



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

FRANCISCO OTÁVIO DA ROCHA CAVALCANTE

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Nephrolepis brownii* E DA
BIOMASSA PRODUZIDA PELO FUNGO ENDOFÍTICO NB-1 ASSOCIADO À
ESPÉCIE**

BELÉM - PA

2016

FRANCISCO OTÁVIO DA ROCHA CAVALCANTE

**ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Nephrolepis brownii* E DA
BIOMASSA PRODUZIDA PELO FUNGO ENDOFÍTICO NB-1 ASSOCIADO À
ESPÉCIE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Química.

Área de concentração: Química de Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos

Co-orientadora: Prof. Dra. Giselle Maria Skelding P. Guilhon

BELÉM-PA

2016

FRANCISCO OTÁVIO DA ROCHA CAVALCANTE

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Nephrolepis brownii* E DA BIOMASSA PRODUZIDA PELO FUNGO ENDOFÍTICO NB-1 ASSOCIADO À ESPÉCIE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Química. Área de concentração: Química de Produtos Naturais. Orientador: Prof.Dr. Lourivaldo da Silva Santos.
Co-orientadora: Prof. Dra. Giselle Maria Skelding P. Guilhon

Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos
PPGQ – ICEN – UFPA – Orientador

Prof. Dra. Giselle Maria Skelding Pinheiro Guilhon
PPGQ – ICEN – UFPA – Co-orientadora

Prof. Dr. Marivaldo José Costa Côrrea
FQ – ICEN – UFPA – Membro

Prof. Dr. Davi do Socorro Barros Brasil
PPGQ – ICEN – UFPA – Membro

Prof. Dr. Eloísa Helena de Aguiar Andrade
PPGQ – ICEN – UFPA – Membro

Prof. Dr. Haroldo da Silva Ripardo Filho
IFAP – Membro

Apresentado em ____ / ____ / 2016.

Conceito: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus pela existência e permitir ter saúde durante toda a caminhada.

Aos meus pais Francisco Otávio Cavalcante Filho e Sandra M^a F. da Rocha Cavalcante que iniciaram o processo de aprendizado em minha vida e formação do meu caráter. A todos meus familiares.

À Elaine Cristina A. Amaral, pelo apoio e compreensão durante a minha vida acadêmica.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de pós-graduação em química, pela estrutura para a realização desta pesquisa.

Ao Professor Dr. Lourivaldo da Silva Santos, por suas contribuições e esforços para a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Gisele Guilhon, pela paciência e ensinamentos durante este processo.

Ao Professor Doutor Marivaldo Costa Corrêa, por suas contribuições. À Professora Dr. Eloísa Helena pela ajuda na extração do óleo essencial da planta.

Ao Elinaldo Sampaio e Fernanda Santos por se disporem na prática de RMN para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Williams Ribeiro, Fabiane Pinto, Luely Oliveira, Fábio Rogério, Paulo Bezerra, Manoel Leão, Rafael Oliveira, Maycow Leão, Luiz Mendes, Railda Moreira e demais que ajudaram na realização deste trabalho; que no dia-a-dia faziam quebrar o stress das atividades; os quais tivemos longas horas de conversas e interações em nível científico, cultural, social, político, humorístico, musical etc. Vocês foram essenciais na construção de novos conhecimentos.

“A lei de ouro do comportamento é a tolerância mútua, já que nunca pensaremos todos da mesma maneira, já que nunca veremos senão uma parte da verdade e sob ângulos diversos.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

A espécie *Nephrolepis brownii*, conhecida popularmente como samambaia, pode ser facilmente encontrada na região amazônica. É uma espécie rasteira, que se espalha facilmente e inibe plantas de pequeno porte ao seu redor. *N. brownii* assim como as demais samambaias são conhecidas também como “escadinha do céu”, as quais são muito utilizadas como plantas ornamentais e fins medicinais. Este é o primeiro trabalho onde é realizado o estudo químico de *N. brownii*, de onde foram isoladas as substâncias Ferneno (**S1**) e Pinitol (**S2**) das partes aéreas da mesma. No estudo do óleo essencial de *N. brownii* foram identificadas 80 substâncias, a maioria pertencentes às funções aldeído (26,62%), álcool (25,11%) e cetona (17,15%), dentre esses Z-2-(3,3-dimetilciclohexilidene)-etanol (8,65%), safrol (8,81%), undecan-2-ona (8,89%), teaspirano (8,99%), n-tridecano (9,05%), n-undecanal (9,20%), o-metil-orcinol (9,32%) e deca-(2E,4E)-dienal (9,41%) foram majoritários. Das partes aéreas de *N. brownii* foi isolado como endofítico o fungo denominado **NB-1**, o qual foi cultivado em meio sólido (arroz) e em meio líquido (czapek) para o crescimento das colônias e obtenção dos extratos fúngicos. A partir do extrato fúngico acetato de etila (arroz) foram isoladas as substâncias *p*-hidróxibenzaldeído (**S3**), ácido *p*-hidroxifenilacético (**S4**) e ácido 4-hidroxibenzóico (**S5**). A partir do cultivo em meio líquido (czapek) foram isoladas as substâncias peróxido de ergosterol (**S6**) e stoloniferol B (**S7**) ambas das fases acetato de etila (1 e 2). O fungo **NB-1** se mostrou capaz de biotransformar substâncias como a chalcona 3-(2,3,4-trimetoxifenil)-1-(4-metóxi)-2-propen-1-ona e a cetona aromática 4-nitroacetofenona. Foram realizados ensaios para avaliar a fitotoxicidade dos extratos e substâncias frente às sementes das espécies invasoras de pastagem malícia e mata-pasto, onde os melhores resultados foram para os extratos EBM/Hex, EBM/AcOEt e EBM/n-But, destacando o EBM/AcOEt que teve 100% de inibição frente à germinação das sementes de malícia. O extrato EFMEOH apresentou efeito inibitório considerável sobre a germinação das sementes de malícia e mata-pasto, sendo valores elevados, 75% e 100%, respectivamente. As substâncias testadas não apresentaram resultados satisfatórios frente às sementes de malícia e mata-pasto. Foi investigado o potencial biológico das substâncias **S1**, **S2**, **S3** e **S5**, onde não foram ativas para a espécie *L. amazonensis* em sua forma promastigota.

Palavras-chave: *Nephrolepis brownii*, Ferneno, Pinitol, Stoloniferol B, Endofítico.

ABSTRACT

The species *Nephrolepis brownii*, commonly known as fern, can be easily found in the Amazon region. It is a creeping species, which spreads easily and inhibits small around plants. *N. brownii* like other ferns are also known as "sky ladder", which are widely used as ornamental plants and medicinal purposes. This is the first work which is carried out the chemical study of *N. brownii*, where the Fernene substances were isolated (**S1**) and Pinitol (**S2**) from the aerial parts of it. In the study of the essential oil of *N. brownii* were identified 80 substances, most belonging to the aldehyde functions (26.62%), alcohol (25.11%) and ketone (17.15%), among those Z-2-(3,3-dimethylcyclohexylidene)-ethanol (8.65%), safrole (8.81%) undecan-2-one (8.89%), teaspirano (8.99%), n-tridecane (9.05%), n-undecanal (9.20%), o-methyl-orcinol (9.32%) and deca-(2E,4E)-dienal (9.41%) were majority. Aerial parts of *N. brownii* was isolated as endophytic fungus called **NB-1**, which was grown on solid medium (rice) and liquid medium (Czapek) for the growth of fungal colonies and obtain extracts. From the ethyl acetate extract fungal (rice) were isolated p-Hydroxybenzaldehyde substances (**S3**), p-hydroxyphenylacetic acid (**S4**) and 4-hydroxybenzoic acid (**S5**). From the culture in liquid medium (Czapek) were isolated substances ergosterol peroxide (**S6**) stoloniferol B (**S7**) both phases ethyl acetate (1 and 2). The **NB-1** fungus has been shown to biotransform substances such as chalcone 3-(2,3,4-trimethoxyphenyl)-1-(4-methoxy)-2-propen-1-one and aromatic ketone 4-nitroacetophenone. Tests were conducted to evaluate the phytotoxicity of extracts and compounds in the face of evil seeds and kills pasture where the best results were for EBM/Hex, EBM/EtOAc and EBM/n-But extracts, highlighting the EBM / AcOEt had 100% inhibition against the germination of seeds of malice. The EFMethOH extract showed significant inhibitory effect on the germination of seeds of malice and kill pasture, with high values, 75% and 100%, respectively. The substances tested showed no satisfactory results in the face of evil seeds and kills pasture. It investigated the biological potential of the substances **S1**, **S2**, **S3** and **S5**, which have not been active for *L. amazonensis* promastigote form a species.

Keywords: *Nephrolepis brownii*, Fernene, Pinitol, Stoloniferol B, Endophytic.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química de substâncias isoladas de <i>Nephrolepis exaltata</i> e <i>Nephrolepis cordifolia</i> .	28
Figura 2: Respresentação dos esporos presentes nas folhas de <i>Nephrolepis brownii</i>	29
Figura 3: Distribuição mundial (linha contínua preta) e distribuição nas Américas (linha contínua vermelha) da espécie <i>N. brownii</i>	31
Figura 4: Fotografia da Planta <i>Nephrolepis brownii</i>	31
Figura 5: <i>Promastigotas</i> de <i>Leishmania ammazonensis</i>	33
Figura 6: Estrutura química da Penicilina.	35
Figura 7: Estrutura química do Taxol.	35
Figura 8: Biotransformação da cortexolona pelos fungos <i>Cunninghamella blakesleeana</i> e <i>Curvularia luneta</i> .	37
Figura 9: Representação geral da reação de biotransformação.	38
Figura 10: Fluxograma de obtenção dos extratos orgânicos das partes aéreas de <i>Nephrolepis brownii</i>	42
Figura 11: Fluxograma de obtenção das fases hexânica, acetato de etila e n-butanólica a partir da partição do extrato metanólico.	43
Figura 12: Fluxograma de fracionamento do extrato EBM/Hex.	44
Figura 13: Fluxograma de fracionamento do extrato EBM/AcOEt.	45
Figura 14: Fungo NB-1 isolado a partir das partes aéreas de <i>Nephrolepis brownii</i> .	47
Figura 15: Fungo após repicagem.	48
Figura 16: Fluxograma de obtenção dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico do cultivo do fungo em arroz.	49
Figura 17: Fluxograma de fracionamento do EFAcOEt .	50
Figura 18: Fluxograma de obtenção dos extratos a partir do cultivo do fungo em meio líquido (Czapek).	52
Figura 19: Fluxograma do fracionamento extrato EFLAcOEt-1	53

Figura 20: Fluxograma do fracionamento extrato EFLAcOEt-2	53
Figura 21: Sistema reacional na mesa agitadora	55
Figura 22: Fluxograma de obtenção dos produtos da biotransformação	56
Figura 23: Germinação das sementes: (A) sementes de malícia; (B) sementes de mata-pasto	57
Figura 24: Desenvolvimento da radícula e hipocótilo: (A) sementes de malícia; (B) sementes de mata-pasto	58
Figura 25: Substâncias isoladas das partes aéreas de <i>Nephrolepsis brownii</i> e do fungo (NB-1) associado à espécie	61
Figura 26: Substâncias obtidas por reação de biotransformação.	62
Figura 27: Estrutura química do Ferneno (S1)	63
Figura 28: Espectro de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S1	66
Figura 29: Expansão do espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S1	67
Figura 30: Espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S1	68
Figura 31: Expansão do espectro de RMN de ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) de S1	69
Figura 32: Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl ₃) de S1	70
Figura 33: Expansão do espectro de DEPT (75 MHz, CDCl ₃) de S1	71
Figura 34: Estrutura química do Pinitol (S2)	73
Figura 35: Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO) de S2	74
Figura 36: Expansão do espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, DMSO) de S2 .	75
Figura 37: Espectro de RMN de ¹³ C (300 MHz, DMSO) de S2	76
Figura 38: Espectro de DEPT (75 MHz, DMSO) de S2	77
Figura 39: Espectro de COSY (300 MHz, DMSO) de S2	78
Figura 40: Espectro de HETCOR (DMSO) de S2	79

