituintes.

A CC foi realizada utilizando-se como fase móvel Hex:AcOEt, AcOEt e AcOEt: MeOH em eluição por gradiente e como fase estacionária, sílica gel 60 de tamanho de partícula 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh). Foram recolhidas 70 subfrações. As mesmas foram submetidas à CCD analítica e agrupadas de acordo com perfil cromatográfico, obtendo-se 15 grupos. A maioria destes grupos de frações apresentou várias manchas, com Rf muito próximo umas das outras. Por se tratar de misturas complexas e em função da quantidade disponível, considerou-se apenas as subfrações reunidas 16 e 17, como sendo viável para prosseguimento dos estudos. Através de CCD analítica, detectou-se neste grupo apenas dois constituintes, um de Rf 0,3 e outro de Rf 0,5. Assim, a amostra foi posteriormente submetida a CCD preparativa objetivando-se separar as 2 manchas. O sistema de eluição escolhido foi $\text{CHCl}_3 : \text{AcOEt}$ (7:3). As 2 manchas visualizadas foram raspadas da placa e posteriormente filtradas em papel de filtro utilizando AcOEt como solvente filtrante e recolhidas em frascos separados. Foi feita nova CCD analítica para confirmar a pureza das amostras e após este procedimento foi possível confirmar que as mesmas estavam puras. As amostras puras foram pesadas, rotuladas como IC1 (46,9 mg) e IC2 (52,1 mg) e enviadas para obtenção de espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .

4.3 Metodologia de estudo de fungos endofíticos de *M. imbricata*

Coleta e preparo do material vegetal para isolamento dos fungos endofíticos

Folhas, frutos, raízes e caules foram coletados de vários exemplares de *M. imbricata*. As partes coletadas foram aquelas que apresentavam aspecto saudável (sem manchas ou lesões visíveis a olho nú). O material foi acondicionado em saco plástico e imediatamente conduzido para o laboratório. Folhas, frutos, raízes e caules foram submetidos à lavagem com sabão e água corrente, para eliminar o excesso de microrganismos epifíticos assim como resíduos de terra e poeira.

Após este procedimento cada material foi cuidadosamente fragmentado utilizando um bisturi para cada um deles. Os respectivos fragmentos (2 mm) foram imediatamente submetidos a um processo de desinfecção mais refinado. Para tal, os fragmentos foram submersos em etanol 70 % (1 min.), hipoclorito de sódio (3 min.) seguido de lavagem em água estéril destilada (2 min.). A água de lavagem foi plaqueada em BDA para verificar se o material foi devidamente esterilizado. Os fragmentos foram colocados em papel de filtro esterilizado para secagem. Este procedimento está de acordo com protocolo sugerido por ROSA (2010), aqui modificado.

Isolamento dos fungos endofíticos

Após esterilização e secagem, os fragmentos foram cuidadosamente colocados em placas de Petri (35 x 10 mm) contendo meio de cultura BDA sólido. Em cada placa foi colocada apenas um fragmento do material vegetal. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C até o crescimento dos fungos. Estes foram repicados em novo meio de cultura BDA e incubados por 15 dias em estufa a 28 °C para a obtenção de culturas puras. Foram obtidas 44 colônias de fungos isolados. As placas com culturas puras foram estocadas em geladeira a 8 °C.

Preservação dos fungos endofíticos

Visando estudos posteriores, os fungos isolados foram submetidos a dois processos de preservação, um pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939) e outro por criopreservação (CARVALHO, 2012), ambos modificados.

Método de Catellani

Em cabine de segurança biológica, pequenos fragmentos de cada fungo isolado foram transferidos para frascos de penicilina contendo água destilada estéril. Os frascos foram vedados com tampa de borracha e lacre de alumínio e mantidos a temperatura ambiente em local seco e arejado (CASTELLANI, 1939).

Criopreservação

Pequenos fragmentos de fungos foram transferidos para tubos de Ependorff (2 ml) contendo solução de glicerol 15 % estéril. Os tubos foram congelados em ultrafreezer a -80°C . Este procedimento está de acordo com protocolo sugerido por ROSA (2010), aqui modificado.

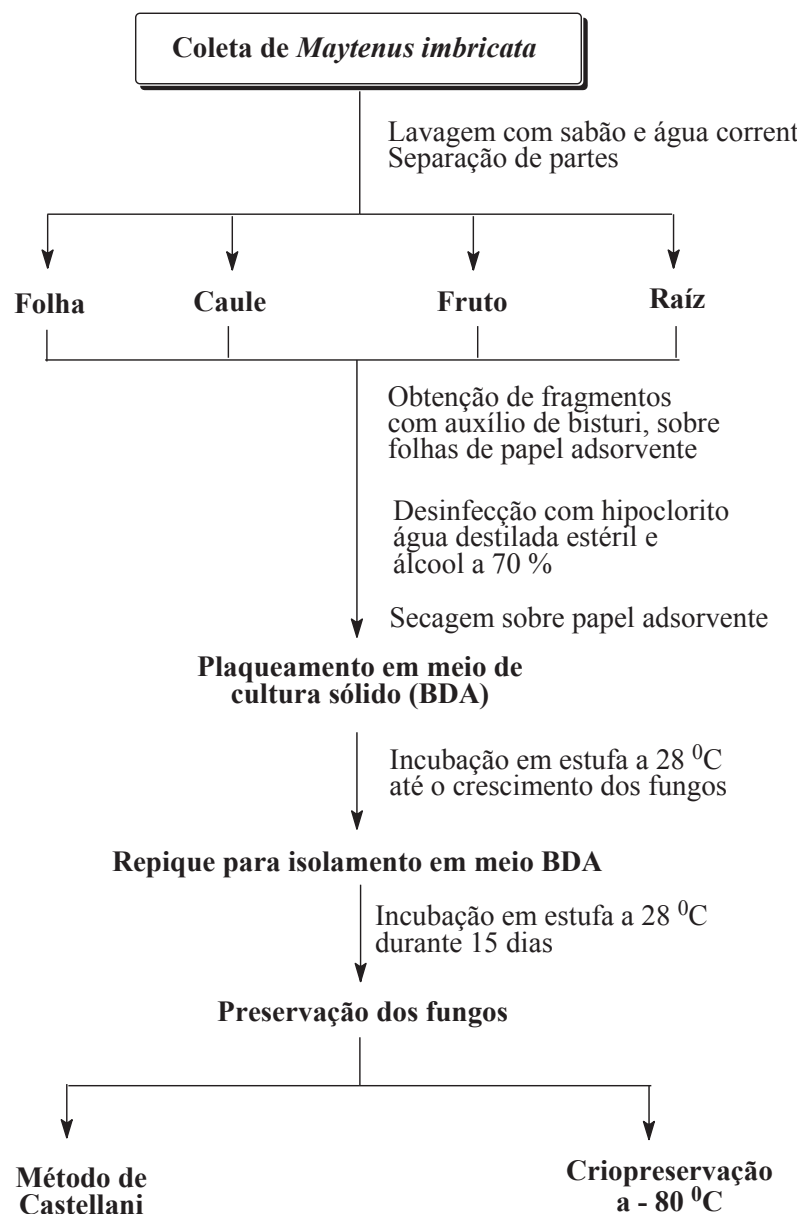


Figura 4.2: Esquema do processo de coleta de *M. imbricata*, preparo e isolamento de fungos endofíticos.

Técnica do microcultivo para identificação dos fungos endofíticos

Para a identificação da espécie, foi realizado a técnica do microcultivo (adaptada da Anvisa) em um ambiente dentro de placas de Petri, adequado para o crescimento de fungos aderidos em lâmina de microscópio. Para isto foi aqui idealizado e montado dentro da placa de Petri, contendo um chumaço de algodão e um suporte de vidro e, sobre ele, uma lâmina e lamínula (Fig. 4.3). Esta montagem foi esterilizada em autoclave.

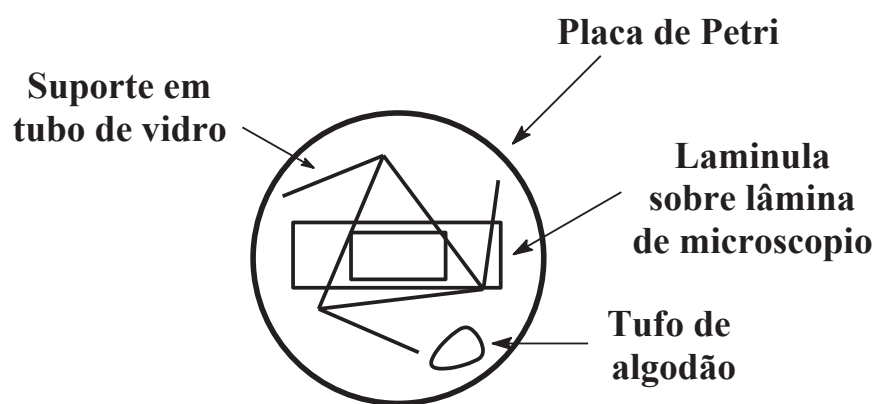


Figura 4.3: Esquema da montagem utilizada para o microcultivo de fungos endofíticos.

Foi feito um meio de cultura sólido contendo baixo teor de nutrientes (Ágar Fubá), para estimular a esporulação dos fungos. O meio foi composto de 15 g de ágar e 50 g de fubá em 1000 mL de água destilada. Um pequeno bloco deste meio (menor que as dimensões da lamínula) foi colocado acima da lâmina. Esporos e hifas dos fungos anteriormente isolados foram semeados nas laterais do bloco de Ágar Fubá e acima deste bloco foi colocada uma lamínula. Para manter o ambiente úmido, utilizando uma pipeta de Pasteur foi adicionado água estéril ao algodão até que este ficasse encharcado. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C, por 15 dias.

Após os 15 dias de crescimento foram confeccionados as lâminas para identificação dos fungos por microscopia óptica. O bloco de meio de cultura foi removido das lâminas. Após essa remoção, observaram-se hifas dos fungos aderidas na lâmina. Foi adicionada 1 gota de azul de Lactofenol na região da lâmina com hifas e a mesma foi coberta por uma lamínula. As laterais da lamínula foram vedadas com esmalte transparente.

As lâminas de microcultivo foram enviadas para a Dra. Sueli Fumie Ogatta, da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, para exame por microscopia ótica e consequente identificação dos fungos endofíticos.

Preparo dos extratos dos fungos endofíticos

Para confecção dos extratos, amostras de cada fungo foram transferidas para placas de Petri (150 x 25 mm) em meio de cultura BDA sólido e incubados em estufa a 28 °C por 15 dias. Após este período, os fungos foram fragmentados e transferidos juntamente com o meio de cultura para frascos de Erlenmeyers e submetidos a extração por maceração com metanol e também com acetato de etila. Após a maceração cada extrato foi filtrado em papel de filtro e concentrado em rotavapor para posterior análise (Fig. 4.4).

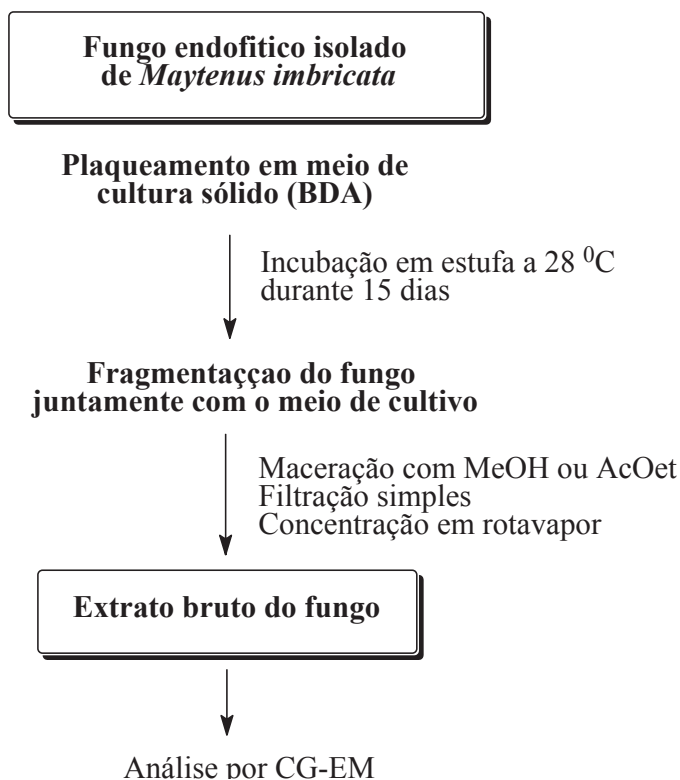


Figura 4.4: Esquema do preparo de extratos de fungos endofíticos isolados de *M. imbricata*, para análise por CG-EM.

O mesmo procedimento de extração com metanol ou acetato de etila foi aplicado a uma amostra de meio de cultura BDA sólido, incubado em estufa a 28 °C por 15 dias.

Os extratos de cada fungo endofítico foram enviados para a Dra. Adriana Akemi Okuma, do Centro Federal de Ensino Tecnológico, Belo Horizonte, Minas Gerais, para análise por CG-EM. Os espectros de massas dos principais picos de cada cromatograma foi comparado com banco de dados NIST para a identificação de constituintes produzidos pelos fungos endofíticos.

REFERÊNCIAS

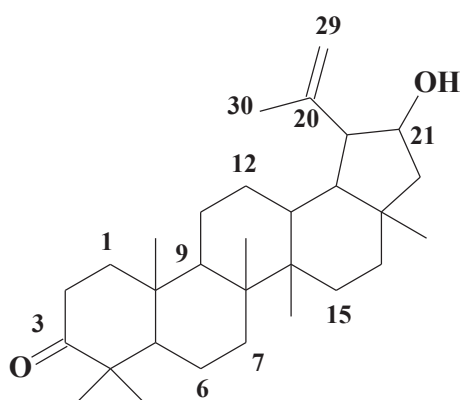
- CARVALHO, C.R., GONÇALVES, V.N., PEREIRA, C.B., JOHANN, S., GALLIZA, I.V., ALVES, T.M.A., RABELLO, A., SOBRAL, M.E.G., ZANI, C.L., ROSA, C.A., ROSA, L.H., The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (*Fabaceae*) from the Brazilian savannah, **Symbiosis**, v. 57, p. 95-107, 2012.
- CASTELLANI, A., Viability of some pathogenic fungi in distilled water, **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.42, p. 225-226, 1939.
- ROSA, L.H., GONÇALVES, V.N., CALIGIORNE, R.B., ALVES, T.M.A., RABELLO, A., SALES, P.A., ROMANHA, A.J., SOBRAL, M.E.G., ROSA, C.A., ZANI, C.L., Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p.114–122, 2010.
- SILVA, S. R. S. Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico e herbicida de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx, UFMG, **Tese de Doutorado**, 226p., 2007.

www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/.../mod_7_2004.pdf (Acessado em 22-Julho-2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação das substâncias isoladas de frações de *Maytenus imbricata*

Constituinte 21C: 21-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona



O constituinte 21C (35 mg) foi isolado, por CCD preparativa, na forma de um sólido branco amorfo e bastante solúvel em CHCl_3 . Atavés de CCD utilizando fase móvel de diferentes polaridades, foi observado somente um componente. Em função disso, esta amostra foi enviada para análise por RMN (CDCl_3 , 200 MHz).

No espectro de RMN de ^1H (Fig. 5.1) foram observados 6 simpletos em δ_{H} 1,071, 1,057, 1,025, 0,953, 0,928 e em δ_{H} 0,793 indicativos de hidrogênios metílicos e sinais múltiplos entre δ_{H} 2,50 e δ_{H} 1,36 atribuídos a hidrogênios metilênicos e metínicos. Neste espectro também foi observado um multiplete entre δ_{H} 4,11 e δ_{H} 3,90, correspondente a grupo metilênico contendo um grupo hidroxila e um duplo duplete referente aos hidrogênios olefínicos em δ_{H} 4,94 e 4,90 (SILVERSTEIN, 2005) (Fig. 5.2).

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 5.3) e do subespectro DEPT-135 (Fig. 5.4) foi possível identificar 27 sinais de carbono (Tabela 5.1), sendo 5 metílicos, 12 metilênicos, 3 metínicos e 7 não hidrogenados característicos de triterpenos da série lupano (MAHATO e KUNDU, 1994).

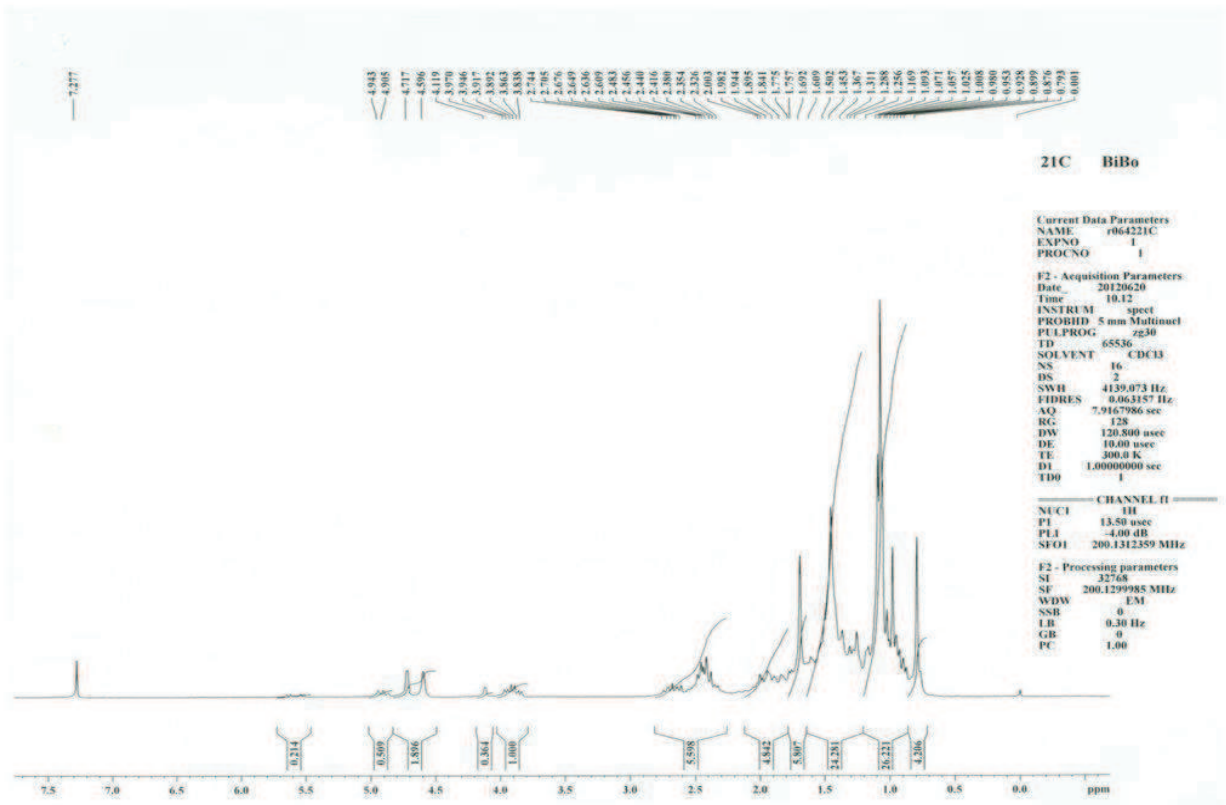


Figura 5.1: Espectro de RMN de ^1H de 21C (CDCl_3 , 200 MHz).