Figura 41: Expansão do espectro de HETCOR (DMSO) de S2	80
Figura 42: Expansão do espectro de HETCOR (DMSO) de S2	81
Figura 43: Cromatograma do óleo essencial de <i>Nephrolepis brownii</i>	82
Figura 44: Estrutura química do p-hidróxibenzaldeído (S3)	86
Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S3 .	87
Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S3	88
Figura 47: Estrutura química do ácido p-hidroxifenilacetico (S4)	90
Figura 48: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S4	91
Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S4	92
Figura 50: Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3) de S4	93
Figura 51: Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de S4	94
Figura 52: Espectro de HETCOR (CDCl_3) de S4	95
Figura 53: Espectro de HMBC (CDCl_3) de S4	96
Figura 54: Estrutura química ácido p-hidroxibenzóico (S5)	98
Figura 55: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S5	99
Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S5	100
Figura 57: Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3) de S5	101
Figura 58: Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de S5	102
Figura 59: Estrutura química do Peróxido de Ergosterol (S6)	103
Figura 60: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S6	104
Figura 61: Estrutura química do Stoloniferol B (S7)	105
Figura 62: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S7	107
Figura 63: Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S7	108
Figura 64: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S7	109

Figura 65: Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl ₃) de S7	110
Figura 66: Espectro de COSY (300 MHz, CDCl ₃) de S7	111
Figura 67: Expansão do espectro de COSY (300 MHz, CDCl ₃) de S7 .	112
Figura 68: Espectro de HETCOR (CDCl ₃) de S7	113
Figura 69: Espectro de HMBC (CDCl ₃) de S7	114
Figura 70: Reação de biorredução da chalcona S8	115
Figura 71: Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) da Chalcona S8	116
Figura 72: Espectro de RMN de ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) de S9 .	117
Figura 73: Reação de biorredução da 4-nitroacetofenona (S10)	118
Figura 74: Espectro de RMN de ¹ H da 4-nitroacetofenona (300 MHz, CDCl ₃)(S10)	119
Figura 75: Espectro de RMN de ¹ H do 4-nitrofeniletan-1-ol (300 MHz, CDCl ₃)(S11)	120
Figura 76: Efeito dos extratos EBH, EBM/Hex, EBM/AcOEt e EBM/n-But, na concentração de 50 ppm, sobre germinação das sementes de malícia e mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha (água destilada)	121
Figura 77: Efeito dos extratos EFHex, EFAcOEt e EFMeOH na concentração de 50 ppm, sobre germinação das sementes de malícia e mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição (valor positivo) e estímulo (valor negativo) em relação ao tratamento testemunha (água destilada).	122
Figura 78: Efeitos das substâncias S1 , S2 e S4 , na concentração de 150 ppm, (isoladas e em pares) sobre a germinação de sementes da planta daninha malícia (<i>Mimosa pudica</i>). Dados expressos em percentual de inibição (valor positivo) e estímulo (valor negativo) em relação ao tratamento testemunha.	123
Figura 79: Efeitos inibitórios das substâncias S1 , S2 e S4 , na concentração de 150 ppm, alongamento da radícula da planta daninha malícia. Dados expressos em percentual de inibição, em relação ao tratamento testemunha	125

Figura 80: Efeitos inibitórios das substâncias **S1**, **S2** e **S4**, na concentração de 150 ppm, sobre o alongamento do hipocótilo da planta daninha malícia. Dados expressos em percentual de inibição, em relação ao tratamento testemunha 125

Figura 81: Efeitos fitotóxicos de substâncias **S1**, **S2** e **S4** (isoladas e em pares), na concentração de 150 ppm, sobre a germinação de sementes da planta daninha mata-pasto (*Senna obtusifolia*). Dados expressos em percentual de inibição (positivo) e estímulo (negativo) em relação ao tratamento testemunha. 126

Figura 82: Efeitos das substâncias **S1**, **S2** e **S4** (isoladas e em pares), na concentração de 150 ppm, sobre o alongamento da radícula da planta daninha Mata-pasto (*Senna obtusifolia*). Dados expressos em percentual de estímulo, em relação ao tratamento testemunha. 127

Figura 83: Efeitos das substâncias **S1**, **S2** e **S4** (isoladas e em pares), na concentração de 150 ppm, sobre o alongamento da radícula da planta daninha mata-pasto (*Senna obtusifolia*). Dados expressos em percentual de estímulo, em relação ao tratamento testemunha 127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação taxonômica de <i>Nephrolepis brownii</i> .	30
Tabela 2: Meio Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura.	50
Tabela 3: Dados de RMN de ^1H (ppm, 300 MHz, CDCl_3) do triterpeno S1 , juntamente com os dados da literatura (BOTTARI, 1972), (ppm, 270 MHz, CDCl_3) para essa substância. Nos parênteses estão os valores das constantes de acoplamento em Hz.	63
Tabela 4: Dados de RMN de ^{13}C (ppm, 75 MHz, CDCl_3) do triterpeno S1 , juntamente com os dados da literatura (BOTTARI, 1972), (ppm, 68 MHz, CDCl_3).	64
Tabela 5: Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e COSY do pinitol juntamente com dados da literatura (BLANCO; FLORES; ALMANZA, 2008).	72
Tabela 6: Constituintes químicos do óleo essencial de <i>Nephrolepis brownii</i> por GC/EM	82
Tabela 7: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) juntamente com dados da literatura (GUBIANI, 2011) de S3 .	85
Tabela 8: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S4 juntamente com dados da literatura (ANDRIOLI, 2008).	89
Tabela 9: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S5 juntamente com dados da literatura (CHO et. al. 2014).	97
Tabela 10: Dados de RMN de S7 juntamente com dados da literatura (XIN et al., 2007).	105
Tabela 11: Interpretação dos resultados baseado na faixa do CIM e Cl_{50} .	127
Tabela 12: Cl_{50} das substâncias testadas em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .	127

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	Acetato de Etila
BDA	Batata, Dextose e Ágar
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
Cl ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	Correlated Spectroscopy
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo Dupleto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBH	Extrato Bruto Hexânico
EBM/AcOEt	Extrato Bruto Metanólico Fase Acetato de Etila
EBM/Hex	Extrato Bruto Metanólico Fase Hexânica
EBM/n-But	Extrato Bruto Metanólico Fase n-Butanólica
EFAcOEt	Extrato Fúngico Acetato de Etila
EFHex	Extrato Fúngico Hexânico
EFLAcOEt-1	Extrato Fúngico Fase Acetato de Etila 1
EFLAcOEt-2	Extrato Fúngico Fase Acetato de Etila 2
EFMeOH	Extrato Fúngico Metanólico
HETCOR	Heteronuclear Correlation

HMBC	Heteronuclear Spectroscopy Quantum Coherence
Hz	Hertz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
<i>m</i>	Multiplete
mg.L ⁻¹	Miligramas por litro
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
CMI	Concentração Mínima
ppm	Partes por Milhão
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H
<i>s</i>	Singleto
<i>t</i>	Triplete
δ	Deslocamento Químico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.1.1 Objetivos específicos	21
3 REFERENCIAL TEÓRICO	22
3.1 A FAMÍLIA LOMARIOPSIDACEAE	22
3.1.1 O gênero <i>Nephrolepis</i>	22
3.1.1.1 <i>Nephrolepis auriculata</i>	23
3.1.1.2 <i>Nephrolepis biserrata</i>	23
3.1.1.3 <i>Nephrolepis cordifolia</i>	24
3.1.1.4 <i>Nephrolepis hirsutula</i>	24
3.1.1.5 <i>Nephrolepis multiflora</i>	25
3.1.1.6 <i>Nephrolepis tuberosa</i>	26
3.1.2 Estudo químico do óleo essencial de espécies do gênero <i>Nephrolepis</i>	27
3.1.3 A espécie <i>Nephrolepis brownii</i>	29
3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE PROTOZOÁRIOS	32
3.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS	34
3.4 BIOTRANSFORMAÇÃO	36
3.5 ALELOPATIA	38
4 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	40
4.1 MATERIAIS	40
4.1.1 Equipamentos	40

4.1.2 Solventes utilizados na preparação dos extratos orgânicos e análises cromatográficas	40
4.1.3 Solventes utilizados na obtenção dos espectros de RMN	40
4.1.4 Técnicas cromatográficas	41
4.1.5 Substratos utilizados na biotransformação	41
4.2 ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>Nephrolepis brownii</i>	41
4.2.1 Coleta do material botânico	41
4.2.2 Obtenção dos extratos brutos de <i>Nephrolepis brownii</i>	42
4.2.3 Fracionamento dos extratos de <i>Nephrolepis brownii</i>	43
4.2.3.1 Fracionamento do extrato EBM/Hex	44
4.2.3.2 Fracionamento do extrato EBM/AcOEt	44
4.2.4 Estudo do óleo essencial de <i>N. brownii</i>	45
4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO DO FUNGO ENDOFÍTICO	46
4.3.1 Sobre o meio BDA	46
4.3.2 Preparação do meio BDA	46
4.3.3 Obtenção do fungo endofítico	46
4.3.4 Cultivo no cereal em larga escala (arroz)	48
4.3.4.1 Obtenção dos extratos em meio sólido	48
4.3.4.2 Fracionamento do extrato EFAcOEt	49
4.3.5 Cultivo em meio líquido (Czapek)	50
4.3.5.1 Obtenção dos extratos em meio líquido	51
4.3.5.2 Fracionamento extrato EFLAcOEt-1	52
4.3.5.3 Fracionamento extrato EFLAcOEt-2	53
4.4 TÉCNICA DE REAÇÃO DE BIOTRANSFORMAÇÃO	54

4.4.1 Reativação do microrganismo em placa de Petri	54
4.4.2 Preparação do meio de cultura líquido para cada biotransformação	54
4.4.3 Adição do fungo endofítico e do substrato ao meio de cultura	54
4.4.4 Filtração e Partição da solução resultante do meio de cultura	55
4.5 ATIVIDADE FITOTÓXICA	56
4.5.1 Bioensaio de germinação das sementes	56
4.5.2 Bioensaio de desenvolvimento de radícula e do hipocótilo	58
4.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA PARA <i>Leishmania amazonensis</i>	59
4.6.1 Preparação do meio RPMI 1640 para <i>Leishmania amazonensis</i>	59
4.6.2 Espécie de <i>Leishmania</i> e cultivo	59
4.6.3 Ensaio da Atividade Antipromastigota	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
5.1 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS PARTES AÉREAS DE <i>Nephrolepsis brownii</i> E DO FUNGO (NB-1) ASSOCIADO À ESPÉCIE	61
5.2 SUBSTÂNCIAS OBTIDAS POR REAÇÃO DE BIOTRANSFORMAÇÃO PROMOVIDA PELO FUNGO ENDOFÍTICO (NB-1) ASSOCIADO À <i>Nephrolepsis brownii</i>	62
5.3 IDENTIFICAÇÃO DO TRITERPENO FERNENO (S1)	63
5.4 IDENTIFICAÇÃO DO PINITOL (S2)	72
5.5 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS PARTES AÉREAS DE <i>Nephrolepis brownii</i>	82
5.6 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO FUNGO ENDOFÍTICO	85
5.6.1 Substâncias isoladas de extratos obtidos do cultivo do fungo endofítico em meio sólido (arroz)	85
5.6.1.1 Identificação do p-hidróxibenzaldeído (S3)	85
5.6.1.2 Identificação do ácido p-hidroxifenilacetico (S4)	89

5.6.1.3 Identificação do ácido 4-hidroxibenzóico (S5)	97
5.6.2 Substâncias isoladas de extratos obtidos do cultivo do fungo endofítico em meio líquido (Czapeck)	103
5.6.2.1 Identificação do peróxido de ergosterol (S6)	103
5.6.2.2 Identificação do stoloniferol B (S7)	105
5.7 REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO PROMOVIDA PELO FUNGO ENDOFÍTICO NB-1	115
5.7.1 Reação de biotransformação da chalcona S8	115
5.7.2 Reação de biotransformação da 4-nitroacetofenona (S10)	118
5.8 RESULTADOS DA ATIVIDADE FITOTÓXICA	121
5.8.1 Atividade fitotóxica dos extratos obtidos da biomassa produzida por <i>Nephrolepis brownii</i> frente à germinação das sementes de malícia e mata-pasto	121
5.8.2 Atividade fitotóxica dos extratos obtidos da biomassa produzida pelo fungo endofítico NB-1 frente à germinação das sementes de malícia e mata-pasto	122
5.8.3 Avaliação da atividade fitotóxica das substâncias, isoladamente e aos pares frente à germinação das sementes de malícia	123
5.8.4 Avaliação da atividade fitotóxica das substâncias, isoladamente e aos pares frente ao alongamento da radícula e hipocótilo da planta daninha malícia	124
5.8.5 Avaliação da atividade fitotóxica das substâncias, isoladamente e aos pares frente à germinação das sementes de mata-pasto	126
5.8.6 Avaliação da atividade fitotóxica das substâncias, isoladamente e aos pares frente ao alongamento da radícula e hipocótilo da planta daninha mata pasto	126
5.6 ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA	128
6 CONCLUSÕES	129
REFERÊNCIAS	131

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial, novas tecnologias vêm surgindo com o intuito de melhorar e aumentar a produção de alimentos. Esse é um mercado que eleva seu custo ao passar dos anos e se torna cada vez mais competitivo, devido diversos fatores, como a grande demanda do uso de fertilizantes, adubos, herbicidas, irrigação etc. Isso acontece pelo desgaste natural que o solo sofre com o passar do tempo e por outros fatores ambientais provenientes do crescimento populacional desordenado.

A utilização de substâncias sintéticas como fertilizantes e herbicidas na agropecuária e na agricultura é um dos grandes problemas ambientais, uma vez que essas substâncias não são facilmente biodegradadas, permanecendo no ambiente por um tempo elevado, contaminando o solo, lavouras, pastos e o ser humano. Esses fatores impulsionam a busca por produtos agrícolas menos agressivos ao meio ambiente e que sejam mais facilmente biodegradados. Os produtos naturais (metabólitos secundários) provenientes de plantas e fungos, são mais facilmente biodegradados do que as substâncias de origem sintética, abrindo perspectivas para a produção de herbicidas naturais ou para outros fins, como medicinal, por exemplo, servindo como protótipo para a síntese de substâncias que tenham esse potencial.

A Amazônia, por ser uma região de grande biodiversidade em sua flora, com a maior floresta tropical úmida do planeta, torna essa pesquisa bastante viável, pois a humanidade, ao longo do tempo selecionou apenas cerca de 300 plantas para a alimentação e, de um pouco mais de uma centena, obteve princípios ativos puros para o tratamento de doenças. Estes números são bem modestos quando se está diante de um universo de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores (PINTO et al., 2002). *Nephrolepis brownii* se encaixa neste perfil, fazendo parte de um grupo de espécies que ainda não foram estudadas.

Na agricultura, o controle efetivo de parasitas utilizando-se produtos químicos convencionais tem encontrado dois grandes problemas: o desenvolvimento acelerado da resistência ao princípio ativo e os resíduos nos produtos de origem animal, que têm provocado preocupação na sociedade e órgãos governamentais. Assim, os produtos orgânicos e com eles, a agricultura orgânica, têm conquistado espaço na agropecuária, indicando forma de uso, isolada ou associada, de

substâncias naturais que geram produtos com menos resíduos e mais valorizados no mercado (DANTAS et al, 2009). Segundo o IBGE, de 2000 a 2012 o uso de agrotóxicos mais que dobrou (IBGE, 2012). Esse fato é preocupante, pois estão incluídos produtos considerados perigosos, que a priori ajudaria no manejo, mas futuramente traria prejuízos ao ambiente e ao homem.

A utilização de produtos naturais pela a humanidade há tempos é conhecida. A nossa região vive essa cultura de medicina popular, a busca de alívio e cura de doenças através de plantas medicinais. Paralelamente, a ciência procura investigar, aprimorar e desenvolver novos produtos com a mesma intenção. A melhoria na qualidade de vida é uma busca incessante e o estudo de plantas e fungos vêm contribuindo para isso, pois ambos são grandes fontes de substâncias com potenciais dos mais diversos possíveis. Portanto, a química dos produtos naturais tem sua importância que vai além dos campos do Brasil e do mundo, pois suas substâncias apresentam muitas utilidades como: larvicida do mosquito *Aedes aegypti* (SIMAS et al., 2004); na produção de fármacos (BARREIRO; BOLZANI; VIEGAS JR, 2006) que podem ser úteis no tratamento do Mal de Alzheimer (VIEGAS JR et al., 2004), no combate ao câncer (SOUZA, 2004); propriedades antioxidantes (VELLOSA; BARBOSA; OLIVEIRA, 2007), entre outras.

Existe no país um grande número de grupos de pesquisa que têm contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas, a quimiotaxonomia, a farmacologia de produtos naturais e outras áreas relacionadas. No entanto, o Brasil não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Nesse contexto onde a natureza oferece ao homem recursos que vão desde a sua alimentação até sua manutenção é que os estudos nesse sentido tornam-se importantes, alimentando bancos de dados sobre esse universo a ser explorado, em se tratando de produtos naturais. O estudo químico e biológico de *Nephrolepis brownii* e do fungo endofítico associado a essa espécie encontra-se como objetivo geral deste trabalho, por fazer parte desse contexto de biodiversidade aliada a química de produtos naturais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo químico e biológico de *Nephrolepis brownii* e da biomassa produzida pelo fungo endofítico associado a essa espécie.

2.1.1 Objetivos específicos

- Isolar e identificar metabólitos secundários dos extratos obtidos da planta *Nephrolepis brownii*;
- Verificar os efeitos fitotóxicos dos extratos obtidos de *Nephrolepis brownii*;
- Obter e identificar a composição do óleo essencial de *Nephrolepis brownii*;
- Isolar fungos endofíticos de *Nephrolepis brownii*;
- Cultivar o fungo em meio sólido (arroz) e líquido (Czapeck);
- Isolar e identificar metabólitos secundários a partir da biomassa produzida pelo fungo endofítico associado à planta *Nephrolepis brownii*;
- Verificar os efeitos fitotóxicos dos extratos obtidos da biomassa produzida por fungos endofíticos associados a planta;
- Verificar o potencial do fungo endofítico associado a *N. brownii* em reações de biotransformação;
- Verificar os efeitos fitotóxicos das substâncias isoladas de *N. brownii* e do fungo endofítico associado à mesma;
- Avaliar a atividade biológica das substâncias isoladas frente à *Leishmania amazonensis*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 A FAMÍLIA LOMARIOPSIDACEAE

Lomariopsidaceae, família das samambaias, contém 4 gêneros e 70 espécies, na divisão Pteridófitas (plantas vasculares inferiores). A família Lomariopsidaceae inclui plantas epífitas e hemiepífitas, ocasionalmente terrestres, caracterizadas pelo caule reptante ou trepador, o pecíolo com feixe vascular arranjado em forma de meia lua, com pina inteira ou crenada, frequentemente articulada e auriculada em alguns gêneros, a venação é livre, \pm paralela ou pinada. Os soros discretos, circulares, e com indúcio redondoreniforme a reniforme, ou exindusiado, ou esporângios acrosticóides e as frondes dimorfas (SMITH et al., 2006). Na flora do Pará são conhecidos três gêneros *Cyclopeltis*, *Lomariopsis* e *Nephrolepis* e aproximadamente 10 espécies (SAMPAIO, 1930).

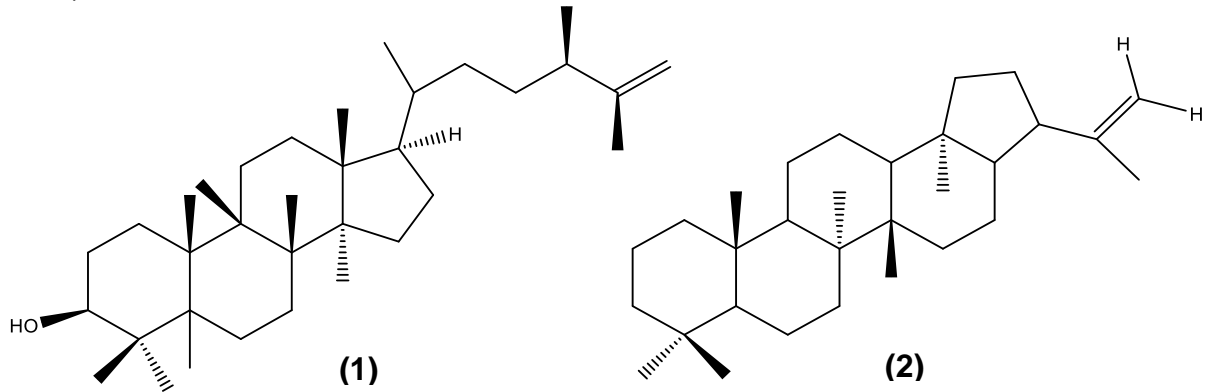
A família Lomariopsidaceae apresenta grande parte de sua distribuição em região tropical. É constituída pelos seguintes gêneros: *Cyclopeltis*, *Lomariopsis*, *Thysanosoria* e *Nephrolepis*, sendo que esse último foi incluído recentemente nesta lista, pois seu exato posicionamento filogenético era incerto. Há um tempo *Nephrolepis* continha sua própria família, Nephrolepidaceae (SMITH et al., 2006).

3.1.1 O gênero *Nephrolepis*

O gênero *Nephrolepis* é constituído por cerca de 30 espécies (LORENZI; SOUZA, 2001), sendo muito utilizadas como plantas ornamentais. Porém as samambaias também são biologicamente ativas. Muitas espécies deste gênero já foram estudadas fitoquimicamente, com vários destes estudos monitorados por bioensaios, utilizando os extratos brutos, óleos essenciais e substâncias isoladas, com o objetivo de encontrar propriedades biológicas úteis, as quais estão listadas a seguir.

3.1.1.1 *Nephrolepis auriculata*

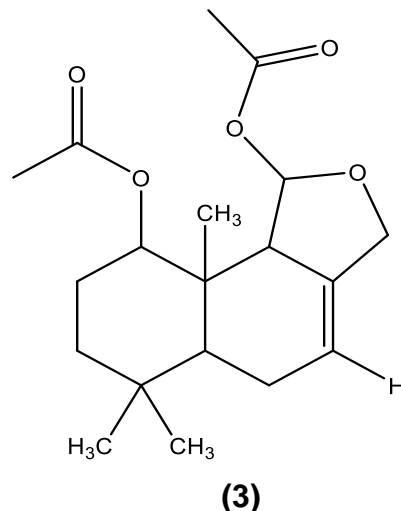
Em estudos químicos realizados com *N. auriculata* foi verificada a presença do ciclolaudenol **(1)**, β -sitosterol **(13)**, Ferneno **(S1)** e diplopteno **(2)** (TIEH; CHANG, 1980).