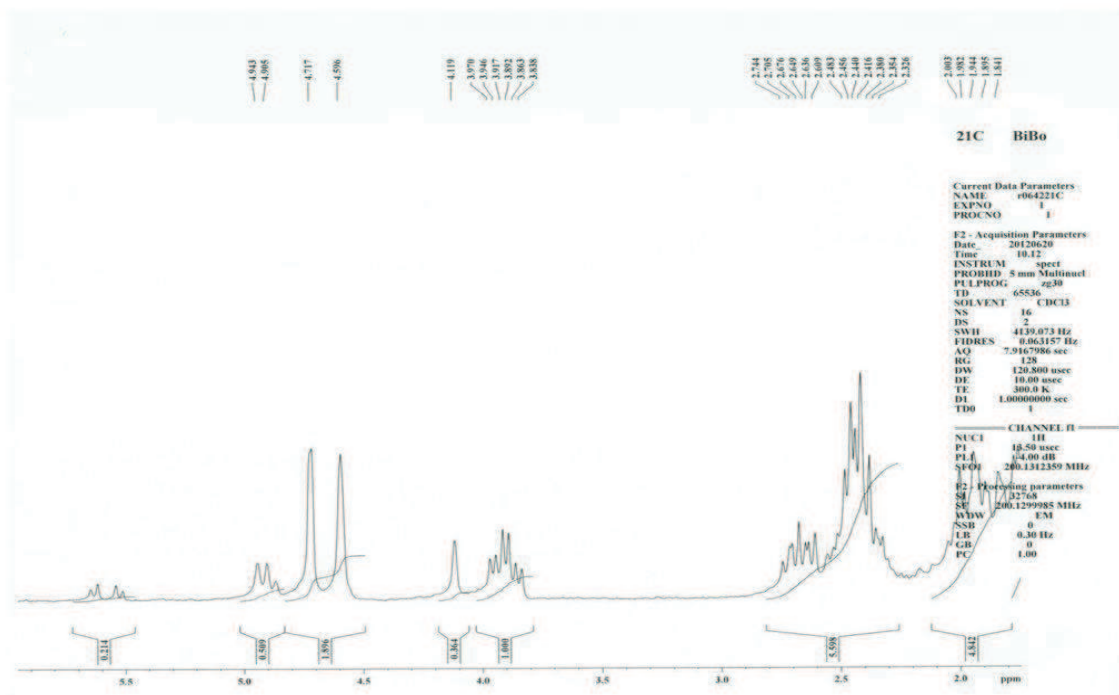


Figura 5.2: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 21C, entre δ_{H} 0,60 e δ_{H} 2,80.

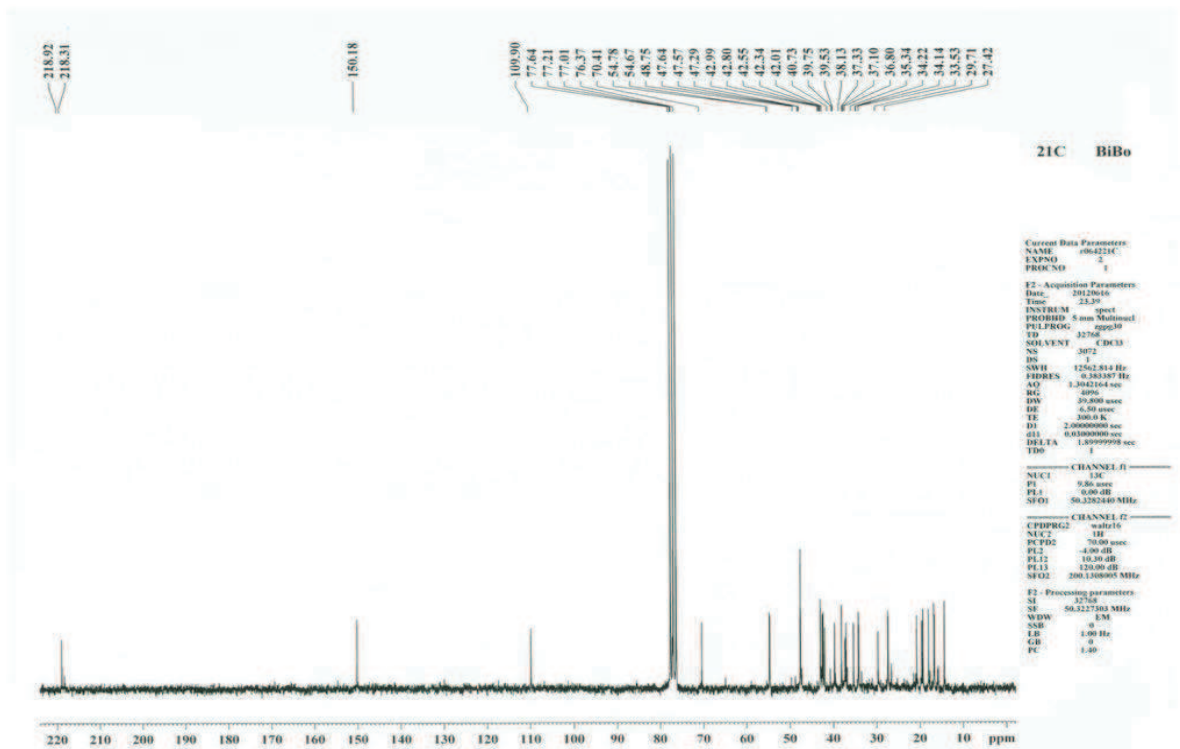


Figura 5.3: Espectro de RMN de ^{13}C de 21C (CDCl_3 , 50 MHz).

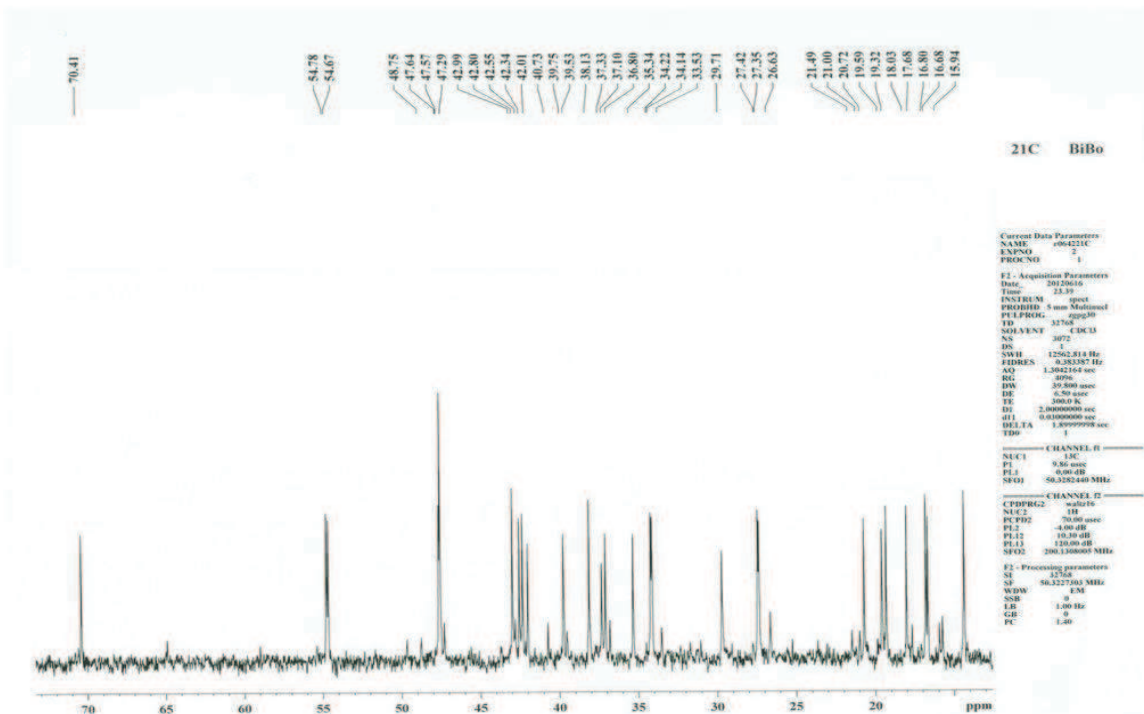


Figura 5.4: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 21C, entre δ_{C} 10,00 a δ_{C} 70,00.

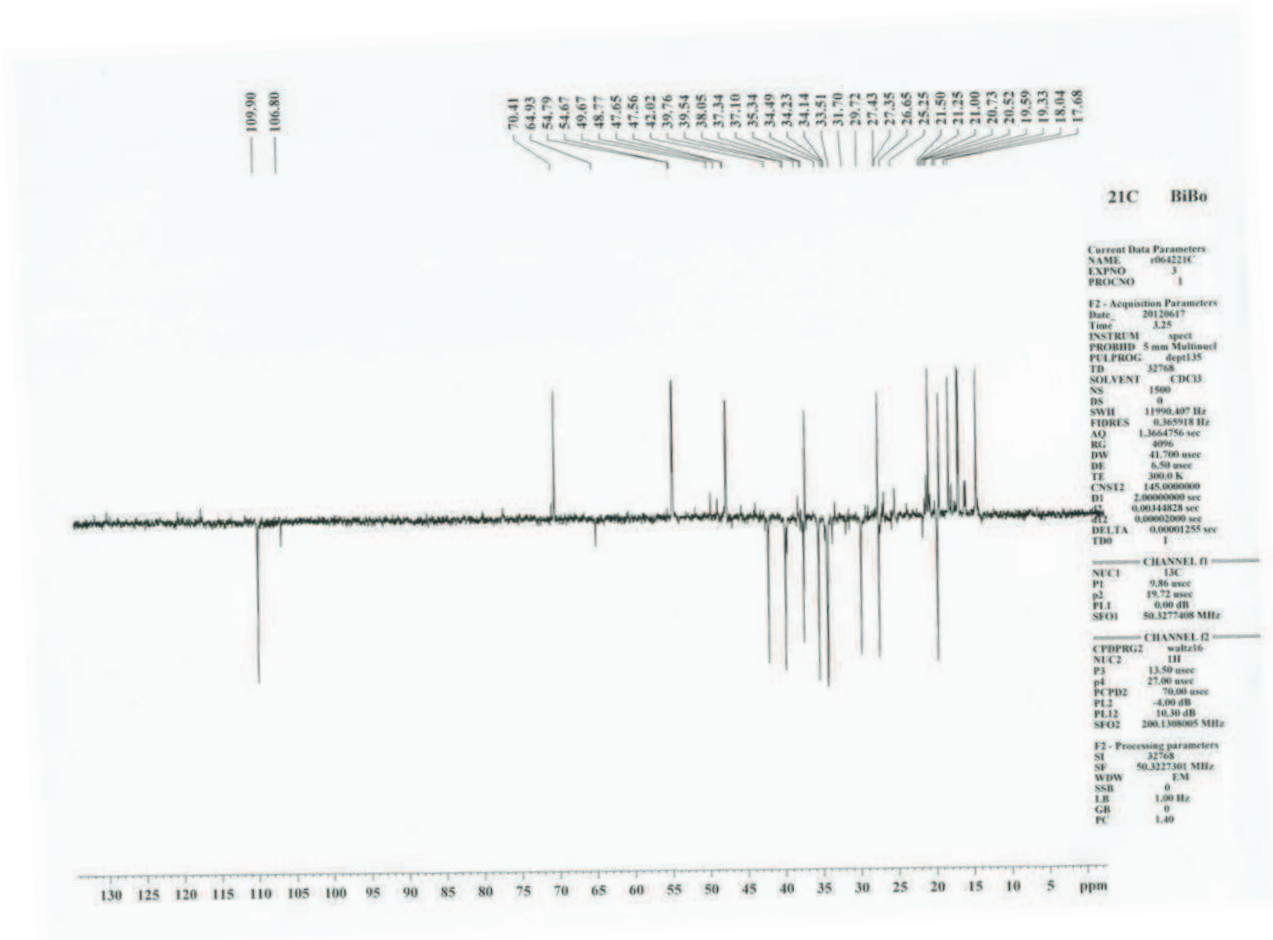


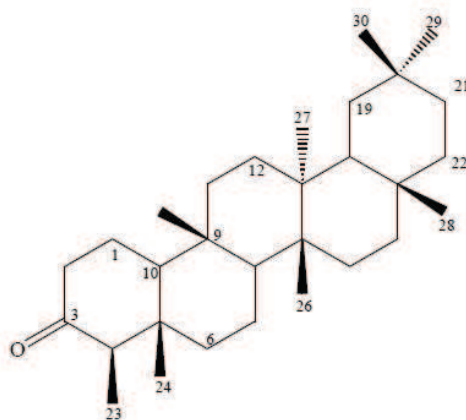
Figura 5.5: Subespectro DEPT de 21C (CDCl₃, 50 MHz).

Em função do perfil dos espectros de hidrogênio, os dados de RMN de ¹H e de ¹³C do constituinte 21C foram comparados aos que foram atribuídos ao 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al (G2), triterpeno pentacíclico anteriormente isolado por SILVA (2007), porém apresentando um sinal de hidrogênio metilênico característico de álcool primário em δ_H 4,17. SILVA (2007) também isolou o lupano 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G4) do extrato hexânico de galhos de *M. imbricata*.

Os dados obtidos por comparação entre os dados de 21C, com os triterpenos 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al (G2) (Fig. 5.6) e 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G4) isolados por SILVA (2007), bem como os dados publicados por MAHATO (1994) estão compilados na Tabela 5.1. Em função da similaridade dos dados de RMN de ¹³C publicados (MAHATO, 1994; SILVA, 2007) propôs-se 21C como sendo a 21-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona.

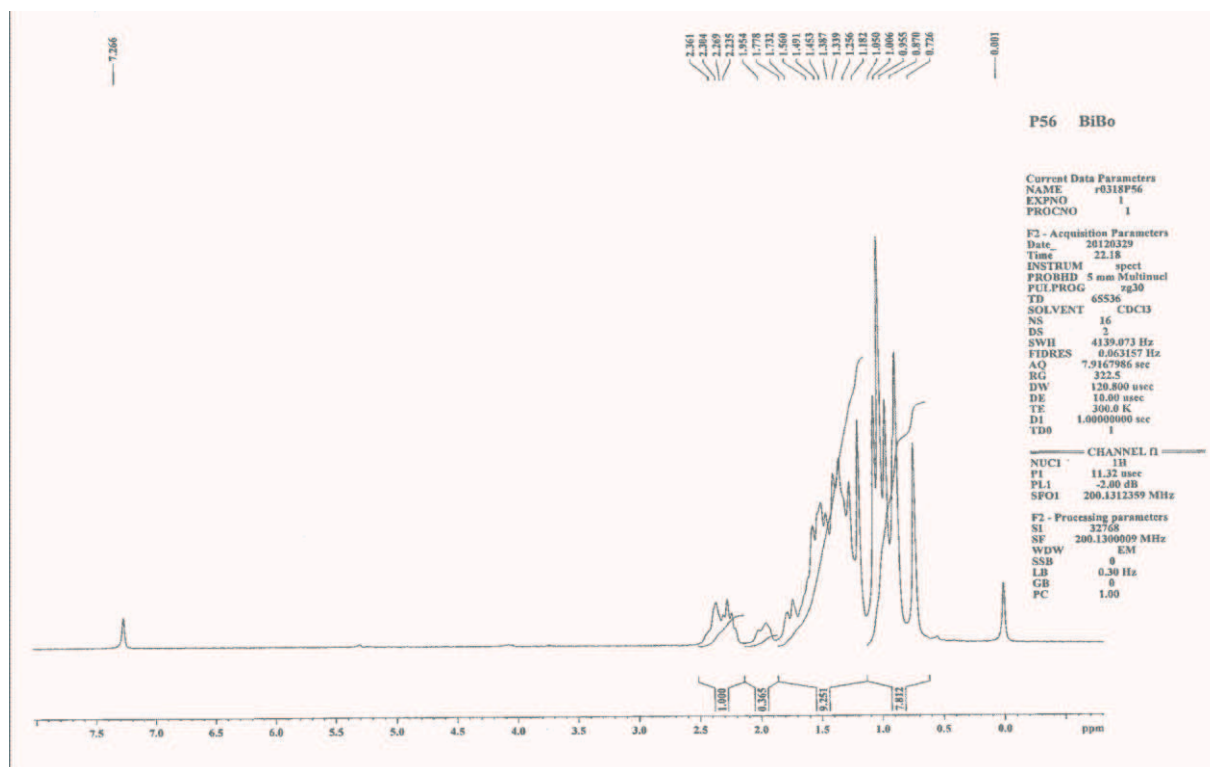
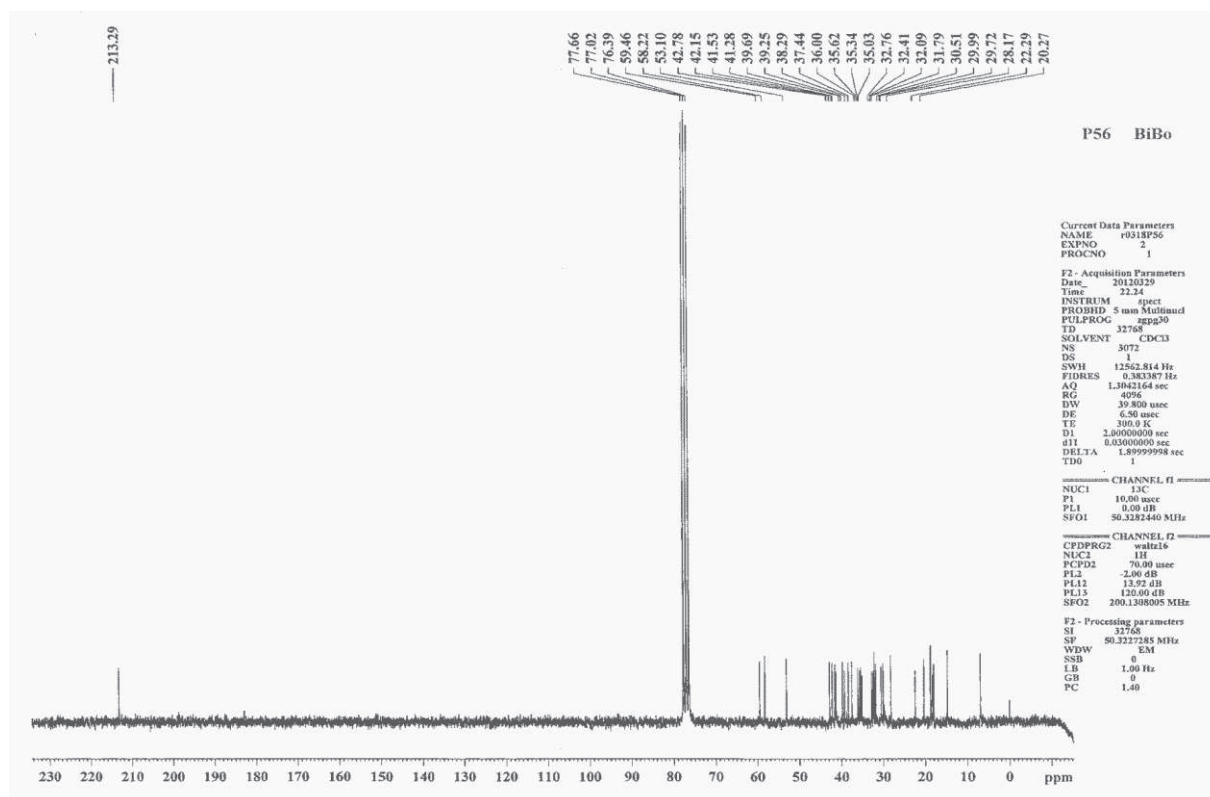
Tabela 5.1: Dados de RMN (CDCl_3 , 200 MHz) de 21C, comparados com os de 3-oxo-lup-20(29)-en-30-al (G2) e 30-hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona (G4) (SILVA, 2007) e MAHATO (1994)