3.1.1.2 *Nephrolepis biserrata*

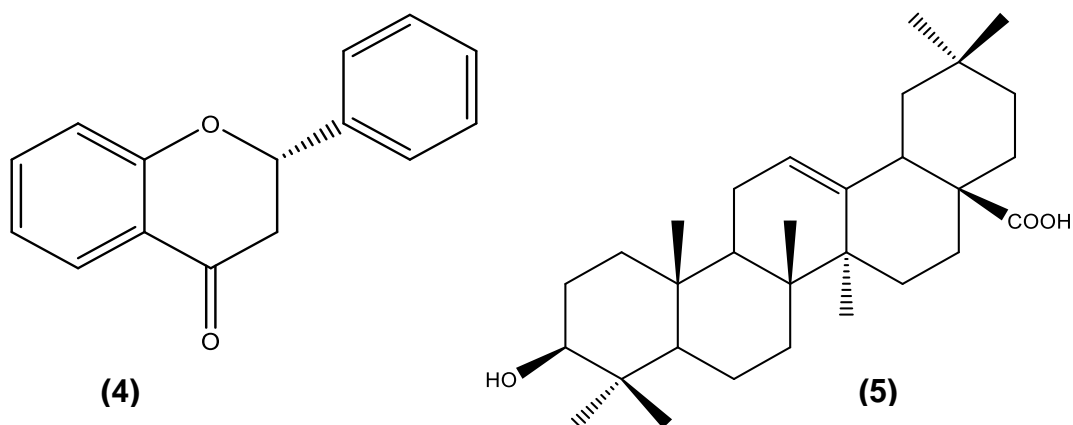
Estudos sobre esta espécie constataram que apresentou atividade inseticida contra *Coccus hesperidum*, uma espécie de cochonilha, que ataca diversas espécies de plantas. Neste caso, *N. biserrata* reagiu ao estresse biótico pelo aumento da atividade guaiacol peroxidase e diminuindo a atividade da catalase. Com o objetivo de neutralizar os efeitos do estresse biótico e permitindo normal funcionamento celular em plantas atacadas por insetos (GOLAN; KATARZYNA; DRABIK, 2013).

Em estudos fitoquímicos realizados com *N. biserrata* foram isolados três sesquiterpenos, dentre eles o $1\beta,11\alpha$ -diacetoxi-11,12-epoxidrim-7-eno **(3)** (SIEMS; WEIGT; WOLLENWEBER, 1996):



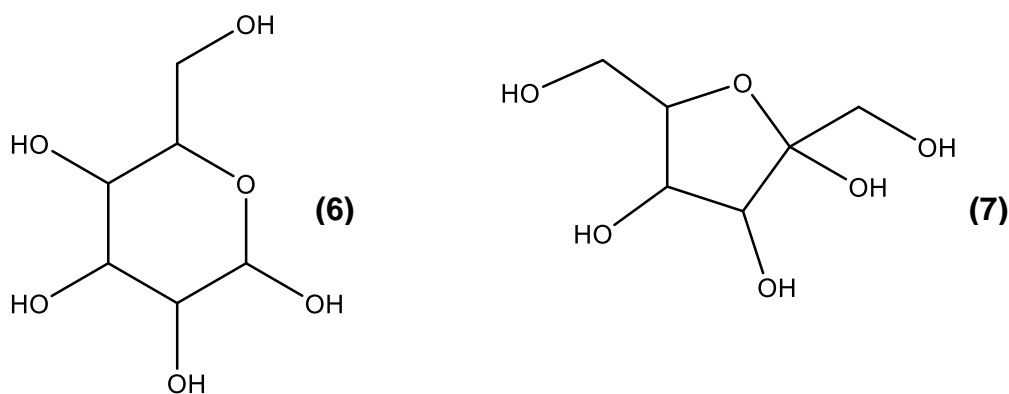
3.1.1.3 *Nephrolepis cordifolia*

Em estudo químico desta espécie foi verificada a presença da flavanona (**4**) (HUANG et al., 2007), além de terem sido isoladas as substâncias: β -sitosterol (**13**), Ferneno (**S1**), ácido oleanólico (**5**), ácido mirístico octadecilester, ácido hentriacontanóico e triacontanol (LIANG et al., 2008).



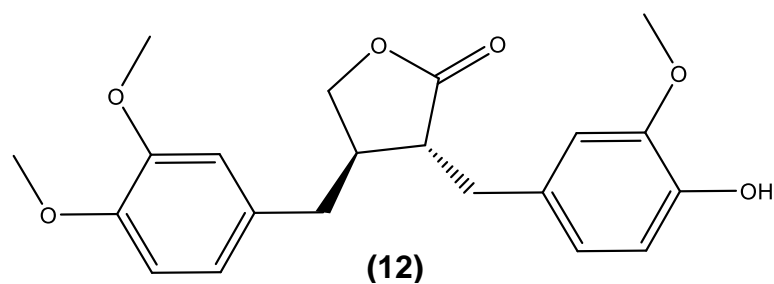
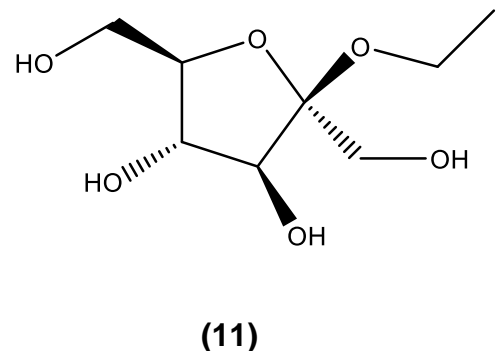
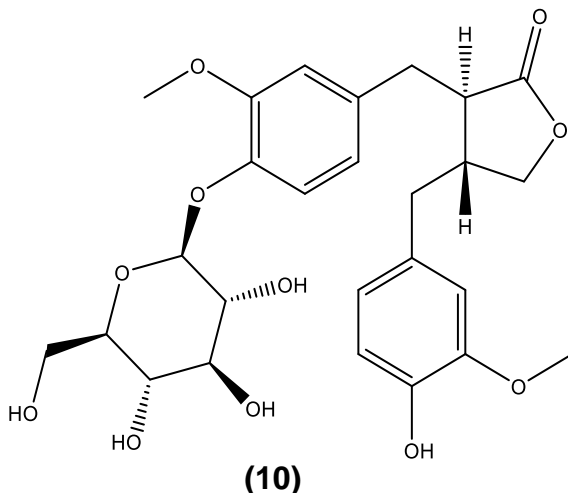
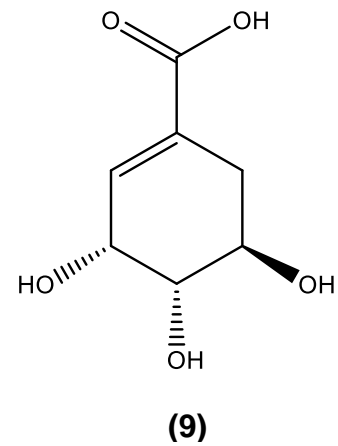
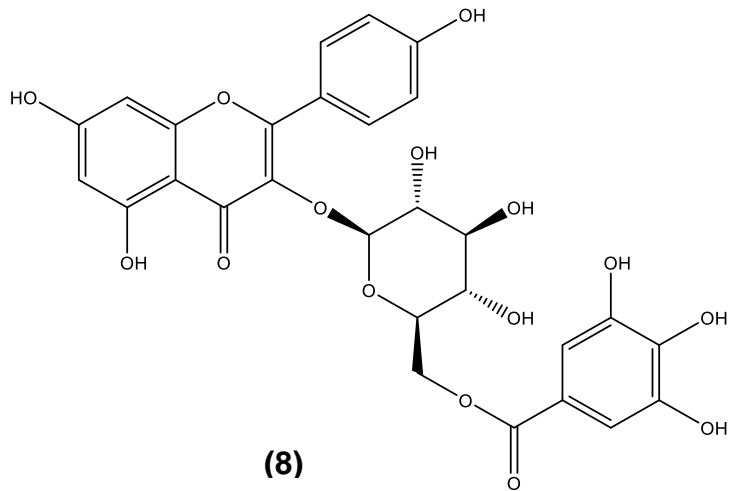
3.1.1.4 *Nephrolepis hirsutula*

Estudos químicos com *N. hirsutula* constataram a presença de D-glicose (**6**) e D-frutose (**7**) (LIEBLER, 1911).



3.1.1.5 *Nephrolepis multiflora*

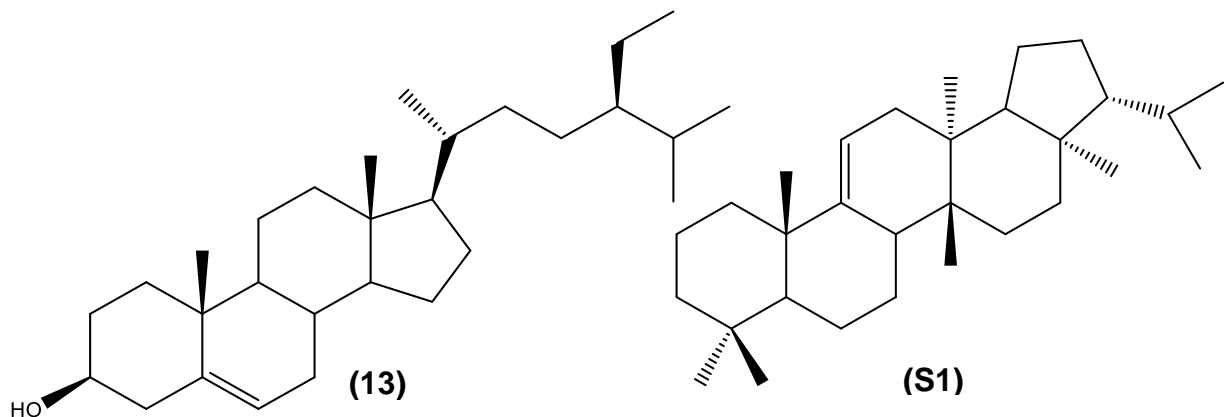
Em estudos realizados com *N. multiflora* foram isoladas e identificadas as substâncias canferol-3-O- β -D-glicopiranosídeo **(8)**, ácido chiquímico **(9)**, matairesinosídeo **(10)**, β -etil-D-frutopiranosídeo **(11)** e arctigenina **(12)** (CHEN et al., 2015).



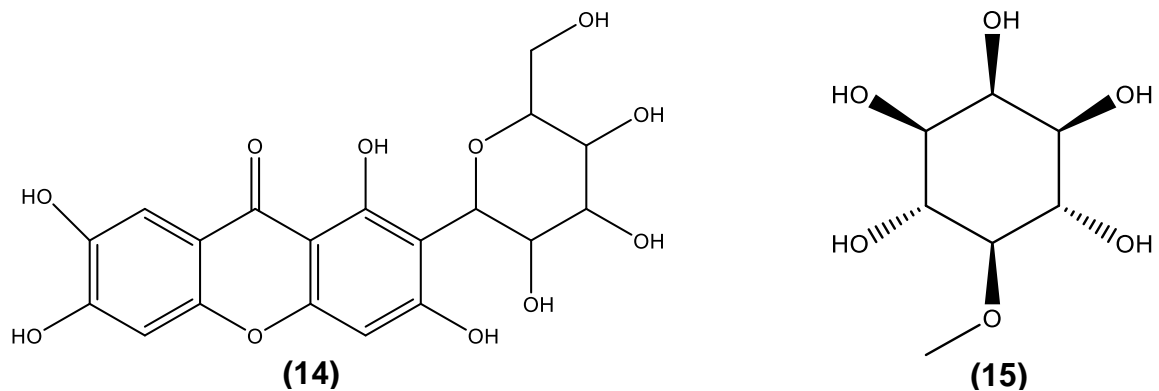
3.1.1.6 *Nephrolepis tuberosa*

O rizoma de *N. tuberosa* apresenta ação antibacteriana e é usado contra tosse, reumatismo, congestão no peito, obstrução nasal e perda de apetite. É tradicionalmente utilizada como antidiabético e apresenta atividade antibacteriana, antimicrobiana e antifúngica, além de ajudar em hemorragias, aumentando a coagulação do sangue. Extratos das folhas de *Nephrolepis tuberosa* apresentou atividade contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (KHAN; SHARMA, 2012).

Em estudos químicos realizados com *N. tuberosa* foram isoladas as substâncias β -sitosterol (**13**) e ferneno (**S1**) (BANERJEE et al., 1988):



De outras espécies de *Nephrolepis* foi isolada a glicosilxantona (**14**) (RICHARDSON, 1983). Sequoyitol (**15**) foi isolado de *N. auriculata*, *N. biserrata*, *N. exalta*, *N. hirsutulata*, *N. cordifolia* e *N. exalta*. O Sequoyitol é uma substância que é utilizada na prevenção e tratamento da diabetes (SUN; WANG, 2007).



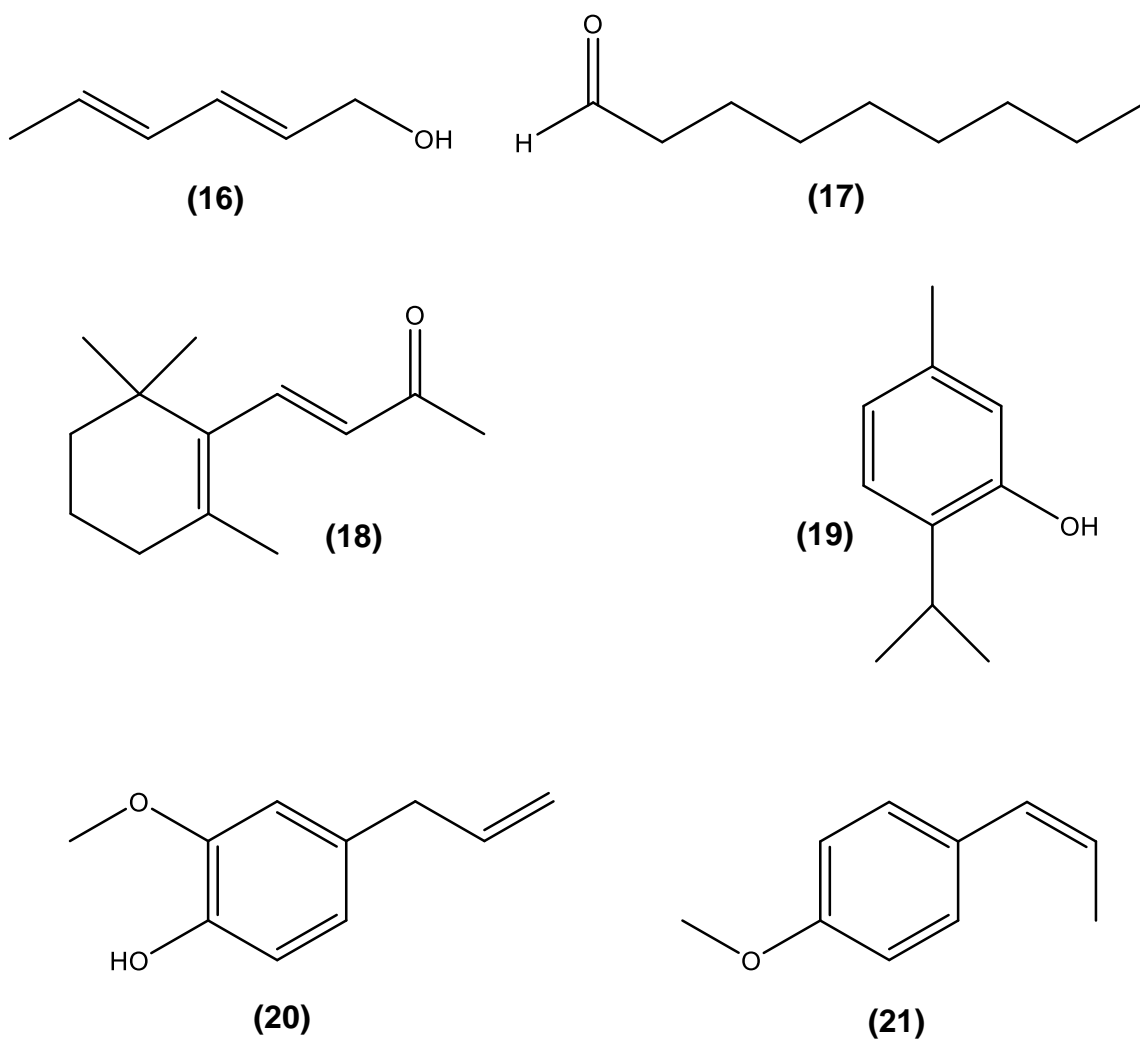
3.1.2 Estudo químico do óleo essencial de espécies do gênero *Nephrolepis*

É muito comum o estudo de óleos essenciais de plantas, com interesse em investigar sua composição química e posteriormente fazer o estudo do potencial biológico. Porém, em espécies do gênero *Nephrolepis* poucos trabalhos são encontrados na literatura.

Em um trabalho realizado sobre o óleo essencial de *Nephrolepis exaltata* e *Nephrolepis cordifolia* foram identificadas 50 substâncias, entre as quais 2,4-Hexadien-1-ol (**16**) (16.1%), nonanal (**17**) (14.4%), β -Ionona (**18**) (6.7%) e timol (**19**) (2.7%) como constituintes majoritários para *N. exaltata*; e β -Ionone (8.0%); eugenol (**20**) (7.2%) e anetol (**21**) (4.6%) como constituintes principais para *N. cordifolia* (**Figura 1**) (EL-TANTAWY; SHAMS; AFIFI, 2015). O óleo essencial dessas plantas apresentou atividade antimicrobiana frente às espécies *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri* e *Escherichia coli*. Na avaliação antifúngica mostraram potentes atividades contra *Microsporum gypseum*, *Tricophyton rubrum* e *Tricophyton metagrophytes*. A atividade citotóxica dos óleos foi avaliada utilizando o ensaio de viabilidade sobre o câncer de linhas de células de cólon humano, mama e pulmão, onde foram ativos contra carcinoma do pulmão e carcinoma da mama (EL-TANTAWY; SHAMS; AFIFI, 2015).

O óleo essencial de *Nephrolepis biserrata* apresentou atividade antioxidante, sendo identificados o benzeno acetaldeído (17,47%), hidroxitolueno butilado (46,8%) e α -cubebeno (11,19%) como os compostos majoritários (SHAH; YONG; IQBAL, 2014). Ainda de *N. biserrata* foram identificados vários compostos como benzaldeído, benzeno acetaldeído, álcool benzílico, 2-metóxifenol e naftaleno (SHAH; YONG; IQBAL, 2014). Para a espécie *N. biserrata* são relatadas diversas atividades biológicas como antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica e antibacteriana (SHAH; YONG; IQBAL, 2014).

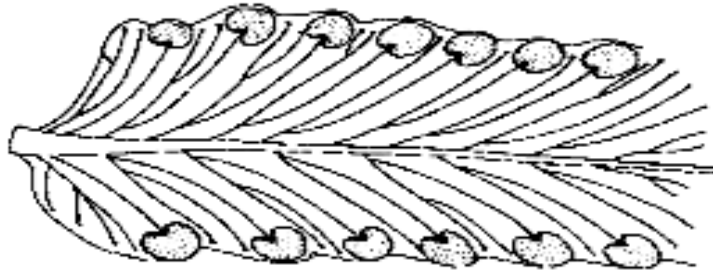
Figura 1: Estrutura química de substâncias isoladas de *Nephrolepis exaltata* e *Nephrolepis cordifolia*



3.1.3 A espécie *Nephrolepis brownii*

A espécie *Nephrolepis brownii*, popularmente conhecida como samambaia, é caracterizada pela costa escamosa e adaxialmente com tricomas, frequentemente na base. As pinas medianas apresentam o lado basioscópico arredondado a obtuso e o lado macroscópico auriculado a truncado ou obtuso (MACIEL; PIETROBOM, 2010). Os esporos longitudinalmente estriados têm rugosidades grosseiras mais ou menos regularmente orientadas no comprimento do esporo, ilustrado na **Figura 2**.

Figura 2: Representação dos esporos presentes nas folhas de *Nephrolepis brownii*



FONTE: HOVENKAMP; MIYAMOTO, 2005.

Esta espécie é introduzida no Brasil, ocorrendo nos estados do Amapá, Amazonas, Pará, Acre, Mato Grosso e Maranhão. *Nephrolepis brownii* cresce em diversos ambientes amazônicos como: floresta de terra firme, floresta de várzea, mata de igapó, capoeira, floresta ciliar e campinarana. É frequentemente observada e coletada crescendo em lugares abertos, como margens de estradas, clareiras ou em plantações de diversas monoculturas como, por exemplo, de mandioca (MACIEL, 2016). As espécies de *Nephrolepis* são popularmente conhecidas como escadinha do céu, samambaias e fetos (SEHNEM, 1979).

N. brownii pertence à família das Lomariopsidaceae, do grupo das Pteridófitas, classificadas como vegetais não superiores, abrangendo as plantas vasculares, que não produzem frutos nem sementes e cuja reprodução ocorre através de esporos, como as samambaias, avencas e lycopódios (BERG, 1993). A classificação taxonômica está descrita na **Tabela 1**.

As Pteridófitas possuem ampla distribuição mundial, vivendo preferencialmente nas regiões tropicais do mundo, em locais úmidos e sombreados das matas. Na América Tropical ocorrem cerca de 3.250 espécies com 3.000 delas exclusivas dos trópicos (XAVIER; BARROS, 2005).

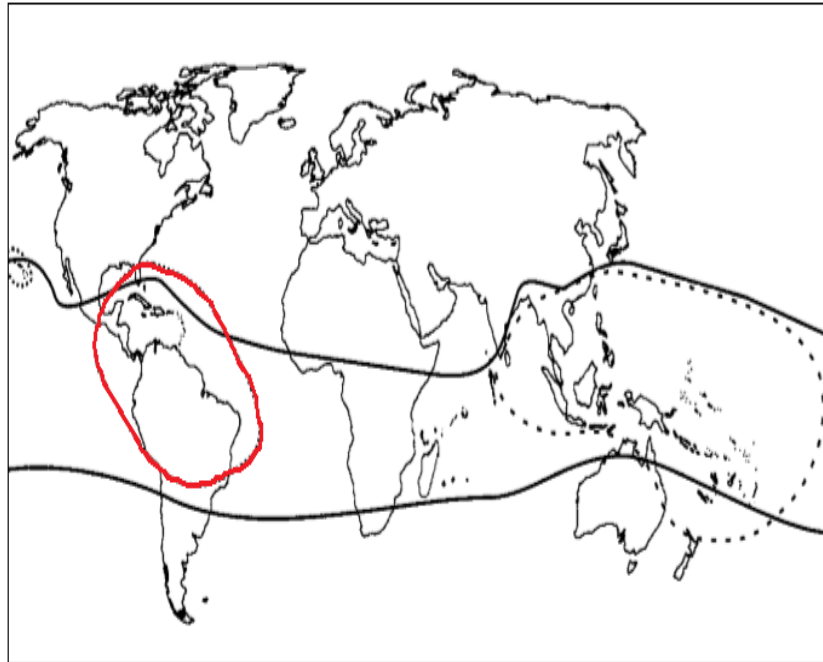
No caso de *N. brownii* sua distribuição ocorre em algumas partes do mundo, inclusive na América do Sul, como pode ser observado na **Figura 3**. É uma planta muito comum em nossa região e localiza-se, na maioria das vezes, em locais onde já houve desmatamento, se espalhando rapidamente feito uma erva daninha, que em alguns casos pode ser considerada como uma espécie invasora (HOVENKAMP; MIYAMOTO, 2005). Essa descrição pode ser observada na **Figura 4**, onde raramente encontramos plantas de pequeno porte ao seu redor.

Tabela 1: Classificação taxonômica de *Nephrolepis brownii*.

Taxonomia	
Reino	Plantae
Filo	Pteridófitas
Classe	Filicopsida
Ordem	Polypodiales
Família	Lomariopsidaceae
Gênero	<i>Nephrolepis</i>
Espécie	<i>Nephrolepis brownii</i>

Por ser uma planta rasteira, que se espalha facilmente, inibindo o crescimento de outras plantas ao seu redor, despertou o interesse em estudar substâncias produzidas pela mesma com potenciais de inibição sobre outras invasoras de pastagens, assim como as substâncias produzidas por fungos endofíticos associados a ela. Esse é um estudo químico e biológico impulsionado pela demanda de produtos utilizados como bioerbicidas, a partir de metabólitos secundários produzidos por plantas e fungos.