| C_n | DEPT | 21C | | δ_C - G2 (SILVA, 2007) | δ_C - G4 (SILVA, 2007) | δ_C (MAHATO, 1994) |
|-------|------------------|----------------|-------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| | | δ_C | δ_H | | | |
| 1 | CH ₂ | 39,75 | 1,89 | 39,66 | 39,58 | 39,6 |
| 2 | CH ₂ | 34,22 | 2,42; 2,49 | 34,16 | 34,14 | 34,1 |
| 3 | C=O | 218,5 | ----- | 217,16 | 218,25 | 218,3 |
| 4 | C | 47,29 | ----- | 47,37 | 47,32 | 47,3 |
| 5 | CH | 54,78 | 1,31 | 55,06 | 54,87 | 54,9 |
| 6 | CH ₂ | 19,32 | 1,47 | 19,70 | 19,67 | 19,7 |
| 7 | CH ₂ | 33,53 | 1,43 | 33,66 | 33,57 | 33,6 |
| 8 | C | 40,73 | ----- | 40,81 | 40,79 | 40,8 |
| 9 | CH | 48,75 | 1,38 | 49,68 | 49,72 | 49,7 |
| 10 | C | 36,80 | ----- | 36,92 | 36,86 | 36,9 |
| 11 | CH ₂ | 21,50 | 1,27 | 21,52 | 21,55 | 21,6 |
| 12 | CH ₂ | 27,35 | 1,13 | 27,64 | 26,67 | 26,7 |
| 13 | CH | 38,05 | 1,67 | 37,93 | 38,11 | 38,1 |
| 14 | C | 42,80 | ----- | 42,83 | 42,85 | 42,9 |
| 15 | CH ₂ | 29,71 | 1,70; 1,05 | 27,40 | 27,39 | 27,4 |
| 16 | CH ₂ | 37,33 | 1,35; 1,52 | 39,96 | 35,40 | 35,4 |
| 17 | C | 42,99 | ----- | 43,32 | 43,01 | 43,0 |
| 18 | CH | 47,65 | 1,5 | 37,86 | 48,83 | 48,8 |
| 19 | CH | 49,67 | 2,29 | ----- | 43,77 | 43,8 |
| 20 | C | 150,18 | ----- | 157,21 | 154,71 | 154,7 |
| 21 | CH | 70,41 | 1,29; 2,06 | 34,14 | 31,75 | 31,8 |
| 22 | CH ₂ | 39,53 | 1,26; 1,28 | 35,39 | 39,82 | 39,8 |
| 23 | CH ₃ | 27,42 | 1,07 | 26,65 | 26,67 | 26,7 |
| 24 | CH ₃ | 20,72 | 1,02 | 21,09 | 21,04 | 21,0 |
| 25 | CH ₃ | 15,94 | 0,93 | 15,91 | 15,98 | 16,0 |
| 26 | CH ₃ | 16,68 | 1,06 | 15,81 | 15,80 | 15,8 |
| 27 | CH ₃ | 15,94 | 0,96 | 14,39 | 14,46 | 14,5 |
| 28 | CH ₃ | 18,03 | 0,79 | 17,84 | 17,72 | 17,7 |
| 29 | =CH ₂ | 109, 90 | 4,91; 4,93 | 133,05 | 106,87 | 106,8 |
| 30 | CH ₃ | 25,25 | 4,17; 4,07 | 194,99 | 65,01 | 65,0 |

Constituinte P56: Friedelina

O constituinte P56 (13 mg) foi isolado na forma de um sólido branco amorfo, insolúvel em acetona e acetato de etila e bastante solúvel em CHCl_3 . Através de CCD, utilizando fase móvel de diferentes polaridades, foi observado somente um componente. Em função disso, esta amostra foi enviada para análise por RMN (CDCl_3 , 200 MHz).

No espectro de RMN de ^1H (Fig. 5.6) foram identificados sete sinais simples em δ_{H} 1,25, 1,18, 1,05, 1,00, 0,95, 0,87 e δ_{H} 0,72, que foram atribuídos a sete grupos metila. Ainda foram observados um sinal duplete em δ_{H} 0,87 ($J = 6,0$ Hz), característico de grupo metila H-23, encontrado em triterpenos pentacíclicos de esqueleto friedelano e sinais entre δ_{H} 1,95 e δ_{H} 2,36, correspondentes a átomos de hidrogênio metilênico e metínico (MAHATO, 1994). Através do espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 5.7 e 5.8) e do subespectro DEPT 135 (Fig. 5.9) foi identificada a presença de 30 átomos de carbono, sendo oito metílicos, 11 metilênicos, quatro metínicos e sete átomos de carbono não hidrogenado. Estes dados espectrais, juntamente com um sinal em δ_{C} 213,29 referente a grupo carbonila, são característicos de triterpenos pentacíclicos da série friedelano (MAHATO, 1994). Através da comparação dos dados de RMN de P56 com os já publicados por DUARTE (2000) e SILVA (2007) atribuiu-se a esta substância a estrutura química da friedelina. Os dados de RMN de P56, juntamente com os destes autores, foram listados na Tabela 5.2.

Fig. 5.6: Espectro de RMN de ^1H de P56 (CDCl_3 , 200 MHz).Fig. 5.7: Espectro de RMN de ^{13}C de P56 (CDCl_3 , 50 MHz).

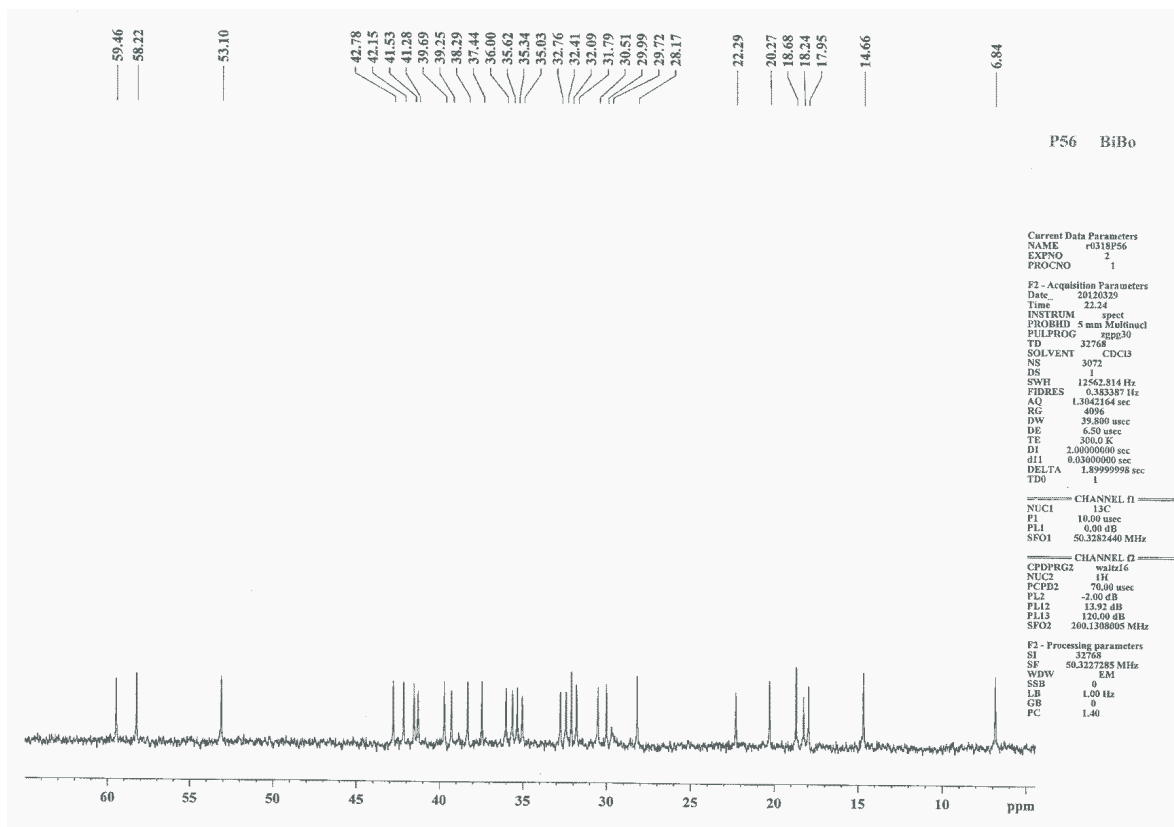


Figura 5.8: Ampliação do espectro de RMN de ¹³C de P56, entre δ_C 6,84 a δ_C 59,46.

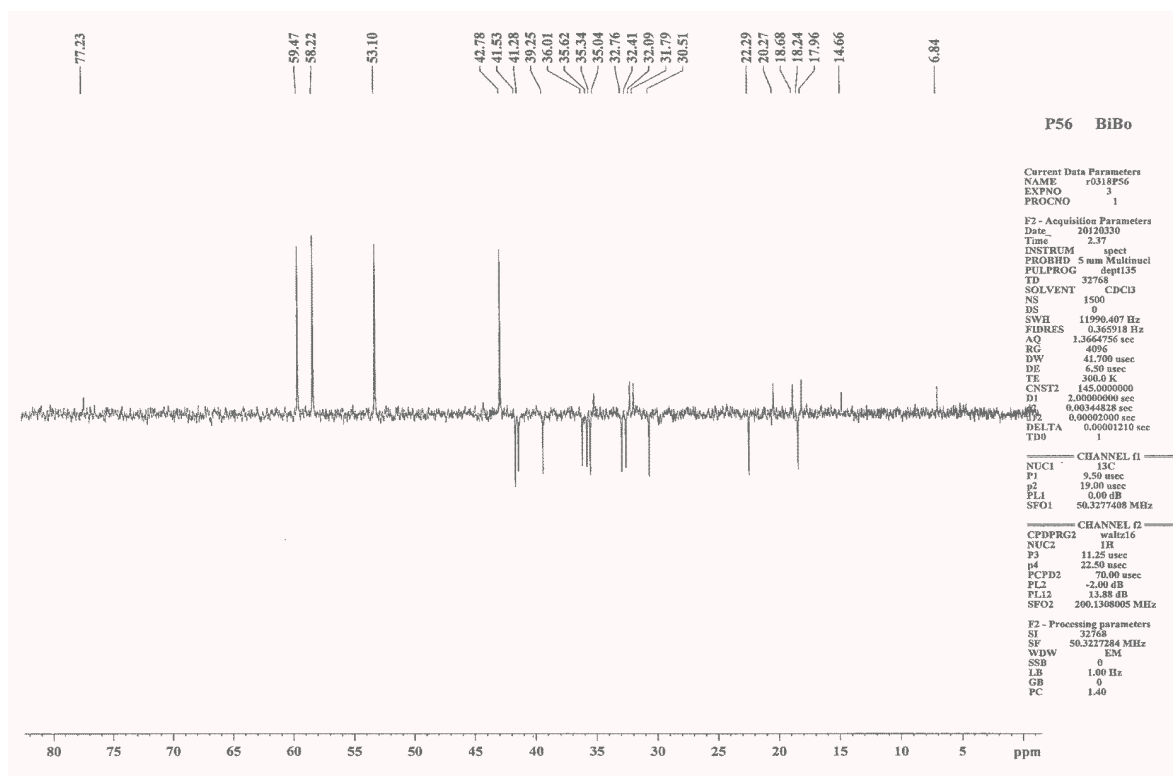
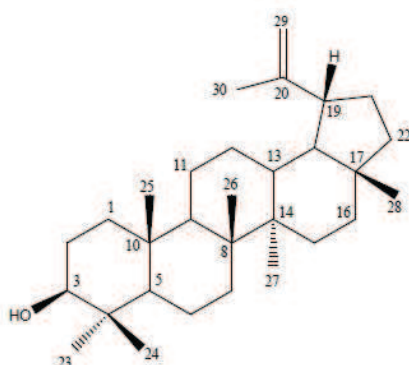


Figura 5.9: Subespectro DEPT de P56 (CDCl₃, 50 MHz).

Tabela 5.2: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de P56 comparados a literatura (DUARTE 2000 e SILVA, 2007)

| C_n | DEPT | P56 δ_c | δC (DUARTE, 2000) | δC (SILVA, 2007) |
|-------|-----------------|-------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 1 | CH ₂ | 22,29 | 22,31 | 22,28 |
| 2 | CH ₂ | 41,53 | 41,56 | 41,53 |
| 3 | C=O | 213,29 | 212,98 | 213,32 |
| 4 | CH | 58,22 | 58,30 | 58,21 |
| 5 | C | 42,15 | 42,17 | 42,15 |
| 6 | CH ₂ | 41,28 | 41,38 | 41,27 |
| 7 | CH ₂ | 18,24 | 18,29 | 18,23 |
| 8 | CH | 53,10 | 53,18 | 53,09 |
| 9 | C | 37,44 | 37,52 | 37,43 |
| 10 | CH | 59,46 | 59,58 | 59,45 |
| 11 | CH ₂ | 35,62 | 35,69 | 35,61 |
| 12 | CH ₂ | 30,51 | 30,55 | 30,50 |
| 13 | C | 39,69 | 39,77 | 39,69 |
| 14 | C | 38,29 | 38,37 | 38,28 |
| 15 | CH ₂ | 32,41 | 32,50 | 32,41 |
| 16 | CH ₂ | 36,00 | 36,08 | 35,99 |
| 17 | C | 29,99 | 30,05 | 29,99 |
| 18 | CH | 42,78 | 42,90 | 42,76 |
| 19 | CH ₂ | 35,34 | 35,40 | 35,33 |
| 20 | C | 28,17 | 28,20 | 28,17 |
| 21 | CH ₂ | 32,76 | 32,86 | 32,75 |
| 22 | CH ₂ | 39,25 | 39,30 | 39,25 |
| 23 | CH ₃ | 6,84 | 6,81 | 6,84 |
| 24 | CH ₃ | 14,06 | 14,68 | 14,66 |
| 25 | CH ₃ | 17,95 | 17,97 | 17,95 |
| 26 | CH ₃ | --- | 20,27 | 20,26 |
| 27 | CH ₃ | 18,68 | 18,66 | 18,68 |
| 28 | CH ₃ | 32,09 | 32,13 | 32,09 |
| 29 | CH ₃ | 35,03 | 35,03 | 35,03 |
| 30 | CH ₃ | 31,79 | 31,81 | 31,78 |

Constituinte 29C: Lupeol



O constituinte 29C (40 mg) foi isolado na forma de um sólido branco amorfo, insolúvel em acetato de etila e bastante solúvel em CHCl_3 . Através de CCD, utilizando fase móvel de diferentes polaridades, foi detectado a presença de somente um componente. Em função disso, esta amostra foi enviada para análise por RMN (CDCl_3 , 400 MHz).

No espectro de RMN de ^1H (Fig. 5.10 e 5.11) foram observados 7 simpletos em δ_{H} em 0,78, 0,83, 0,87, 0,94, 0,96, 1,03, e 1,68, indicativos de hidrogênios metílicos e um grupo hidroxila secundário em δ_{H} 3,16. O espectro também apresentou sinais que indicam presença de prótons olefínicos em δ_{H} 4,68 e 4,56.