Figura 3: Distribuição mundial (linha contínua preta) e distribuição nas Américas (linha contínua vermelha) da espécie *Nephrolepis brownii*



FORNE: HOVENKAMP; MIYAMOTO, 2005.

Figura 4: Fotografia da Planta *Nephrolepis brownii*



Fonte: autor.

Portanto, a procura por produtos naturais, como citado anteriormente, no combate a doenças também vêm aumentando. Sabe-se que plantas, assim como os fungos, produzem elevada quantidade de metabólitos secundários que podem ser utilizados como antibióticos, fármacos e outras substâncias de interesse biotecnológico. Estudos realizados com espécies pertencentes ao grupo das Pteridófitas revelam que algumas apresentam potencial antitumoral (SUKUMARAN; KUTTAN, 1991), A espécie *Nephrolepis tuberosa* apresenta potencial bactericida contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (KHAN; SHARMA, 2012). Já a espécie *Elaphoglossum spathulatum* além da atividade bactericida, apresenta também atividade contra helmintos, efeito mutagênico e inibidor de insetos (SOCOLSKY et al., 2003).

3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE PROTOZOÁRIOS

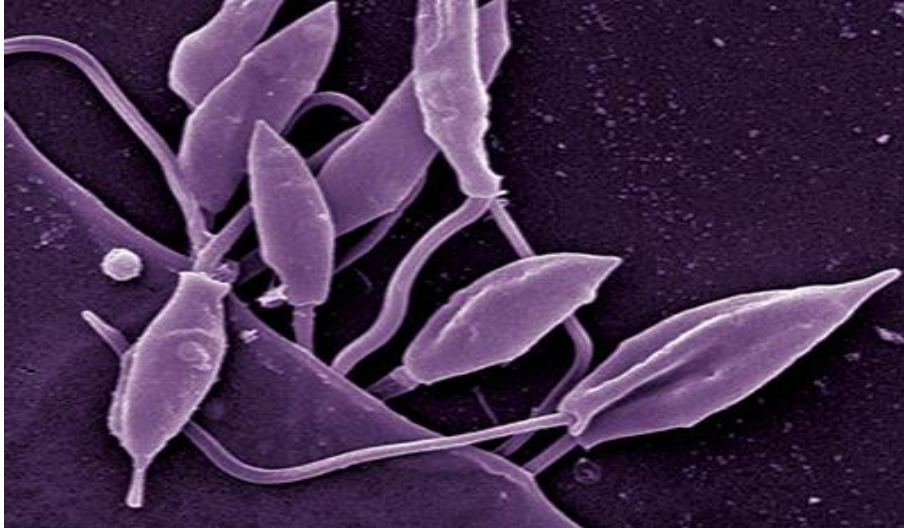
Os protozoários são organismos unicelulares, eucarióticos e que apresentam nutrição heterotrófica. Apesar de ser um termo bastante usado, não apresenta nenhum valor taxonômico, sendo considerado, portanto, um agrupamento artificial. Os protozoários, em sua grande maioria, apresentam vida livre e são encontrados em diferentes ambientes aquáticos e úmidos. Existem, no entanto, espécies que vivem em associação com outros organismos, como é o caso dos parasitas. Entre as doenças humanas causadas por protozoários, podemos citar a amebíase, tricomoniase, toxoplasmose, leishmaniose (visceral e tegumentar), doença de Chagas e malária (SANTOS, 2016).

As doenças relacionadas aos protozoários afetam não somente os seres humanos como os animais de um modo geral. Porém nem sempre estão relacionados às doenças ou ao fato de serem nocivos aos animais. No caso de seres ruminantes, o maior número de protozoários é relacionado com dietas mais digestíveis, onde possuem papel fundamental na modulação da taxa de fermentação ruminal, favorecendo o equilíbrio no ecossistema ruminal e evitando disfunções metabólicas (KOZLOSKI, 2002).

Neste trabalho foi avaliado o efeito das substâncias isoladas sobre o protozoário *Leishmania amazonensis* (**Figura 5**), um dos principais causadores de

endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, também conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), que é transmitida por insetos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (ALEXANDER; RUSSEL, 1985).

Figura 5: Promastigotas de *L. amazonensis*



Fonte: Portal de Periódicos Fiocruz (2015)

As diferentes manifestações clínicas da doença dependem de um complexo de Interações entre a capacidade de invasão do parasita, o tropismo e a patogenicidade relacionada à imunogenicidade do hospedeiro (PETERS; KILLICK-KENDRICK, 1987). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença caracterizada por lesões de pele, cartilagem e mucosas do trato respiratório superior, causada por protozoários do gênero *Leishmania*.

A multiplicidade de espécies do parasito, de insetos vetores e de animais reservatórios em diferentes ambientes propicia a existência de várias modalidades clinicoepidemiológicas da infecção (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Embora os principais reservatórios mamíferos de *Leishmania* descritos nas Américas sejam roedores, gambás, endentados, equinos, caninos e os primatas, tem-se discutido o papel do gato como hospedeiro de *Leishmania* em virtude do encontro de vários felinos infectados nos últimos anos (DUARTE et al., 2010).

3.3 FUNGOS ENDOFÍTICOS

São denominados fungos endofíticos aqueles que em certo período de suas vidas colonizam os tecidos internos de plantas sem causar sintomas à mesma (PETRINI; SIEBER; TOTI, 1992), diferenciando-se dos epifíticos que vivem na superfície da planta e dos patógenos que causam doenças às plantas. A espécie hospedeira pode ser infectada pelos endófitos horizontalmente por lesões naturais, como estômatos ou crescimento das raízes, e artificiais, como injúrias causadas por práticas agrícolas. A infecção também pode ocorrer verticalmente pelas sementes do hospedeiro, neste caso, o endófito pode se instalar em uma planta por toda sua vida (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013)

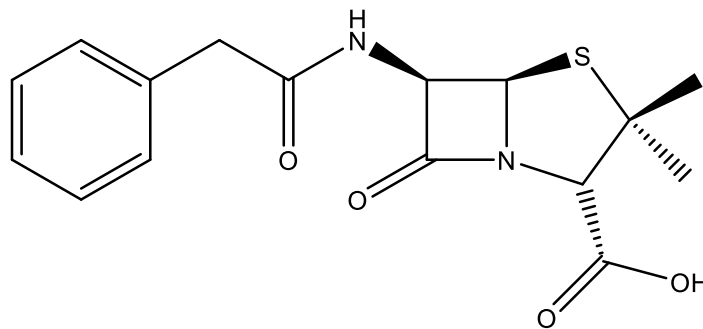
Desde o surgimento do termo “endofítico” supõe-se que o fungo pode tornar-se parasita sob determinadas condições, visto que um fungo continuamente é afetado por fatores abióticos e bióticos, dentro dos limites da plasticidade de seu genótipo e fenótipo. Assim, a extensão do período de latência do fungo pode variar. Por exemplo, um fungo endofítico pode tornar-se parasita, patogênico ou saprófito devido a uma mutação em um único locus do seu genoma, alterações na composição das espécies da microflora foliar ou mudanças na planta hospedeira, como consequência de alterações na disponibilidade de nutrientes do solo. Em termos evolutivos, supõe-se que fungos endofíticos evoluíram de parasitas ou de agentes patogênicos através da extensão nos períodos de latência e redução da virulência (SILVA, 2010).

Atualmente, sabe-se que endófitos podem produzir toxinas, antibióticos, e outros fármacos, fatores de crescimento e muitos produtos de potencial interesse biotecnológico, além de exercerem outras funções de importância para a sobrevivência do hospedeiro. Os endófitos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas, como agentes inibidores de pragas e patógenos e como fontes de metabólitos primários e secundários de interesse (SOUZA et al., 2004).

Fungos endofíticos representam uma fonte rica de produtos naturais novos e bioativos. Eles colonizam um habitat ecológico praticamente inexplorado e seus metabólitos secundários são particularmente ativos, possivelmente devido às

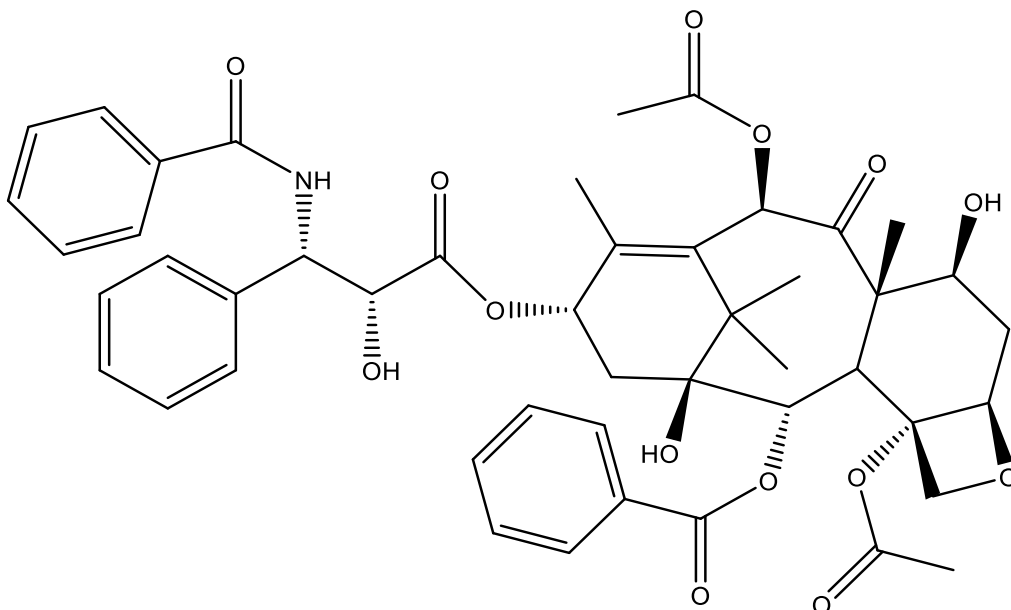
interações metabólicas com seus hospedeiros (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). O primeiro metabólito fúngico de notória eficácia foi, sem dúvida, a penicilina (**Figura 6**), substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, cuja capacidade de inibir o crescimento bacteriano foi descoberto acidentalmente por Fleming, em 1928 (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Figura 6: Estrutura química da penicilina.



Hoje, o metabólito de maior interesse isolado de um fungo endófito é o taxol (**Figura 7**), importante anticancerígeno, inicialmente isolado da planta *Taxus brevifolia* e, em seguida do endófito *Taxomyces andreana*. Isso nos sugere um relacionamento entre plantas e microrganismos que deve ser mais bem explorado (SOUZA et al., 2004).

Figura 7: Estrutura química do Taxol.



Os microrganismos endofíticos adentram as plantas por aberturas naturais e feridas. Uma das portas de entrada mais utilizadas são as raízes. O próprio crescimento das raízes, penetrando no solo, gera abrasões que facilitam a entrada de germes. Outras portas de entrada são aberturas naturais como estômatos e hidatódios, aberturas causadas por insetos e até por estruturas de fungos patógenos, como os apressórios. Eles podem também ser encontrados dentro de estruturas fúngicas, como é o caso de um fungo micorrízico, o *Glomus clarum*, que continha a bactéria endofítica *Acetobacter diazotrophicus* no seu interior (PAULA, 1991).

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, mitomicina e ácidos aureólicos), agentes redutores do colesterol sanguíneo (estatinas), agentes imunossupressores (ciclosporina A), entre outros (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000; DEMAIN, 1999). Aproximadamente um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos conhecidos foi obtido de fungos (KONGSAEREE et al., 2003).

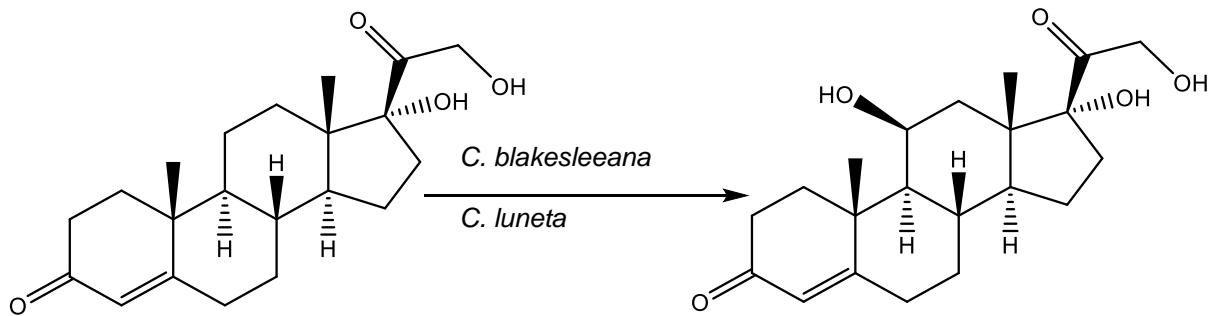
Além do estudo químico sobre o metabolismo de fungos endofíticos, há também o interesse sobre as modificações estruturais que os mesmos podem realizar sobre substâncias previamente escolhidas como substratos. Esse processo consiste em biotransformação.

3.4 BIOTRANSFORMAÇÃO

Além de produzirem uma ampla diversidade de estruturas químicas, os fungos também são bastante utilizados em processos de biotransformação, o qual vem sendo utilizado pelo homem desde meados do século XIX. A primeira aplicação de uma biotransformação foi feita em 1858 por Pasteur, usando o fungo *Penicillium glaucum*, obtendo-se L-tartarato de amônio de DL-tartarato de amônio (HANSON, 1995). Posteriormente, no século XX, estudos sobre o desenvolvimento de hidroxilações microbianas em esteroides bioativos ou em produtos intermediários utilizados na síntese de corticosteroides. A introdução de hidroxila via biotransformação foi descrita primeiramente em 1953 usando *Cunninghamella*

blakesleeana e *Curvularia luneta*. Cortexolona foi 11 β -hidroxilada produzindo hidrocortisona (VEZINA, 1987) (**Figura 8**).

Figura 8: Biotransformação da cortexolona pelos fungos *Cunninghamella blakesleeana* e *Curvularia luneta*.



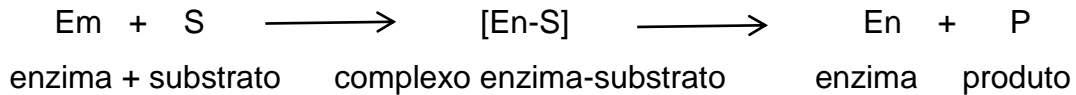
É muito comum encontrarmos na literatura casos de fungos envolvidos em reações de biotransformação, como é o caso do fungo *Fusarium moniliforme*, um dos mais comuns associados à *Zea mays* L. que se mostrou capaz de metabolizar o substrato 6-metoxi-benzoxazolina (MBOA) e 2-benzoxazolinona (BOA) em *N*-(2-hidroxi-4-metoxifenil) e *N*-(2-hidroxifenil) ácido malônico, respectivamente (ZIKMUNDOVA, 2002).

O termo biotransformação pode ser aplicado às modificações específicas ou interconversões da estrutura química realizadas por catalisadores bioquímicos (LÉON et al., 1998). Microrganismos como fungos vêm sendo utilizados nesse processo, na produção de fármacos, por exemplo, modificando moléculas naturais ou sintéticas, devido seu grande potencial de biotransformação sobre determinadas estruturas, de acordo com a enzima que se encontra no microrganismo. As enzimas são geralmente compostas por aminoácidos ou são de natureza proteica, podendo ser encontradas no interior ou fora da célula, que sem sua função de catalisador dificilmente as reações de biotransformações aconteceriam.

O substrato, que é o composto-alvo da enzima, é convertido em um outro composto denominado produto. A enzima e o substrato combinam-se formando um

“complexo enzima substrato”, que se dissocia formando o produto, conforme representado no Esquema da **Figura 9** (FERSHT, 1998).

Figura 9: Representação geral da reação de biotransformação.



3.5 ALELOPATIA

O termo Alelopatia foi denominado por Molish em 1937, que vem do grego, onde Allelon = mútuo e Pathos= prejuízos (MOLISCH, 1937). Substâncias apontadas como alelopáticas, denominadas aleloquímicos, apresentam diferentes composições, agindo como mecanismo de defesa, inibindo o crescimento de outras plantas ao seu redor ou com outra finalidade.

Na Região Amazônica, a criação de gado em pastagens cultivadas é a principal atividade agrícola desenvolvida. Entretanto, as pastagens que se constituem na principal fonte de alimento aos animais são infestadas, historicamente, por uma população de plantas daninhas extremamente agressivas e diversificadas, que afetam a produção de forragem e comprometem o desempenho biológico e econômico da atividade, com substanciais reduções no retorno dos investimentos realizados. Dentre as muitas espécies de plantas daninhas que infestam essas áreas merecem destaque aquelas de folhas largas, com destaque às da família Leguminosae (SILVA et al., 2013). Uma representante importante dessa família, que se notabiliza pela agressividade, e que merece especial atenção é a espécie *Mimosa pudica*, conhecida regionalmente pelo nome de malícia.

O controle dessas plantas é de fundamental importância e representa parcela importante nos custos de manutenção da pastagem. roçagem e uso de produtos químicos, estão entre os principais métodos de controle dessas plantas daninhas (DUTRA et al., 2003). A roçagem tem mostrado ser pouco eficiente a médio e longo prazo e o uso de produtos químicos tem motivado insatisfações de ordem social por envolver comprometimento da qualidade dos recursos naturais. Adicionalmente, tem aumentado o aparecimento de plantas daninhas resistentes aos atuais produtos

disponíveis no mercado, o que reduz a eficiência de controle. Essas condicionantes apontam para a necessidade de novas fontes de compostos químicos que possam garantir o controle eficiente dessas plantas sem representar conflito de ordem social.

Nesse contexto, a floresta Amazônica pode representar oportunidade única para pesquisas com inovadoras moléculas químicas e possibilidades de uso no manejo e controle de plantas daninhas, com ênfase às plantas medicinais, muitas das quais com atividades fitotóxicas comprovadas (SOUZA FILHO, 2006).

Na natureza as diversas interações entre plantas se dá através de vários mecanismos, a qual uma acaba interferindo, direta ou indiretamente, no crescimento da outra, pela produção de substâncias químicas que são liberadas por meio de volatilização, exsudação radicular, lixiviação e/ou decomposição dos resíduos de plantas (RICE, 1984).

As investigações científicas em alelopatia têm se concentrado principalmente nas interações entre espécies vegetais cultivadas e na prospecção de novas moléculas com propriedades herbicidas. No âmbito das ciências florestais e da ecologia, persiste a escassez de conhecimentos relativos ao comportamento alelopático de espécies arbóreas nativas, ameaçadas ou não de extinção, e aquelas com potencial para utilização em reflorestamentos, plantios mistos e sistemas agroflorestais e agrossilvopastoris (CARMO; BORGES; TAKAKI, 1999).

A espécie *Nephrolepis brownii* é uma planta rasteira, que se espalha facilmente, inibindo o crescimento de outras plantas ao seu redor, e esse comportamento despertou o interesse em se estudar substâncias produzidas pela mesma com potenciais de inibição sobre espécies invasoras de pastagens, assim como as substâncias produzidas por fungos endofíticos associados a ela.

4 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Equipamentos

- **Capela de luxo laminar:** Modelo PA 320 PACHANE;
- **Autoclave vertical:** Modelo Au 75 PHOENIX;
- **Estufa de incubação do tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand):**
- **Estufa de secagem e esterilização:** FAMO modelo Fic 0.3 série 0196;
- **Balança Analítica:** SARTORIUS modelo BP210S;
- **Moinho de facas;**
- **Evaporador rotativo:** Modelo Laborota 4000;
- **Câmara de análise de fluorescência por luz ultravioleta:** Cabine tipo SPECTROLINE modelo CM-10. Luz tipo SPECTROLINE modelo ENF-260C;
- **Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:** VARIAN modelo MERCURY-300 (300 MHz para RMN de ^1H e 75 MHz para RMN de ^{13}C) localizado no Laboratório de Química- Pesquisa, Programa de Pós-graduação em Química, UFPA;
- Mesa agitadora orbital (MA 140);
- Câmara de germinação tipo BOD;
- Cromatógrafo de fase gasosa;
- Espectrômetro de massas.

4.1.2 Solventes utilizados nas preparações dos extratos orgânicos e análises cromatográficas

- Solventes P.A. (SYNTH, CRQ, NUCLEAR, ISOFAR, DINÂMICA): Hexano, acetato de etila, metanol e n-butanol;

4.1.3 Solventes utilizados na obtenção dos espectros de RMN

- Solventes deuterados (ALDRICH e ACROS): CDCl_3 , DMSO-d_6 e CD_3OD ;
- Hexano espectroscópico (para espectro de massas).

4.1.4 Técnicas cromatográficas

- Cromatografia em coluna (CC): foram utilizadas colunas de vidro, o tamanho das colunas (diâmetro e altura) variou conforme o peso da amostra. A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60G (70-400 mesh, CARVALHAES, VETEC, SILICYCLE);
- Cromatografia em camada delgada (CCD): foram utilizadas placas cromatográficas em folhas de alumínio pré-revestidas com sílica gel (200 mm de espessura) e indicador UV 254, dimensão 20x20 cm (SORBTECH). As revelações das substâncias nas CCD foram realizadas através da exposição destas à radiação ultravioleta (UV), lâmpada de modelo boit-lub 01 e por borrifação com solução ácida de CeSO_4 em $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 ou solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ 1:1, seguido de aquecimento em estufa até revelação das mesmas;
- Cromatografia em coluna (Sephadex): foram utilizadas colunas de vidro, o tamanho das colunas (diâmetro e altura) variou conforme o peso da amostra. A fase estacionária utilizada foi Sephadex LH-20;
- Cromatografia gasosa.

4.1.5 Substratos utilizados na biotransformação

Foram utilizadas as substâncias 4-nitroacetofenona (**S10**) (comercial) e a chalcona (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(2,3,4-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona (**S8**) (cedida pelo professor Marivaldo Corrêa). A substância **S8** foi sintetizada utilizando 4-metoxi-acetofenona (11 mmol) e 2,3,4-trimetoxibenzaldeído (12 mmol), como materiais de partida (CORRÊA, 2010).

4.2 ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Nephrolepis brownii*

4.2.1 Coleta do material botânico

O material botânico (partes aéreas de *Nephrolepis brownii*) foi coletado na reserva da EMBRAPA-Amazônia Oriental, localizada no bairro do Marco em Belém-PA, em março de 2012, e identificado pela botânica MSc. Silvane Tavares Rodrigues, especialista neste grupo de plantas. Uma exsicata da planta em estudo

encontra-se catalogada no herbário dessa instituição sob o número de registro IAN-187868. Foram coletados aproximadamente 2,0 Kg das folhas de *N. brownii*, cuidadosamente escolhidas para a composição das exsiccatas e estudo fitoquímico.

4.2.2 Obtenção dos extratos brutos de *Nephrolepis brownii*

O material vegetal foi seco dentro do laboratório, sob condições de baixa umidade e temperatura. Posteriormente foi submetido à moagem em moinho de facas. Após a moagem o material vegetal foi extraído à temperatura ambiente por percolação sequencial com hexano e metanol (**Figura 10**). Os extratos obtidos foram concentrados a vácuo, pesados e reservados. O extrato metanólico foi dissolvido em MeOH-H₂O (3:1) e submetido à partição líquido-líquido com hexano, acetato de etila e n-butanol, sequencialmente. As soluções provenientes da partição foram concentradas em evaporador rotativo a vácuo, obtendo-se as fases hexânica, acetato de etila e n-butanólica (**FIGURA 11**).