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (Fig. 5.12 e 5.13) e do subespectro DEPT-135 (Fig. 5.14) foram identificados 30 sinais de átomos de carbono, sendo 6 metílicos, 10 metilênicos, 7 metínicos e 7 não hidrogenados (Tabela 5.3). Estes sinais são característicos de triterpenos pentacíclicos da série lupano (MAHATO, 1994). O sinal em δ_{C} 79,05 foi atribuído a carbono ligado ao grupo hidroxila e os sinais em δ_{C} 150,98 e δ_{C} 109,33 a átomos de carbono de alqueno terminal, também característicos de lupanos (MAHATO, 1994). A presença de lupeol em *M. imbricata* não foi relatada em estudos anteriores.

Em função do perfil dos espectros, os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do constituinte 29C foram comparados aos dados publicados por SHAHLAEI e colaboradores (2013), que isolaram o lupeol da espécie *Euphorbia aellenii*. (Tabela 5.3).

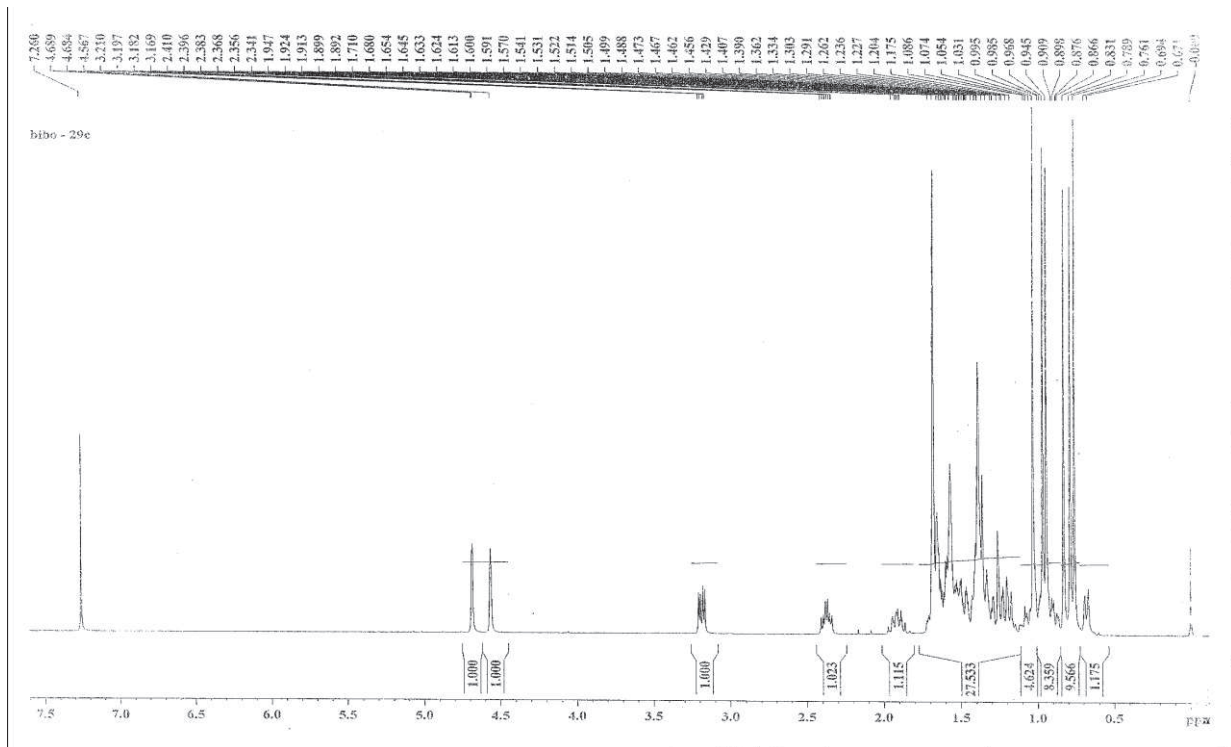


Figura 5.10: Espectro de RMN de ^1H de 29c (CDCl_3 , 400 MHz).

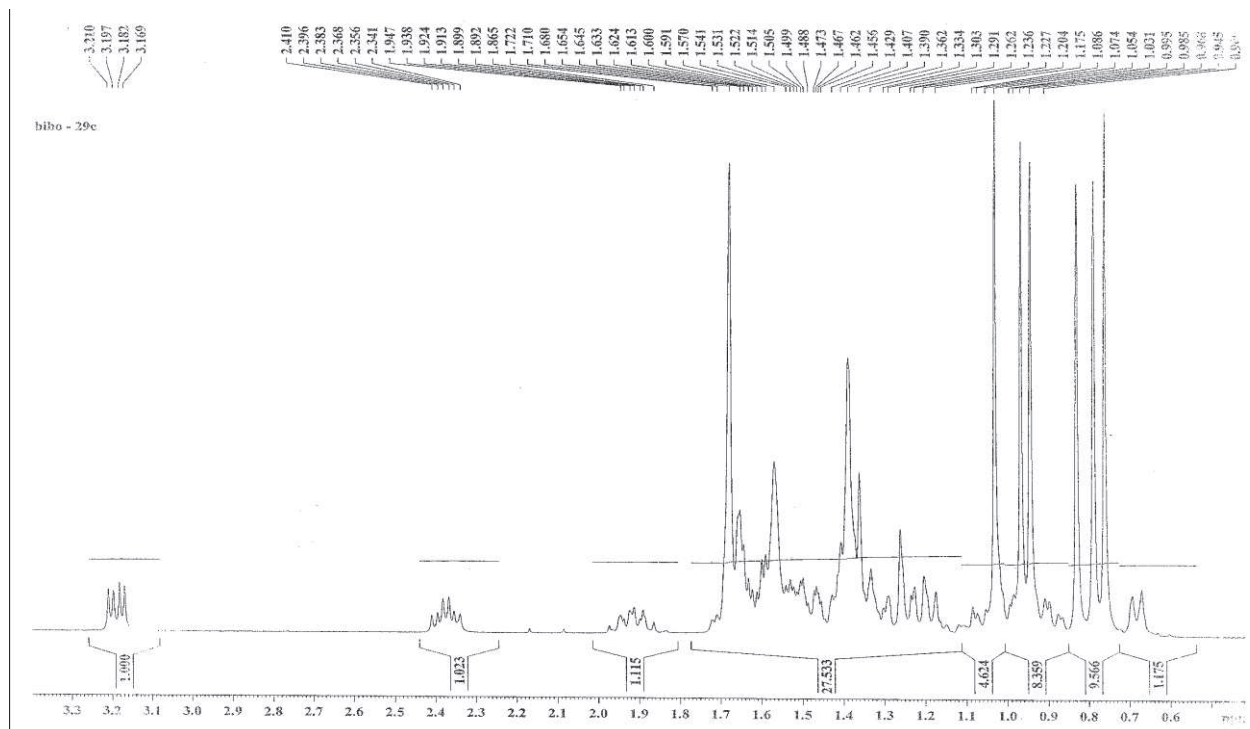


Figura 5.11: Ampliação do espectro de RMN de ^1H de 29c, entre δ_{H} 0,94 e δ_{H} 1,68.

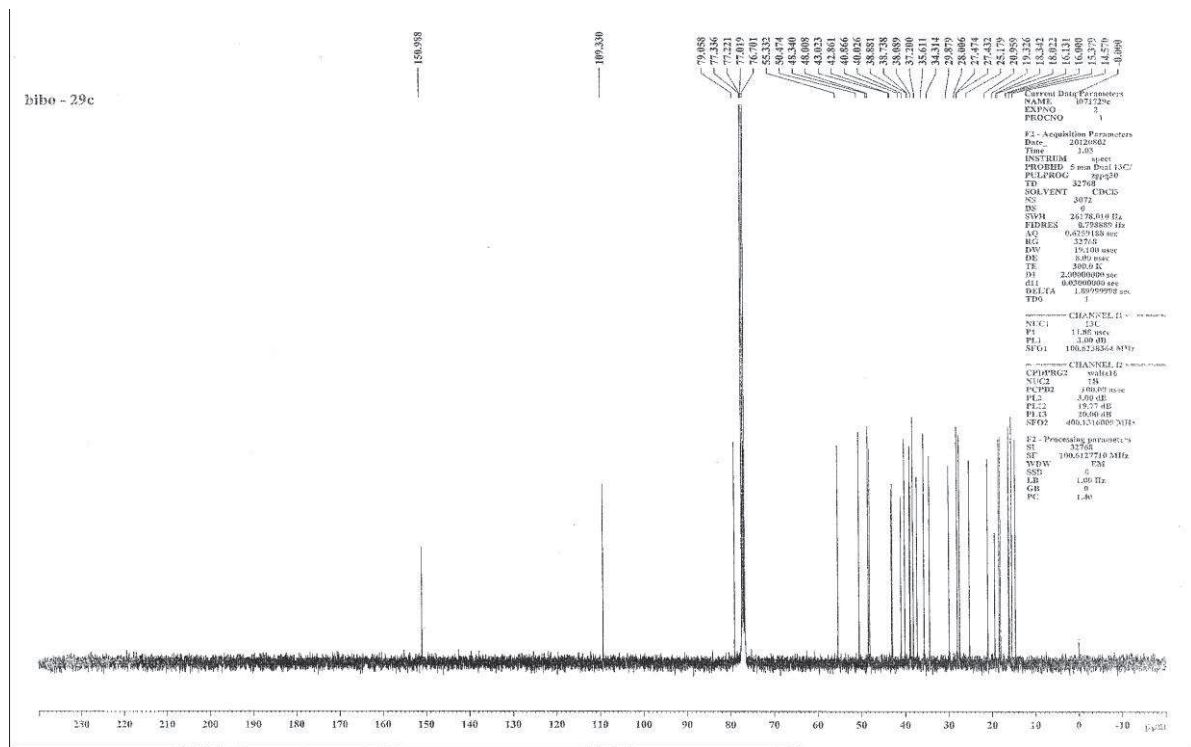


Figura 5.12: Espectro de RMN de ^{13}C de 29c (CDCl_3 , 100 MHz).

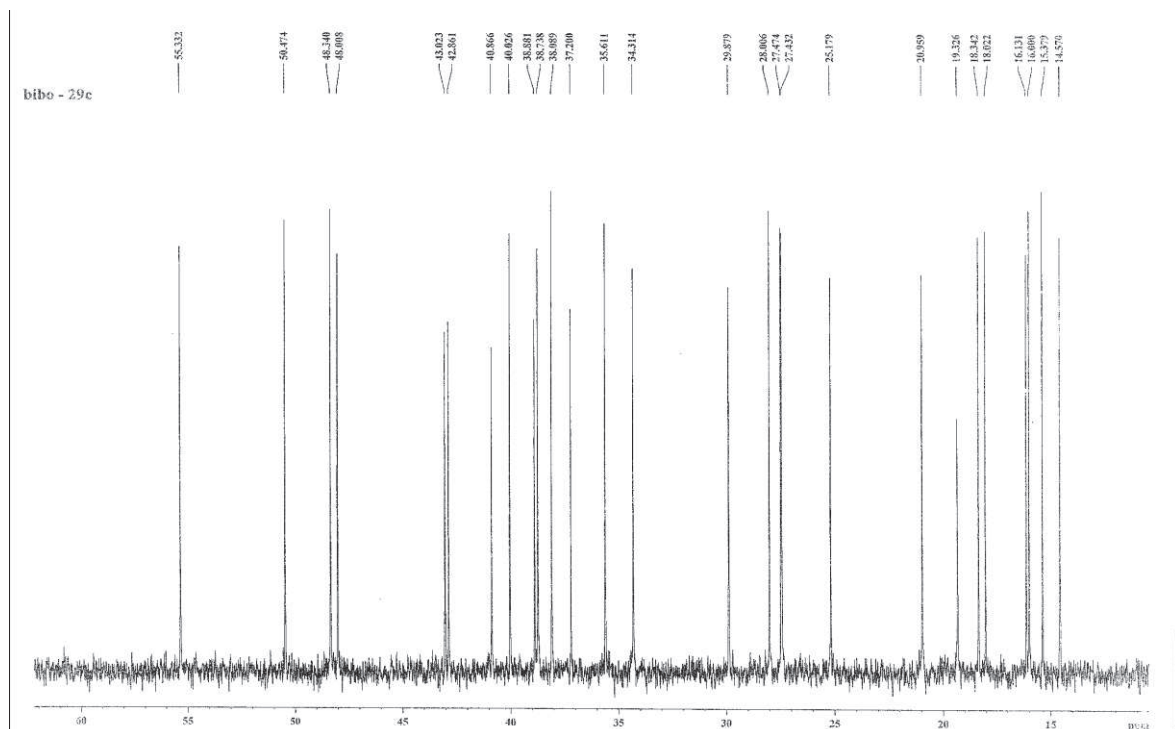


Figura 5.13: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de 29c, entre δ_{C} 14,57 a δ_{C} 55,33.

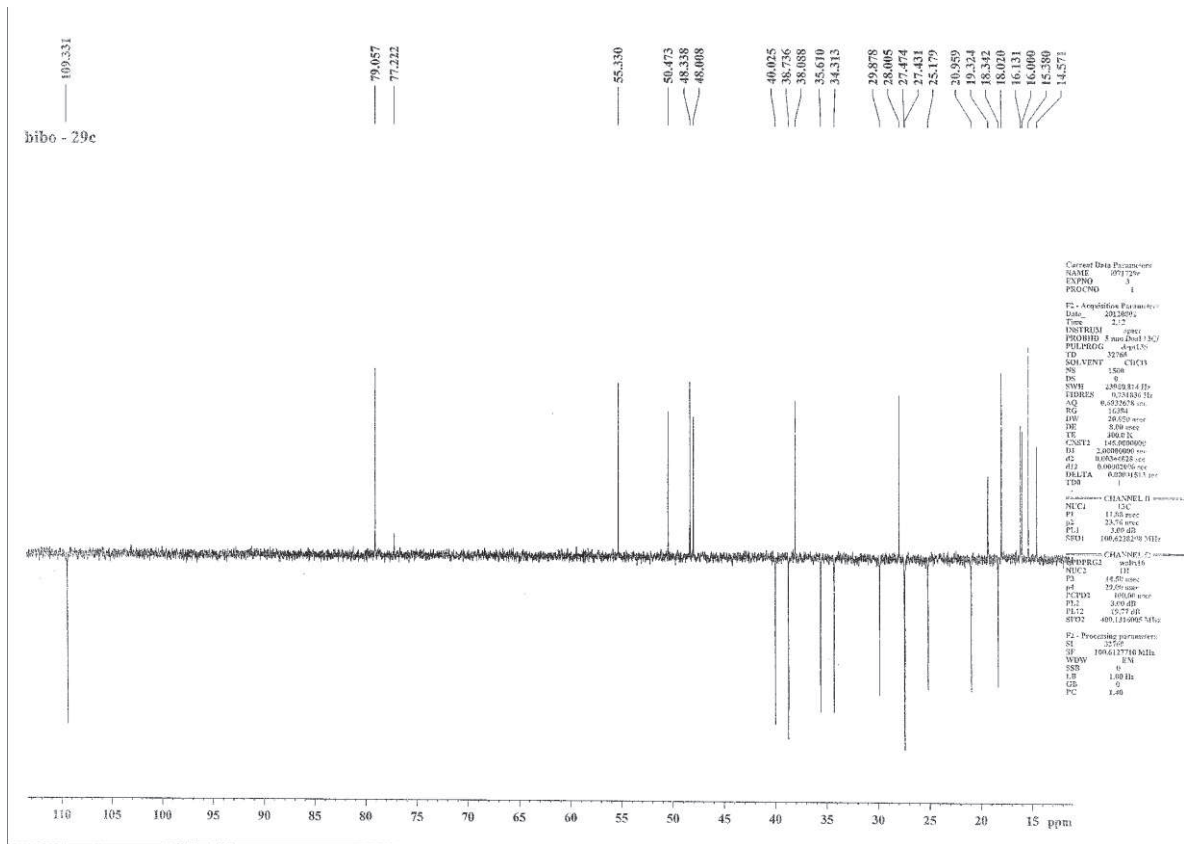


Figura 5.14: Subespectro DEPT de 29C (CDCl₃, 100 MHz).

Tabela 5.3: Dados de RMN de ^1H de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) de 29C comparados com os publicados por SHAHLAEI (2013)

| C_n | DEPT | 29C δ_c | δC Lupeol (SHAHLAEI, 2013) |
|-------|-----------------|-------------------|---------------------------------------|
| 1 | CH | 38,08 | 38,69 |
| 2 | CH ₂ | 25,17 | 27,4 |
| 3 | CH | 79,05 | 78,9 |
| 4 | CH ₂ | 38,73 | 38,9 |
| 5 | CH | 55,33 | 55,3 |
| 6 | CH ₂ | 18,34 | 18,3 |
| 7 | CH ₂ | 34,31 | 34,2 |
| 8 | C | 40,86 | 40,8 |
| 9 | CH | 50,47 | 50,4 |
| 10 | C | 37,20 | 37,2 |
| 11 | CH ₂ | 20,95 | 20,9 |
| 12 | CH ₂ | 27,43 | 25,1 |
| 13 | C | 38,88 | 38,0 |
| 14 | C | 42,86 | 42,8 |
| 15 | CH | 27,47 | 27,4 |
| 16 | CH ₂ | 35,61 | 35,5 |
| 17 | C | 43,02 | 43,0 |
| 18 | CH | 48,34 | 48,3 |
| 19 | CH | 48,00 | 48,0 |
| 20 | C | 150,98 | 151,0 |
| 21 | C | 29,87 | 29,8 |
| 22 | CH ₂ | 40,02 | 40,0 |
| 23 | CH ₂ | 28,00 | 27,9 |
| 24 | CH ₃ | 15,37 | 16,0 |
| 25 | CH ₃ | 16,13 | 18,0 |
| 26 | CH ₃ | 16,00 | 16,1 |
| 27 | CH ₃ | 14,57 | 14,6 |
| 28 | CH ₃ | 18,02 | 15,4 |
| 29 | CH ₂ | 109,33 | 109,3 |
| 30 | CH ₃ | 19,32 | 19,3 |

Em função do grau de pureza de 29C, a amostra foi submetida à difratometria de raios-X de sólido. Através dos dados do difratograma (Fig. 15,A) foi possível observar a estrutura química de 29C na forma de agulha (Fig. 15,B).

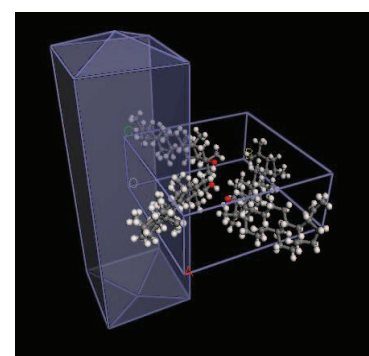
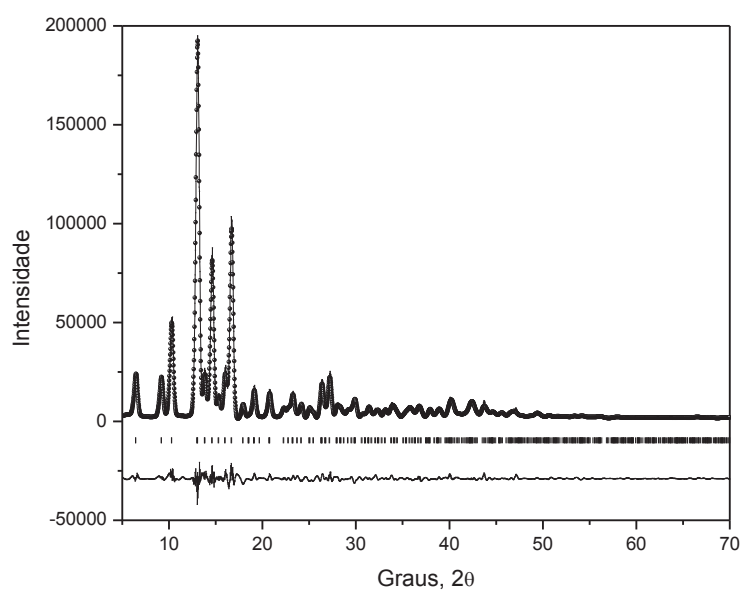
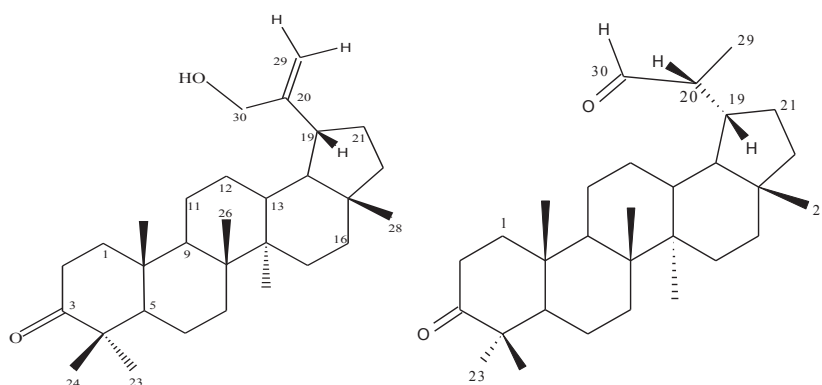
**B****A**

Figura 5.15: A) Difratograma do lupeol e B) Estrutura do lupeol em forma de agulhas, caracterizada através dos dados obtidos por difratometria de raios-X de sólido

**Constituinte C52b: Mistura de 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona e
(20R)-3-oxolupan-30-al**



O constituinte C52b (13,6 mg) foi isolado da fração na forma de um sólido esbranquiçado, amorfo e solúvel em CHCl_2 . Atavés de CCD utilizando fase móvel de diferentes polaridades, foi observado somente um componente. Em função disso, esta amostra foi enviada para análise por RMN.

Verificou-se que o perfil dos espectros de RMN de ^1H (Fig. 5.16 e 5.17) e de ^{13}C (Fig. 5.18 e 5.19) de C52b foi muito semelhante ao dos espectros de C21 descrito neste trabalho, ao de G4, isolado por SILVA (2007) e também com os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C do terpeno (20R)-3-oxolupan-30-al, publicado por MUTAI e colaboradores (2007). Em função disso, foi feita uma comparação mais detalhada dos dados de deslocamento químico observados no espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C e no subespectro DEPT-135 (Fig. 5.20) de C52b, com os dados da literatura (SILVA, 2007; MUTAI, 2007) Através desta análise foi possível sugerir que C52b tratava-se da mistura dos triterpenos 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona e (20R)-3-oxolupan-30-al.

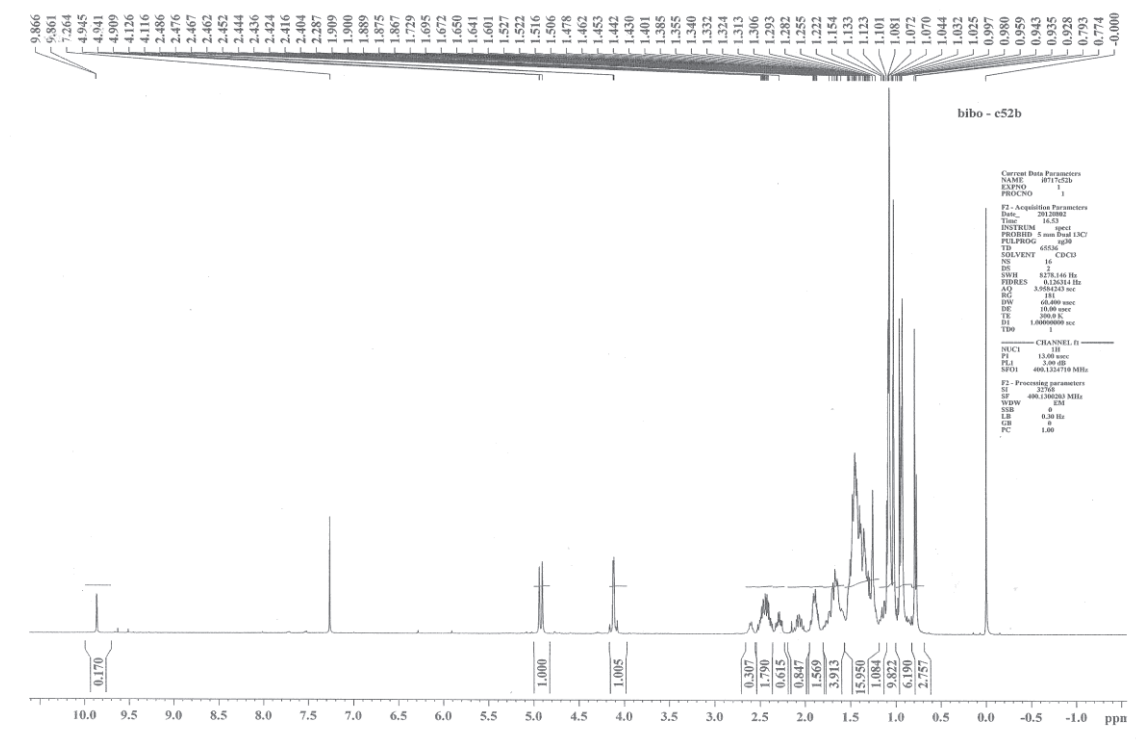


Figura 5.16: Espectro de RMN de ^1H de C52b (CDCl_3 , 200 MHz).

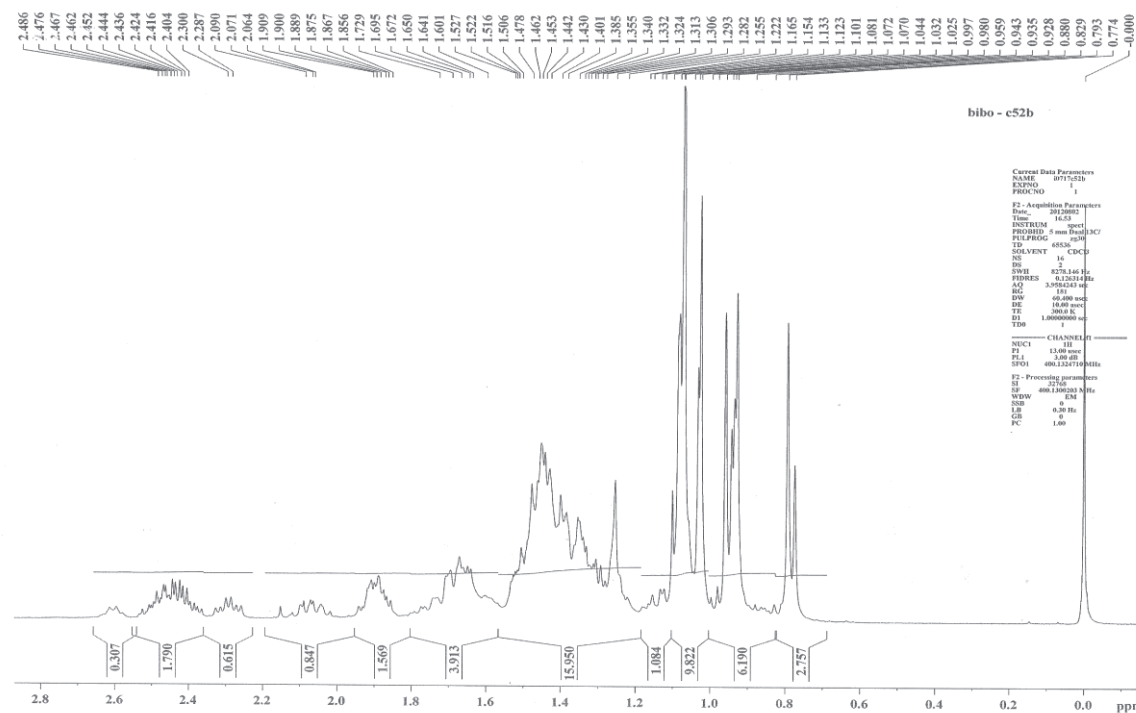


Figura 5.17: Ampliação de RMN de ^1H de C52b (CDCl_3 , 200 MHz).

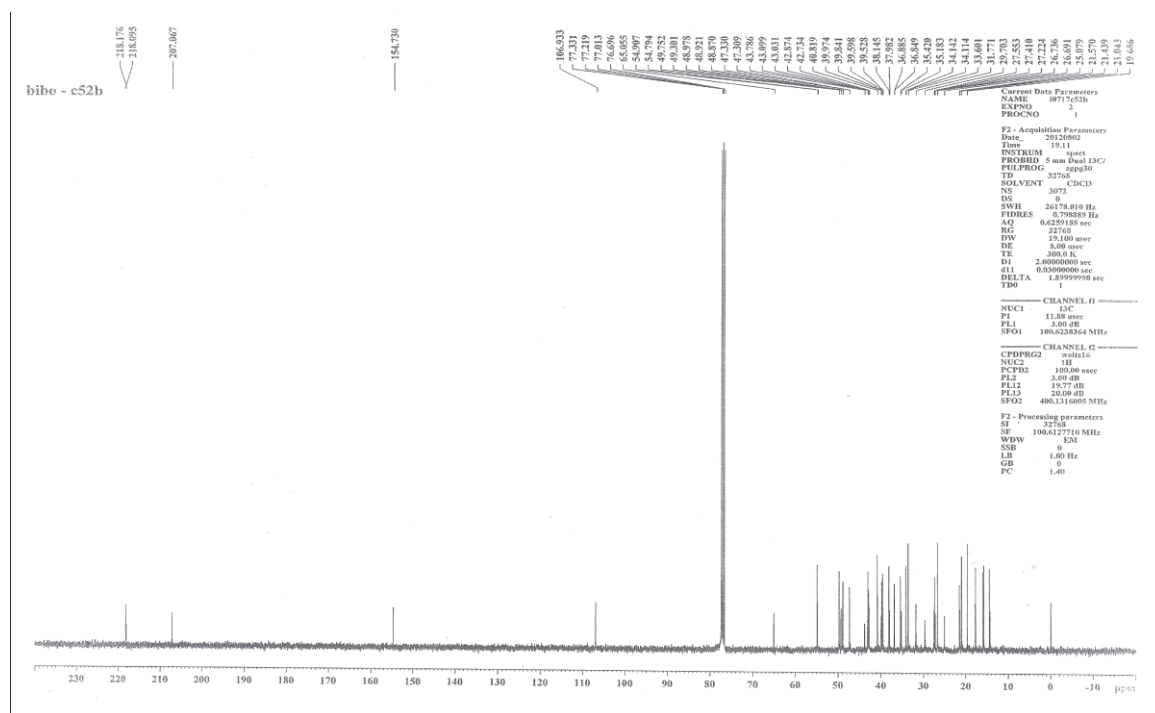


Figura 5.18: Espectro de RMN de ^{13}C de C52b (CDCl_3 , 50 MHz).

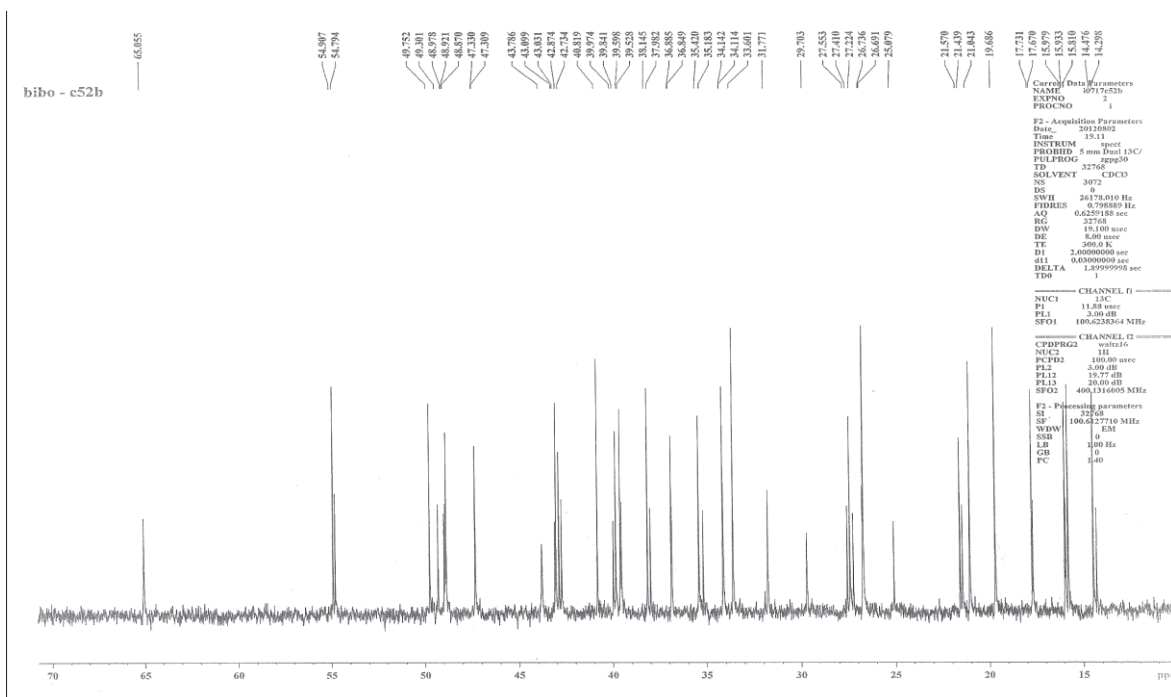


Figura 5.19: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C de C52b, entre δ_{C} 14,29 e δ_{C} 65,05.

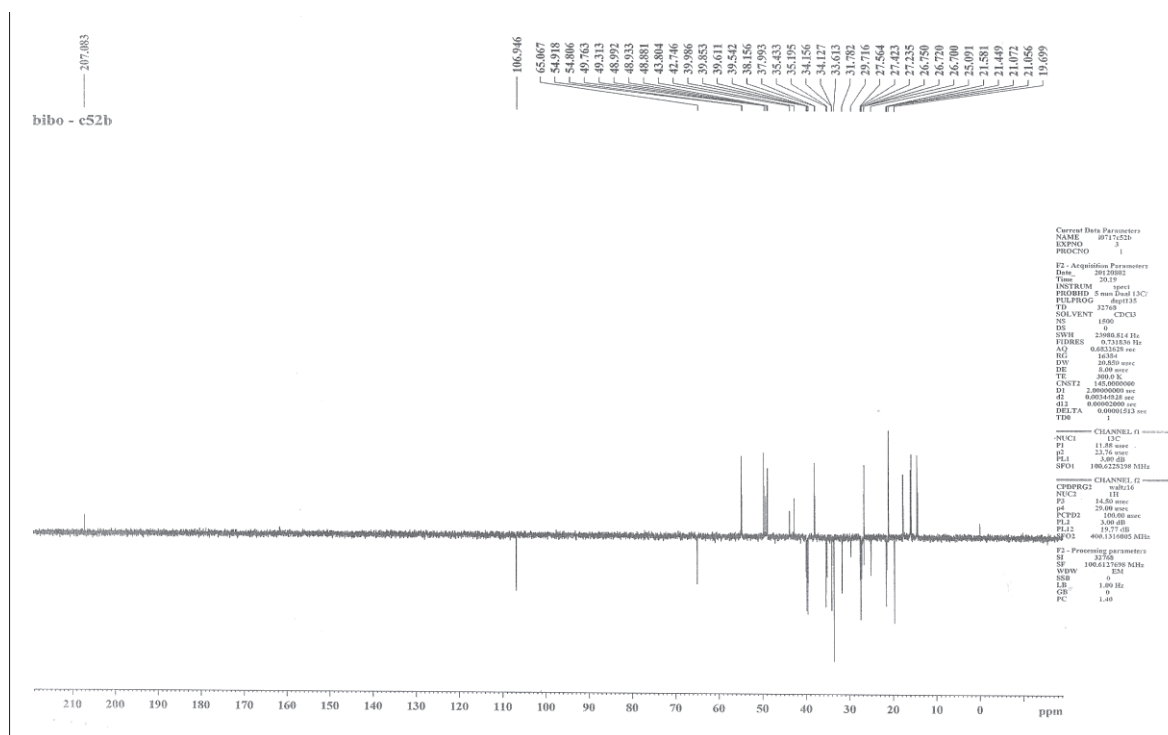
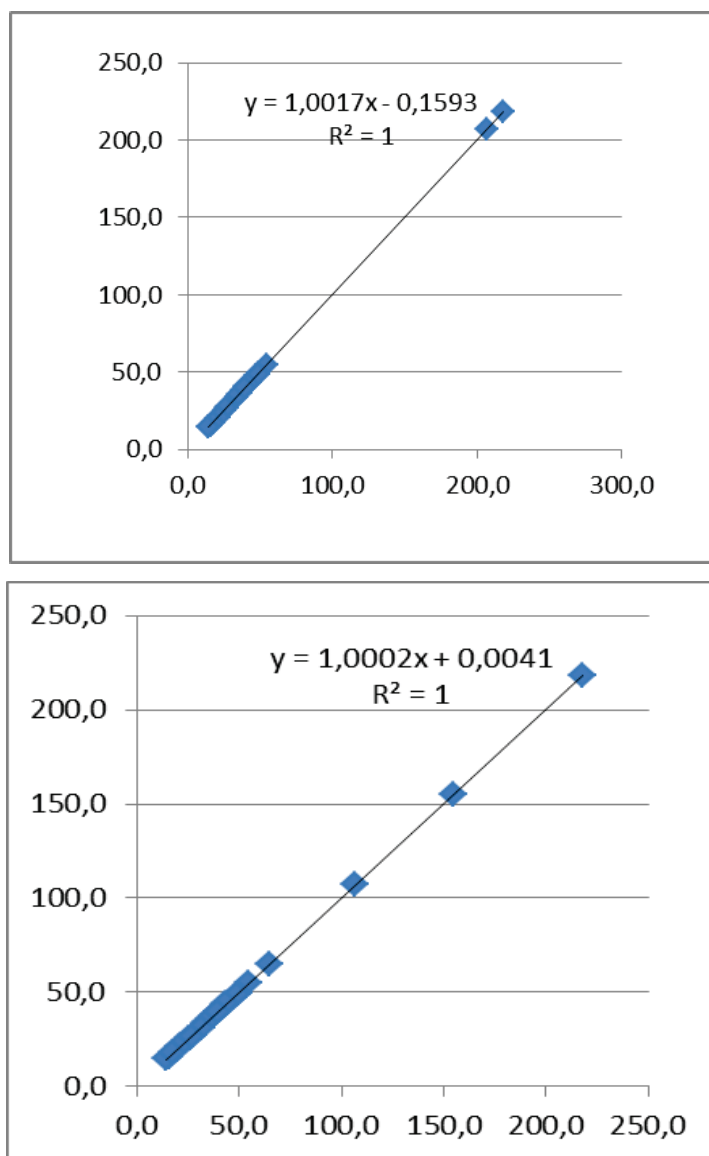


Figura 5.20: Subespectro DEPT de C52b (CDCl₃, 50 MHz).

Os dados de RMN de ¹³C de C52b foram inseridos no programa MATCH LAB 1.0, desenvolvido pelo Prof. Dr. Djalma Meneses de Oliveira, do Departamento de Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Após a inserção dos deslocamentos químicos de RMN de ¹³C, neste programa se obtém uma previsão sobre qual triterpeno pentacíclico corresponde o composto em análise. Para os constituintes da mistura de 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona e (20R)-3-oxolupan-30-al de C52b foi encontrada um alto nível de confiabilidade, com coeficiente de correlação (R²) próximo de 1 (Fig. 5.21). Não foi encontrado relato de que (20R)-3-oxolupan-30-al já foi isolado de *M. imbricata*.



Ordenada: Deslocamento químico MATCH LAB 1.0.

Abcissa: Deslocamento químico de C52b.

Figura 5.21: Coeficiente de correlação obtidos para os dados de deslocamento químico dos constituintes 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona (Acima) e (20R)-3-oxolupan-30-al de C52b (Abaixo), encontrados em C52b.

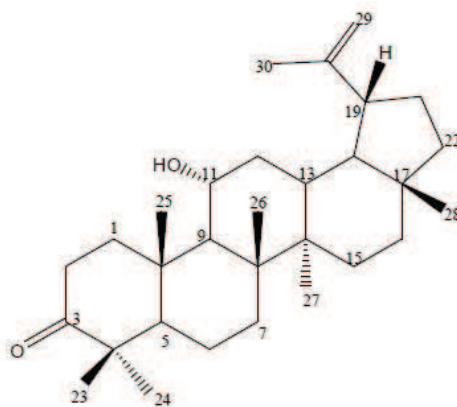
Tabela 5.4: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) de C52b: [30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona e (20R)-3-oxolupan-30-al] comparados a literatura

| C_n | DEPT | C52b ¹ | G4 (SILVA, 2007) | C52b ² | (20R)-3-oxolupan-30-al (MUTAI, 2007) |
|-------|-----------------|-------------------|---------------------|-------------------|---|
| 1 | CH ₂ | 39,59 | 39,58 | 39,52 | 39,4 |
| 2 | CH ₂ | 34,14 | 34,14 | 34,11 | 34,0 |
| 3 | C | 218,09 | 218,25 | 218,17 | 218,5 |
| 4 | C | 47,3 | 47,32 | 47,33 | 47,3 |
| 5 | CH | 54,79 | 54,87 | 54,9 | 54,7 |
| 6 | CH ₂ | 19,68 | 19,67 | 19,68 | 19,6 |
| 7 | CH | 33,6 | 33,57 | 33,6 | 33,4 |
| 8 | C | 40,81 | 40,79 | 39,97 | 40,6 |
| 9 | CH | 49,75 | 49,72 | 49,3 | 49,2 |
| 10 | C | 36,88 | 36,86 | 36,84 | 36,7 |
| 11 | CH ₂ | 21,57 | 21,55 | 21,43 | 21,3 |
| 12 | CH ₂ | 25,07 | 26,67 | 27,55 | 27,4 |
| 13 | CH | 38,14 | 38,11 | 37,98 | 37,8 |
| 14 | C | 42,87 | 42,85 | 43,03 | 42,9 |
| 15 | CH ₂ | 27,41 | 27,39 | 27,22 | 27,1 |
| 16 | CH ₂ | 35,42 | 35,4 | 35,18 | 35,1 |
| 17 | C | 43,03 | 43,01 | 43,09 | 43,0 |
| 18 | CH | 48,87 | 48,83 | 48,97 | 48,9 |
| 19 | CH | 43,78 | 43,77 | 42,73 | 42,6 |
| 20 | C | 154,73 | 154,71 | 48,97 | 48,9 |
| 21 | CH ₂ | 31,77 | 31,75 | 25,07 | 25,0 |
| 22 | CH ₂ | 39,84 | 39,82 | 39,97 | 39,9 |
| 23 | CH ₃ | 26,73 | 26,67 | 26,73 | 26,6 |
| 24 | CH ₃ | 21,04 | 21,04 | 21,43 | 21,0 |
| 25 | CH ₃ | 15,97 | 15,98 | 15,81 | 15,7 |
| 26 | CH ₃ | 15,81 | 15,8 | 15,93 | 15,7 |
| 27 | CH ₃ | 14,47 | 14,46 | 14,29 | 14,2 |
| 28 | CH ₂ | 17,73 | 17,72 | 17,67 | 17,5 |
| 29 | CH ₂ | 106,93 | 106,87 | 14,47 | 14,4 |
| 30 | CH ₃ | 65,05 | 65,01 | 207,06 | 207,1 |

1- Dados de RMN ^{13}C de 30-hidroxilup-20(29)-en-3-ona

2- Dados de RMN ^{13}C de (20R)-3-oxolupanal

Constituinte IC1: 11 α -hidroxi-lup-20(29)-en-3-ona



O constituinte IC1 (46,9 mg) foi isolado na forma de um sólido amorfo, de cor branca, insolúvel em acetato de etila e solúvel em CHCl_3 . Atavés de CCD, utilizando fase móvel de diferentes polaridades, somente um componente foi detectado na cromatoplaça. Em função disso, esta amostra foi enviada para análise por RMN (CDCl_3 , 200 MHz).

Inicialmente foi realizada uma comparação dos dados de deslocamento químico de hidrogênio, observados no espectro de RMN de ^1H (Fig. 5.22) e de ^{13}C (Fig. 5.23e 5.24) e no sub-espectro DEPT-135 (Fig. 5.25), com os dados dos compostos isolados por SILVA (2007). Por este processo foi observada uma acentuada semelhança com dados espectrais de G5 (11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona) SILVA (2007) (Tabela 5.5). Também foi realizada uma comparação dos dados de deslocamento químico de carbono de IC1, com os dados publicado por MAGALHÃES (2012) (Tabela 5.5), relativo a estudos fitoquímicos com *M. salicifolia*. Por esta comparação, foi possível sugerir que IC1 trata-se da 11 α -hidroxilup-20(29)-en-3-ona.

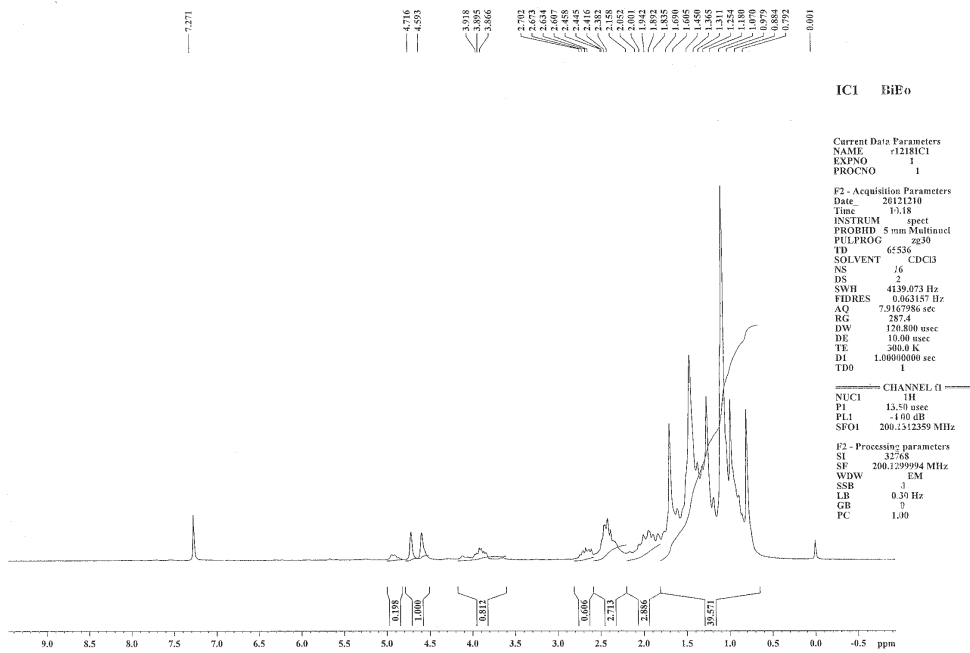


Figura 5.22: Espectro de RMN de ¹H de IC1 (CDCl₃, 200 MHz).

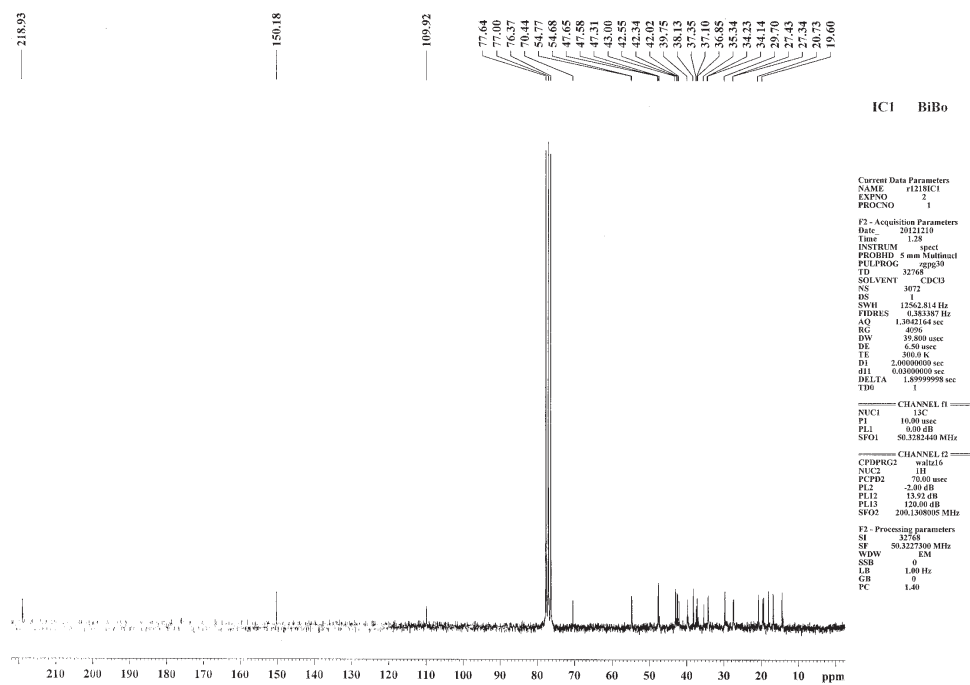


Figura 5.23: Espectro de RMN de ¹³C de IC1 (CDCl₃, 50 MHz).

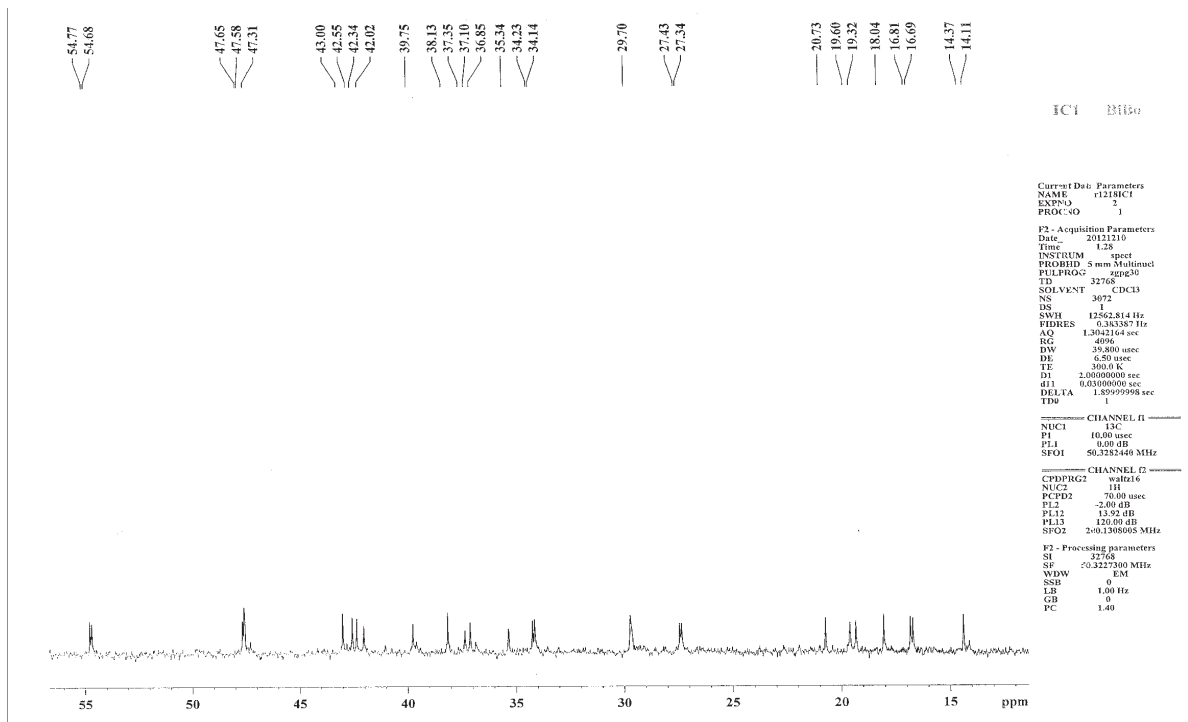


Figura 5.24: Ampliação do espectro de RMN de ¹³C de IC1, entre δ_C 14,37 a δ_C 55,72.

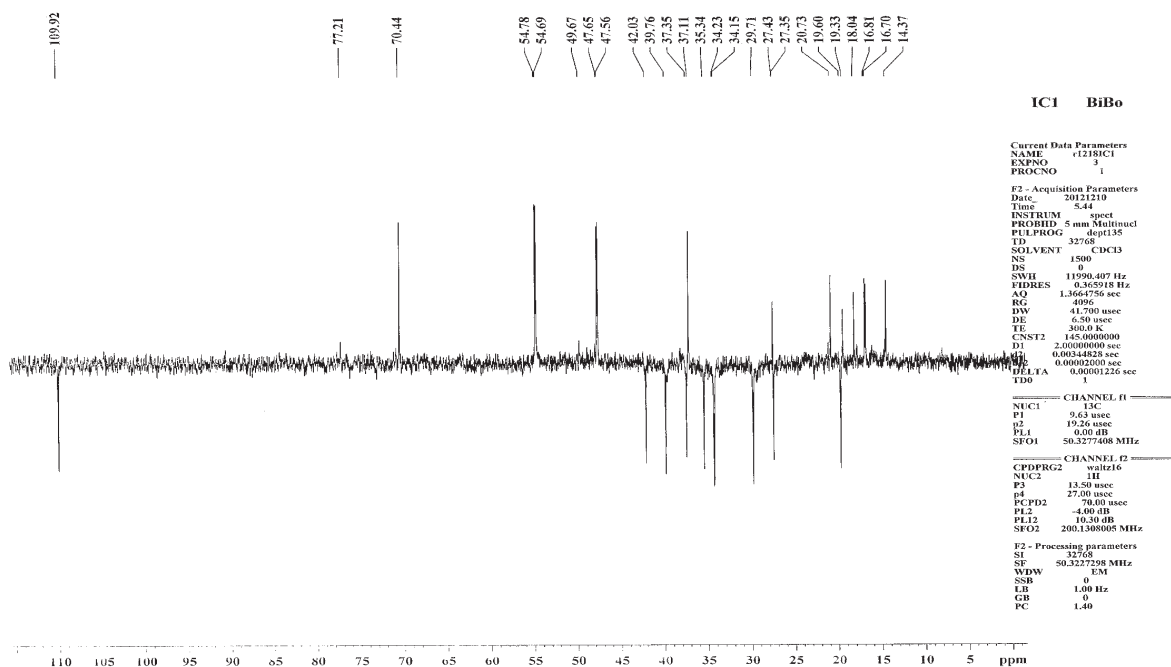


Figura 5.25: Subspectro DEPT de IC1 (CDCl₃, 50 MHz).

Tabela 5.5: Dados de RMN (CDCl₃, 50 MHz) de ¹³C de IC1 comparados com G5 e MS13 publicados na literatura

| C _n | DEPT | IC1 δ _C | G5 δ _C (SILVA, 2007) | MS13 δ _C (MAGALHÃES, 2012) |
|----------------|-----------------|-----------------------|------------------------------------|--|
| 1 | CH ₂ | 42,02 | 42,07 | 42,1 |
| 2 | CH ₂ | 34,14 | 34,21 | 34,2 |
| 3 | C | 218,93 | 218,84 | 219,0 |
| 4 | C | 47,31 | 47,63 | 47,9 |
| 5 | CH | 54,77 | 54,76 | 54,8 |
| 6 | CH ₂ | 19,60 | 19,64 | 19,6 |
| 7 | CH ₂ | 34,23 | 34,27 | 34,2 |
| 8 | C | 42,55 | 42,41 | 42,4 |
| 9 | CH | 54,68 | 54,87 | 54,9 |
| 10 | C | 38,13 | 38,20 | 38,5 |
| 11 | CH | 70,44 | 70,49 | 70,8 |
| 12 | CH ₂ | 37,35 | 37,44 | 37,5 |
| 13 | CH | 37,10 | 37,17 | 37,2 |
| 14 | CH ₂ | ----- | 42,16 | 42,7 |
| 15 | CH ₂ | 27,34 | 27,41 | 27,5 |
| 16 | CH ₂ | 39,75 | 35,40 | 39,8 |
| 17 | C | 43,00 | 43,05 | 42,9 |
| 18 | CH | 47,58 | 47,63 | 47,6 |
| 19 | CH | 47,65 | 47,70 | 47,7 |
| 20 | C | 150,18 | 150,20 | 150,5 |
| 21 | CH ₂ | 29,70 | 29,78 | 29,7 |
| 22 | CH ₂ | 35,34 | 39,80 | 35,4 |
| 23 | CH ₃ | 27,43 | 27,46 | 27,4 |
| 24 | CH ₃ | 20,73 | 20,77 | 20,8 |
| 25 | CH ₃ | 16,69 | 16,71 | 16,7 |
| 26 | CH ₃ | 16,81 | 16,86 | 16,9 |
| 27 | CH ₃ | 14,37 | 14,42 | 14,7 |
| 28 | CH ₃ | 18,04 | 18,08 | 18,1 |
| 29 | CH ₂ | 109,92 | 109,95 | 110,2 |
| 30 | CH ₃ | 19,32 | 19,37 | 19,4 |

REFERÊNCIAS

- DUARTE, L. P., Estudo Químico, estrutural e da atividade antibacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austropankia populnea*, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX- UFMG, **Tese de Doutorado**, 243p, 2000.
- MAGALHÃES, C. G., Estudo fitoquímico do tronco e raiz de *Maytenus salicifolia* Reissek (Celastraceae) e avaliação da atividade biológica de seus constituintes e de ésteres derivados do lupeol, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG, **Tese de Doutorado**, 186p., 2012.
- MAHATO, S. B. e KUNDU, A. P., ^{13}C NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features, **Phytochemistry**, v. 37, n. 6, p.1517-1575, 1994.
- MUTAI, C., ABATIS, D., VAGIAS, C., MOREAU, D., ROUSSAKIS, C., ROUSSIS, V., Lupane Triterpenoids from *Acacia mellifera* with cytotoxic activity, **Molecules**, v.12, p. 1035-1044, 2007.
- SILVA, S. R. S. Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico e herbicida de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek, Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG, **Tese de Doutorado**, 226p., 2007.
- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. AND KIEMLE, D. J. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 7th Edition. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ. USA.. 2005. 502p.
- SHAHLAEI, M., GHANADIAN, S. M., AYATOLLAHI, A. M., MESAIK, M. A., ABDALLA, O. M., AFSHARYPOUR, S., RABBANI, M., Molecular modeling, structure activity relationship and immunomodulatory properties of some lupeol derivatives, **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 1795-1803, 2013.

5.2 Fungos isolados de folha, caule, raiz e fruto de *M. imbricata*

Colônias de fungos endofíticos foram isoladas de diferentes partes de *M. imbricata* e rotuladas de acordo com a sua origem, utilizando o seguinte código: de folhas (F), caule (C), raiz (R) e frutos (Fr) de *M. imbricata* (MI). Foram isoladas 45 colônias, sendo 26 de folhas (MIF), 12 de caule (MIC), 3 de frutos (MIFR) e 4 de raiz (MIR) (Tabela 5.6).

De acordo com o formato, dimensão, coloração e outros aspectos macroscópicos da colônia, foi observado que MIF-13 e MIF-26, isolados de folhas, foram semelhantes à MIC-19 isolado de caule. O mesmo ocorrendo entre MIF-8, MIF-29, MIF-31 e MIC-4, MIC-11, MIC-17, MIC-20, MIC-22 e MIC-23 (Fig. 5.26). Como exemplo, na Figura 5.27 foi inserido fotos de fungos endofíticos isolados de folhas, caule, raiz e fruto de *M. imbricata*.

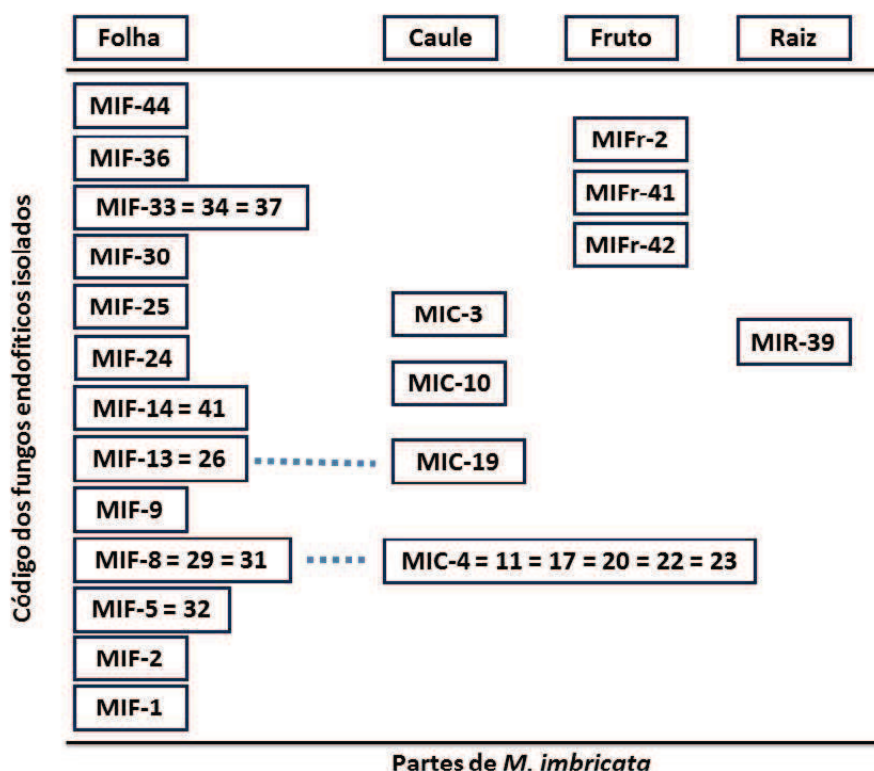


Figura 5.26: Agrupamento de fungos endofíticos macroscopicamente semelhantes isolados de *M. imbricata*.

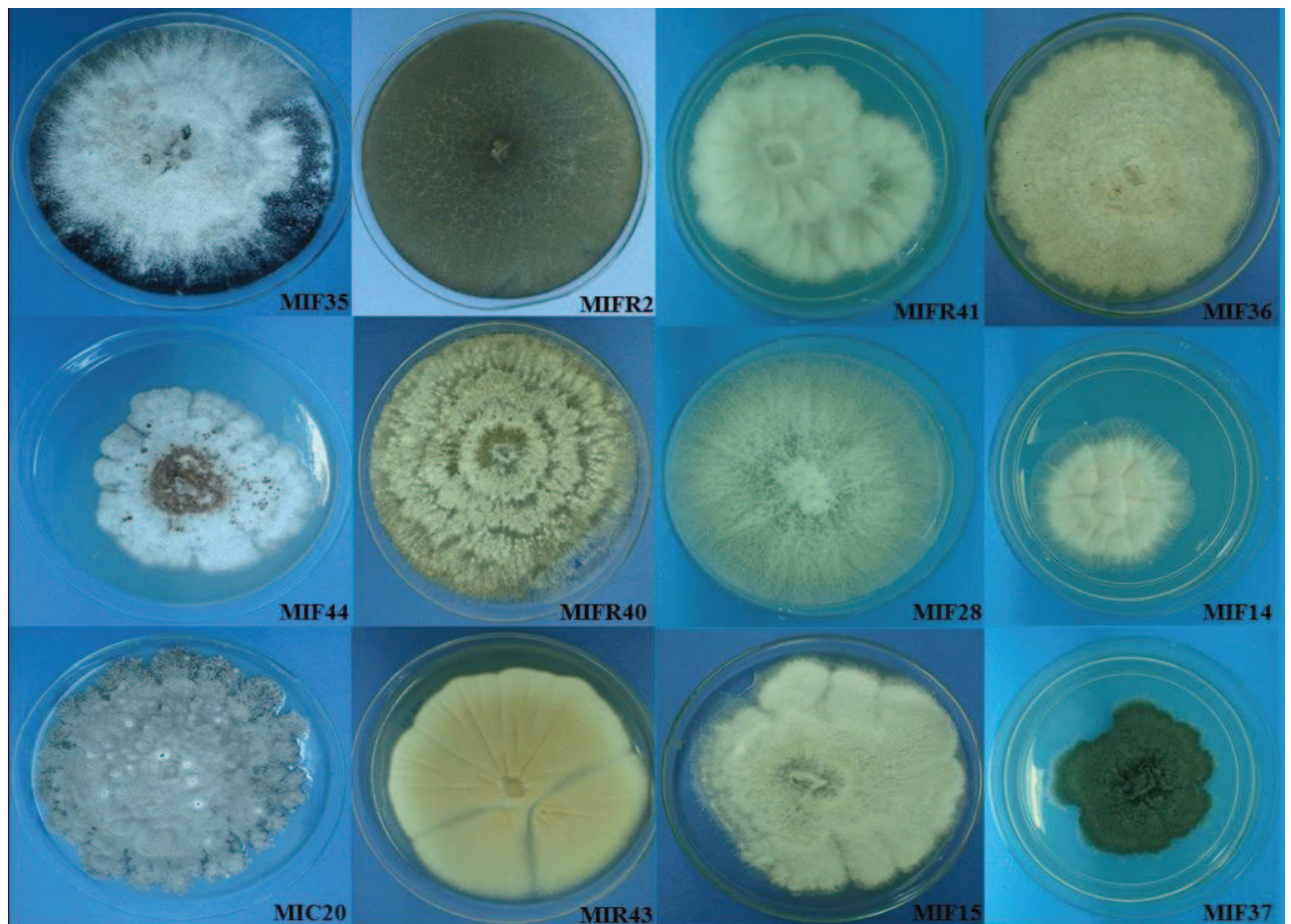


Figura 5.27: Foto de fungos isolados de caule (MIC), folhas (MIF), raiz (MIR) e frutos (MIFR) de *Maytenus imbricata* cultivados em meio BDA.

Notou-se uma mudança em relação à coloração e ao formato de algumas colônias, tais como visualizado no cultivo de MIR43 após 72 h e 360 h (Fig. 5.28). Esta mudança no aspecto morfológico macroscópico do fungo foi atribuída à exaustão dos nutrientes disponíveis no meio de cultivo BDA, o que é comum durante a fase estacionária e de declínio observada no crescimento de microrganismos (PELCZAR, 1996).

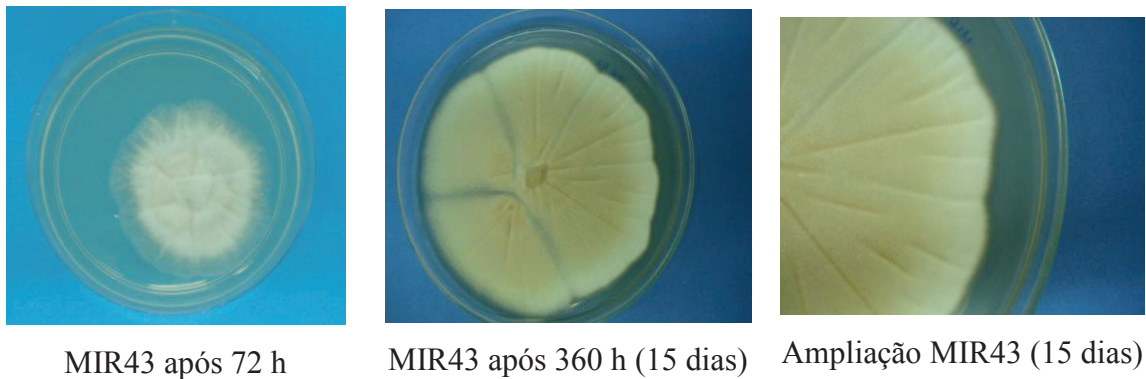


Figura 5.28: Mudança de coloração observada na colônia do fungo MIR43 após 72 h e 360 h (15 dias) de cultivo em meio BDA. À direita, uma ampliação da foto obtida após 360h.

Com base nas observações macroscópicas, foram separadas 45 colônias de fungos endofíticos isoladas de *M. imbricata* (Tabela 5.6).

Para a identificação de fungos é importante que estes apresentem características tais como hifas e forma de esporulação bem definidas (PELCZAR, 1996). Para obter fungos endofíticos de *M. imbricata* que apresentem tais características, estes foram submetidos à microcultivo em lâmina e lamínula, contendo meio fubá, que é pobre em nutrientes, durante 16 ± 3 dias, tempo prolongado o suficiente para a ocorrência de esporulação dos fungos.

Depois de confeccionadas, as lâminas foram enviadas para a Profa. Dra. Sueli Fumie Ogatta da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, para a identificação dos fungos endofíticos de *M. imbricata*. Como não foi possível a identificação dos fungos por microscopia, será utilizada técnicas de biologia molecular para esta identificação em estudos futuros.

Tabela 5.6: Códigos das colônias de fungos endofíticos de folhas, caule, raiz e frutos de *M. imbricata*, listados de acordo com a ordem de isolamento

| Códigos dos fungos, por ordem de isolamento | Local de origem | Códigos dos fungos, por ordem de isolamento | Local de origem |
|--|------------------------|--|------------------------|
| MIF 1 | Folha | MIC 23 | Caule |
| MIFR 2 | Fruto | MIF 24 | Folha |
| MIC 3 | Caule | MIF 25 | Folha |
| MIC 4 | Caule | MIF 26 | Folha |
| MIF 5 | Folha | MIF 27 | Folha |
| MIF 6 | Folha | MIF 28 | Folha |
| MIF 7 | Folha | MIF 29 | Folha |
| MIF 8 | Folha | MIF 30 | Folha |
| MIF 9 | Folha | MIF 31 | Folha |
| MIC 10 | Caule | MIR 32 | Raiz |
| MIC 11 | Caule | MIF 33 | Folha |
| MIF 12 | Folha | MIF 34 | Folha |
| MIF 13 | Folha | MIF 35 | Folha |
| MIF 14 | Folha | MIF 36 | Folha |
| MIF 15 | Folha | MIF 37 | Folha |
| MIC 16 | Caule | MIF 38 | Folha |
| MIC 17 | Caule | MIR 39 | Raiz |
| MIC 18 | Caule | MIFR 40 | Fruto |
| MIC 19 | Caule | MIFR 41 | Fruto |
| MIC 20 | Caule | MIF 42 | Folha |
| MIC 21 | Caule | MIR 43 | Raiz |
| MIC 22 | Caule | MIF 44 | Folha |

5.3 Análise por CG-EM dos extratos dos fungos endofíticos de *M. imbricata*

Num primeiro momento, foram obtidos extratos metanólicos das 44 colônias de fungos isoladas de *M. imbricata*. Em função do tempo gasto no processo de evaporação restante do solvente extrator ocorreu a contaminação de vários extratos, por fungos não endofíticos, presentes no meio ambiente. Esta contaminação aconteceu em função da evaporação do restante do metanol, feita à temperatura ambiente, e da presença de meio aquoso remanescente, ainda contendo nutrientes oriundos do meio de cultivo. Os extratos metanólicos que não sofreram contaminação foram submetidos à secagem forçada, com fluxo ar quente e, depois, analisados por CG-EM. Em função desta possível contaminação, passou-se a utilizar acetato de etila como solvente extrator. Foi possível analisar por CG-EM, extratos acetato etila e metanólicos obtidos de 22 colônias isoladas de *M. imbricata*. (Fig. 5.29)

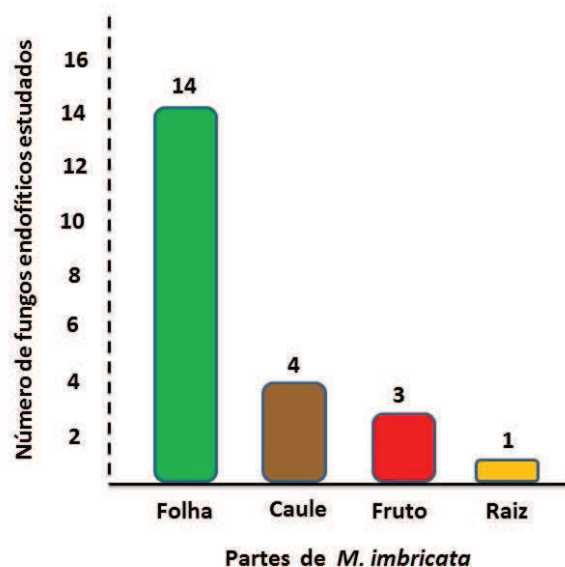


Figura 5.29: Número de fungos endofíticos isolados de *M. imbricata*, separados de acordo com sua origem, cujos extratos foram analisados por CG-EM.

No extrato acetato de etila e metanólico foram identificados, por CG-EM, 27 compostos voláteis produzidos por fungos endofíticos isolados de *M. imbricata* (Tabela 5.7).

Os compostos, glicerol, ácido hexadecanóico e ácido eicosanóico também foram detectados no óleo de sementes de *M. imbricata* (SILVA, 2007), o que certamente contribui para estudos de simbiose entre estes dois organismos.

Tabela 5.7: Compostos voláteis identificados por CG-EM no extrato acetato de etila e metanólico* de cultura de fungos endofíticos isolados de *M. imbricata*

| Constituintes voláteis** | Tr (min) | Fungo endofítico de <i>M. imbricata</i> |
|-----------------------------------|----------|--|
| Acetato de 2-metilpropilester | 2.46 | MIF-1, MIF-7, MIF-13, MIF-24, MIR-32, MIF-33, MIF-34, MIC-3, MIC-4, MIC-10, MIC-11, MIC-17, MIC-18, MIC-19, MIC-21, MIC-22, MIC-23 |
| Acetato de butil ester | 2.68 | MIF-1, MIF-5, MIF-7, MIF-12, MIF-13, MIF-14, MIF-24, MIF-25, MIF-26, MIF-27, MIF-29, MIF-30*, MIF-32, MIF-33, MIF-34, MIF-35, MIF-36, MIF-38, MIF-42, MIF-44, MIC-16, MIC-3, MIC-4, MIC-10, MIC-11, MIC-17, MIC-18, MIC-19, MIC-21, MIC-22, MIC-23 |
| Glicerol | 4.22 | MIF-14, MIF-29, MIF-30*, MIF-38 |
| <u>Diglicerol</u> | 4.17 | MIF 25, MIF-29 |
| 6-Etil-2-metildecano | 5,63 | MIF-12 |
| Hidrazida ou ácido hidroxiacético | 2,99 | MIF-5, MIF-24*, MIF-29, MIF-31, MIF-33*, MIF-34, MIF-42, MIF-44 |
| 2,5,6-Trimetildecano | 4.38 | MIF-24*, MIF-42 |
| 2,5,9-Trimetildecano | 4.39 | MIF-25, MIF-35, MIF-36 |
| 2,6,7-Trimetildecano | 4.40 | MIF-26, MIF-33*, MIF-44 |
| 3,3-Dimetil-pentano | 2.53 | MIC-20 |
| n-Hexanal | 2.63 | MIF-27 |
| O-Decil-hidroxilamina | 4.39 | MIF-22*, MIF-29 |

Continua ...

... Continuação da Tabela 5.7 ...

| | | |
|--|-------|---------------|
| Biciclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,5,5-trimetil | 16.82 | MIF-5 |
| O-2-Metilpropilhidroxilamina | 4.39 | MIF-30* |
| 4-Metil-1,3-dioxano | 2.92 | MIF-22* |
| Monoacetate de 1,2,3-propanotriol | 4.08 | MIF-31 |
| Acetato de dietoximetila | 4.17 | MIF-31 |
| 1,1-Dimetil-ciclopentano, | 2.63 | MIC-20 |
| 3,5-Dimethyl-hexane-1,3,4-triol | 2.92 | MIF-34* |
| Hidrazida do acido valerico | 4.39 | MIF-34* |
| 4,4-Dimetil-2-pentil-2-oxazolina | 8.81 | MIF-34* |
| Acetil tributil citrato | 18.46 | MIC-20 |
| Acido hexadecanóico | 19,59 | MIC-20 |
| Acido eicosanóico | 18,54 | MIC-20 |
| Acido hexanodioico, bis(2-ethylhexyl) ester | 19.58 | MIC-20, MIC-3 |
| Sitosterol | 29.15 | MIC-20 |
| 2,4-Dimetil-penteno | 2.47 | MIC-20 |
| 3,7,11-Trimetil-1-dodecanol | | MIC-20 |
| 2-Hidroxi-1-(hidroximetil)etil ester | 20.20 | MIF-30 |
| 1b,4a-Epoxy-2H-cyclopenta [3,4] cyclopropa [8,9]cycloundec [1,2-b]oxiren- 5(1aH)-one | 23.94 | MIF-30 |

* Extrato metanólico. ** Identificados por CG-EM/NIST

Os espectros de massas de alguns constituintes isolados de fungos endofíticos estão representados abaixo, a título de exemplo (Fig. 5.30).

5. Resultados e discussão.

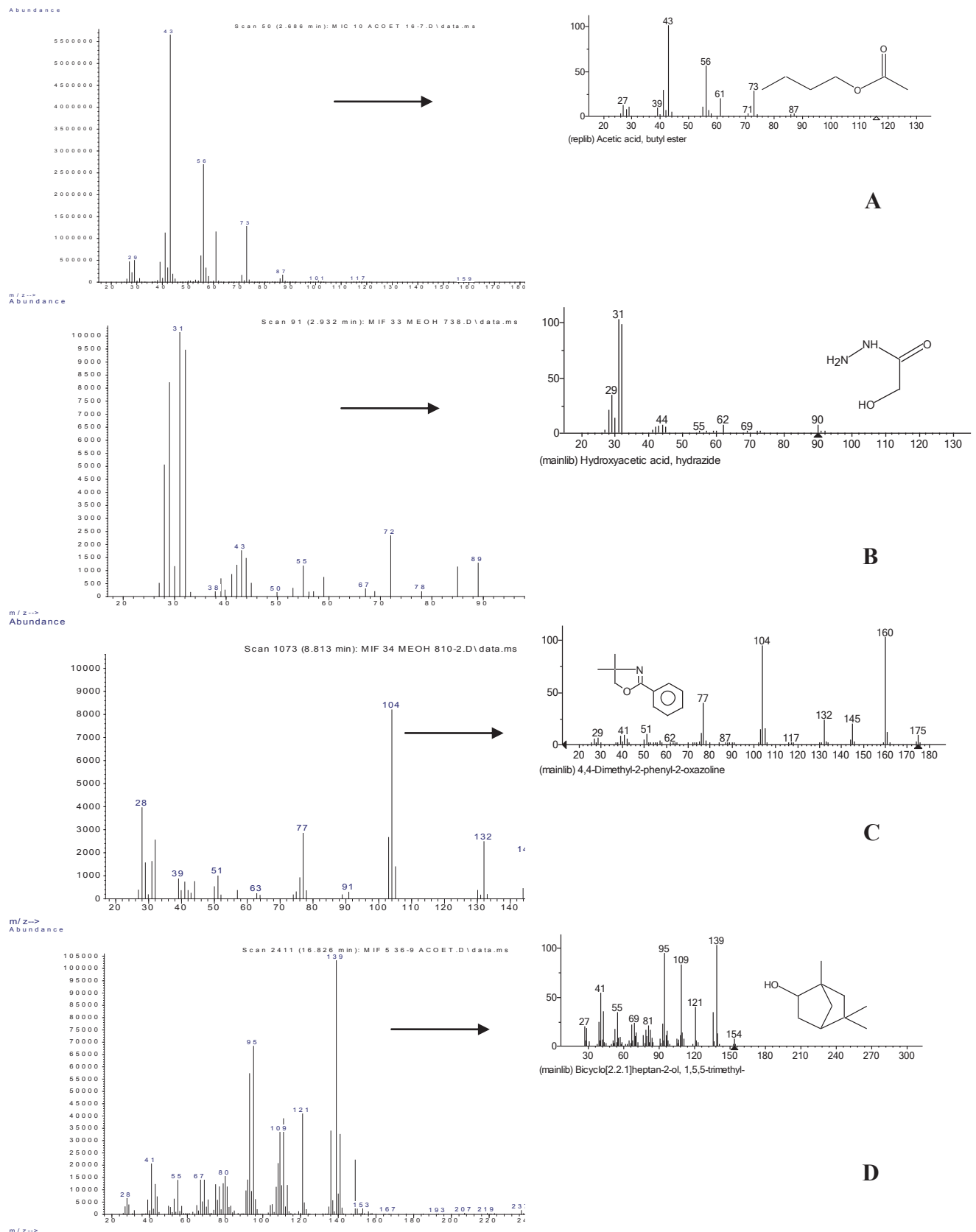


Figura 5.30: Espectros de massas de constituintes isolados de fungos endófitos de *M.imbricata* e comparação com dados do banco de dados NIST. A) ácido acético butil éster, B) ácido hidroxiaacético hidrazida, C) 4,4-dimetil-2-fenil-oxazolina, D) 1,5,5-trimetil-biciclo-2,2,1-heptan-2-ol.

A análise comparativa do perfil de cada cromatograma obtido por CG permitiu a identificação e agrupamento de fungos com características químicas similares.

SANTOS FILHO (2010), em seu trabalho de mestrado, identificou, por CG-EM, constituintes de extratos obtidos de fungos endofíticos do gênero *Penicillium* e *Xylaria*. Alguns destes constituintes, tais como aldeídos, ácidos graxos de cadeia longa, esteróides e alcoóis, também foram identificados em extratos obtidos de colônias de fungos endofíticos isoladas de *M. imbricata*, tais como biciclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,5,5-trimetil, sitosterol, hexanal, ácido hexadecanóico, ergosterol, decanal. (Fig. 5.31). Fungos endofíticos com perfil químico semelhante nos sugerem que estes podem pertencer a um mesmo gênero ou espécie.

Outro fato interessante foi o fato de terem sido identificados compostos em extratos de fungos endofíticos de *M. imbricata*, que anteriormente também foram isolados por estudos fitoquímicos desta planta hospedeira. Este fato está relacionado com um fenômeno conhecido por “Transferência Genética Horizontal”, que é definido como sendo a habilidade que alguns fungos endofíticos adquiriram em produzir as mesmas substâncias sintetizadas pela planta, E, é caracterizado pela troca de material genético entre células do fungo endofítico e da planta hospedeira (BROWN, 2003).

Alguns constituintes identificados nos extratos de fungos endofíticos isolados de *M. imbricata* possuem amplas aplicações na indústria. Os citratos têm uso restrito devido ao seu custo elevado. O acetil-tributil citrato é usado como plastificante, para aumentar a dureza do PLA, um polímero biodegradável, mas frágil a temperatura ambiente (QUERO, 2009). Na indústria farmacêutica seu uso é limitado em função do seu alto custo de aquisição. O hexanal é utilizado como aromatizante (SHAHIDI, 1987) na indústria alimentícia. O β -sitosterol é um constituinte com ação comprovada na redução dos níveis de colesterol (BECKER, 1993).

Neste contexto, fungos endofíticos representam potencial para ser fonte de metabólitos secundários que podem ser utilizados na indústria química, alimentícia e farmacêutica.

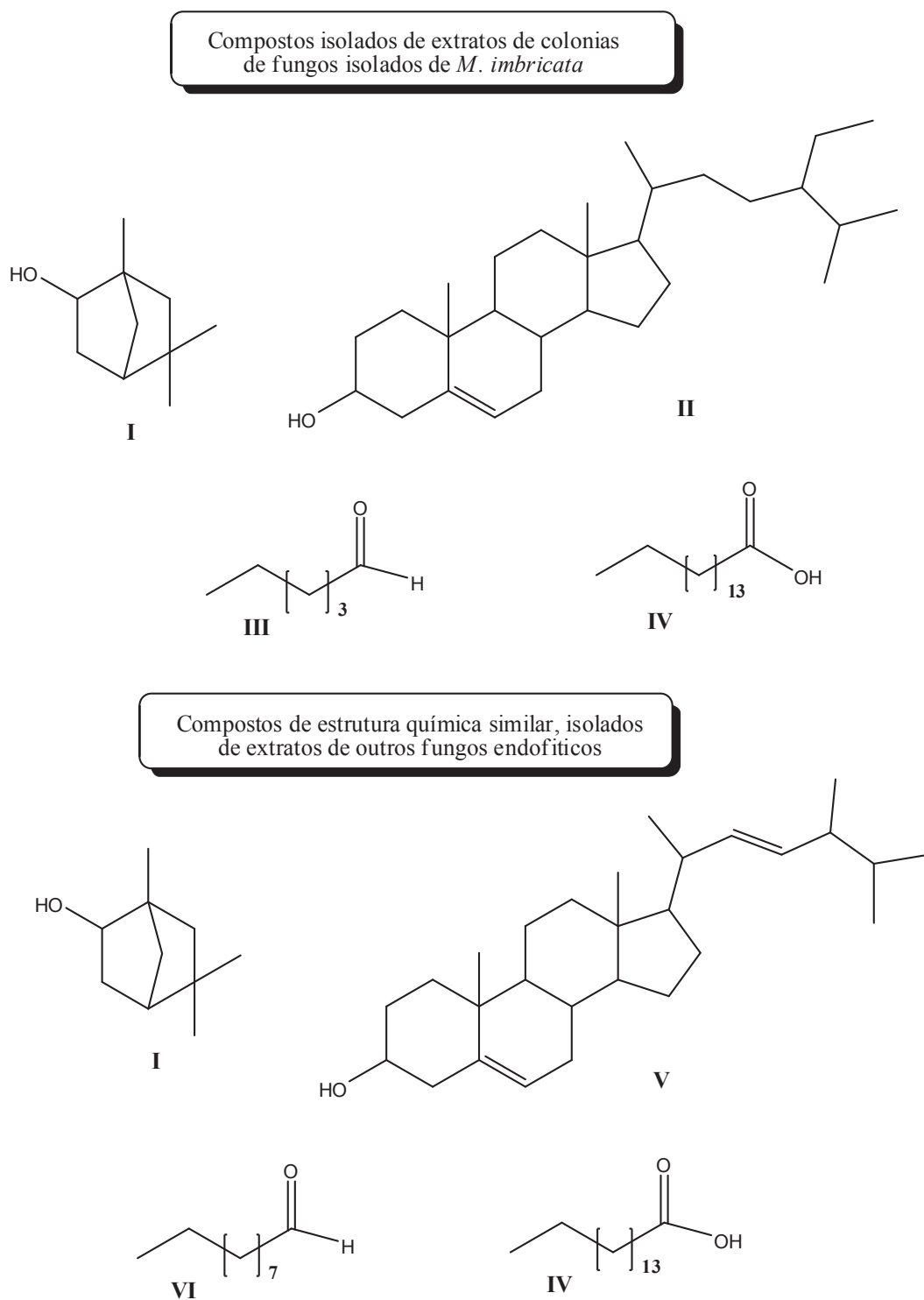


Figura 5.31: Constituintes identificados em extratos de colônias de fungos endofíticos isolados de *M. imbricata* e de *Xylaria sp.* e *Penicilium sp.* **I** = Biciclo[2.2.1]heptan-2-ol,1,5,5-trimetil, **II** = sitosterol, **III** = hexanal, **IV** = ácido hexadecanóico, **V** = ergosterol, **VI** = decanal.

6. Conclusão

Dando continuidade ao estudo químico de *Maytenus imbricata*, por cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa, foram isolados 5 constituintes, com grau de pureza adequado. Através da análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C conclui-se que os 5 constituintes isolados pertencem à classe dos triterpenos pentacíclicos lupano.

Através de técnicas de isolamento e cultivo em Agar batata dextrosado, foram isolados 44 colônias de fungos endofíticos de diferentes partes de *M. imbricata*.

Através de observação macroscópica das colônias e da análise do perfil químico, os fungos endofíticos foram reunidos em dezenove grupos, sugerindo que os mesmos possam pertencer a um mesmo gênero.

Foi realizado microcultivo utilizando meio pobre em nutrientes, através do qual foi possível confeccionar lâminas de cada colônia. Estas lâminas foram enviadas para a Universidade Estadual de Londrina, para análise e tentativa de identificação do gênero e espécie de fungo endofítico.

Após cultivo em pequena escala, foram obtidos 88 extratos com metanol e com acetato de etila, os quais foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Para a identificação de constituintes químicos produzidos pelos fungos, foi utilizado o banco de dados NIST. Nos extratos de fungos endofíticos de *M. imbricata* foram identificados 27 compostos. Dentre estes, três também foram identificados na planta.

7. Perspectivas

Os resultados deste trabalho certamente abrem boas perspectivas, tais como o isolamento de constituintes ativos a partir destes extratos, utilizando outras técnicas, como, por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência, e realização de testes de avaliação da atividade biológica dos extratos dos fungos endofíticos de *M. imbricata*.

REFERÊNCIAS

- BECKER, M., STAAB, D., VON BERGMANN, K., Treatment of severe familial hypercholesterolemia in childhood with sitosterol and sitostanol, **The Journal of Pediatrics**, v.122, p. 292-296, 1993.
- BROWN, J.R, Ancient horizontal gene transfer, **Nature Reviews Genetics**, v.4, p.121-132, 2003.
- SANTOS FILHO, F.C., Análise dos constituintes fixos e voláteis de fungos endofíticos dos gêneros *Penicillium* e *Xylaria* e de suas plantas hospedeiras, São Carlos, Departamento de Química, UFSCar, **Dissertação de Mestrado**, 180p., 2010.
- SILVA, S. R. S. Estudo químico e avaliação do potencial farmacológico e herbicida de *Maytenus imbricata* Mart. ex. Reissek. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEX, UFMG, **Tese de Doutorado**, 226p., 2007,
- NIST. *Standard Reference Database*. Mass Spectral Search Program (Version 2.0)
- PELCZAR, M., KRIEG, N., *Microbiologia – conceitos e Aplicações*. 2ª Edição, Makron Books do Brasil Lda. 1996
- QUERO, E., MULLER, A., COLTELLI, M.B., SIGNORI, F., BRONCO, S., Influencia del citrato de acetil tributilo sobre las propiedades térmicas y mecánicas de mezclas PLA/PBAT, **Suplemento de la Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales**, v.1, p. 51-52, 2009.
- SHAHIDI, F., YUN, J., RUBIN, L.J., The hexanal content as an indicator of oxidative stability and flavour acceptability in cooked ground pork, **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 20, p. 104-106, 1987.