FIGURA 10: Fluxograma de obtenção dos extratos orgânicos das partes aéreas de *Nephrolepis brownii*

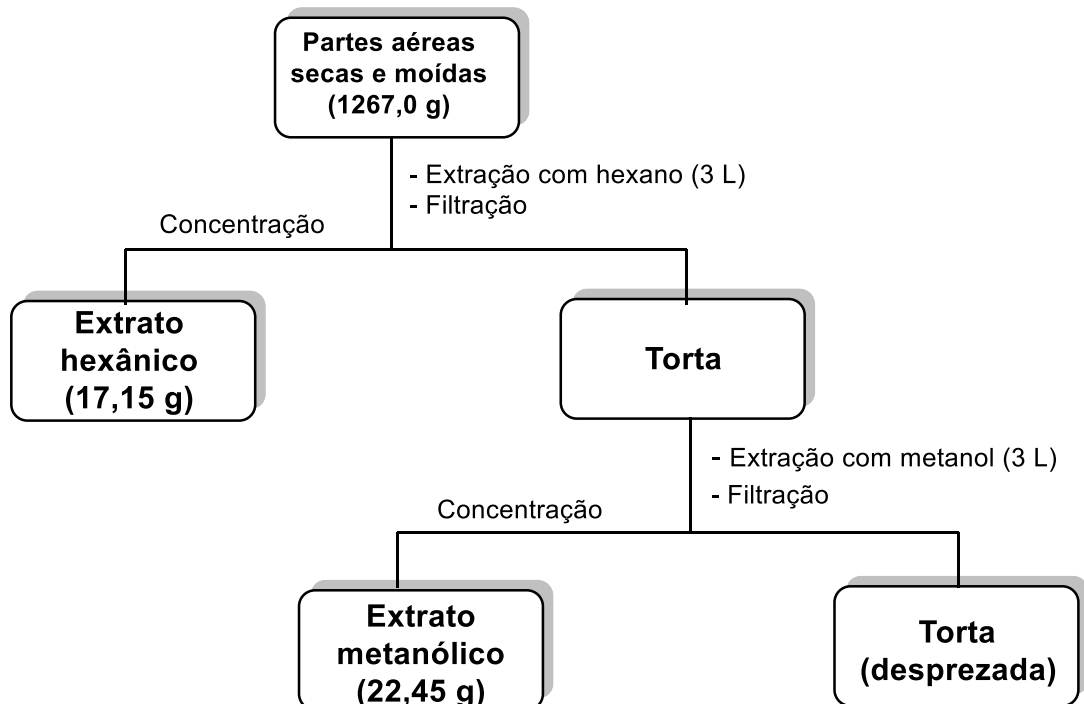
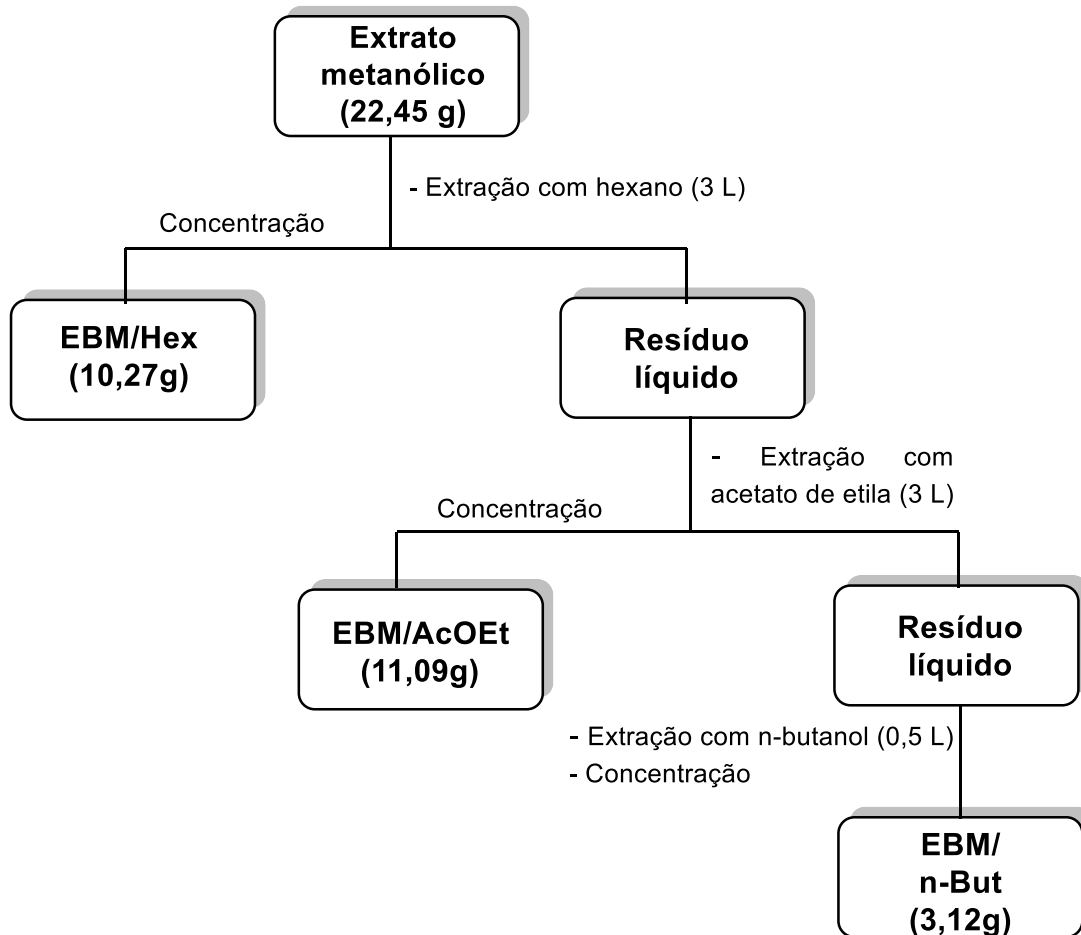


FIGURA 11: Fluxograma de obtenção das fases hexânica, acetato de etila e n-butanólica a partir da partição do extrato metanólico.



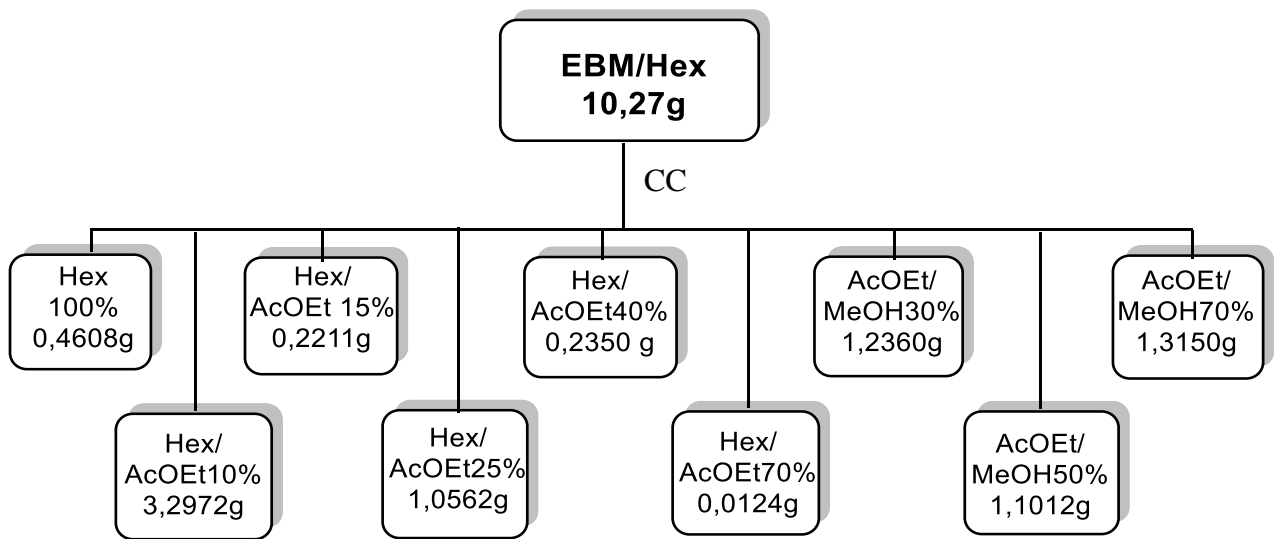
4.2.3 Fracionamento dos extratos de *Nephrolepis brownii*

Os extratos foram fracionados por cromatografia em coluna de sílica gel utilizando como sistemas de eluição misturas dos solventes hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade.

4.2.3.1 Fracionamento do extrato EBM/Hex

A massa de 10,27 g do extrato EBM/Hex, obtido das partes aéreas de *N. brownii*, foi submetido à cromatografia em coluna (CC) eluída com hexano, misturas entre hexano e AcOEt (em quantidades crescentes de AcOEt) e MeOH, totalizando 9 frações (**Figura 12**).

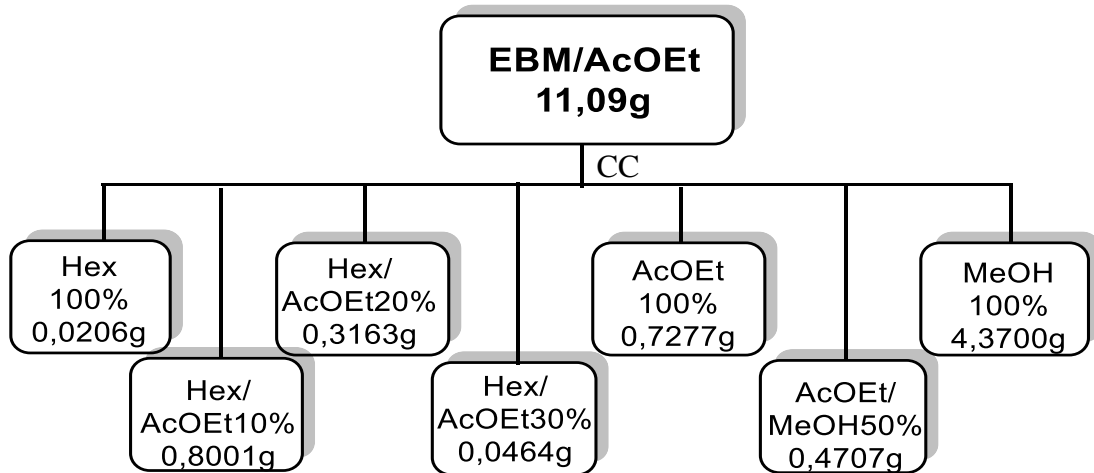
Figura 12: Fluxograma de fracionamento do extrato EBM/Hex.



4.2.3.2 Fracionamento do extrato EBM/AcOEt

A massa de 11,09 g do extrato EBM/AcOEt, obtido das partes aéreas de *N. brownii*, foi submetido à cromatografia em coluna (CC) eluída com hexano, misturas entre hexano e AcOEt (em quantidades crescentes de AcOEt), AcOEt e MeOH, totalizando 7 frações (**Figura 13**).

Figura 13: Fluxograma de fracionamento do extrato EBM/AcOEt.



A fração Hexano 100% apresentou a formação de cristais após evaporação do solvente. Os cristais foram recristalizados em hexano e submetidos a técnicas de RMN de ^1H e de ^{13}C , sendo identificada por comparação com dados da literatura a substância (**S1**).

A fração AcOEt/MeOH 50% foi lavada com metanol, onde obteve-se cristais insolúveis em metanol, e solúveis somente em água e DMSO. Os cristais brancos em forma de agulha obtidos foram submetidos a técnicas de RMN de ^1H e de ^{13}C , sendo identificada a substância (**S2**).

4.2.4 Estudo do óleo essencial de *Nephrolepis brownii*

Foi feita uma segunda coleta das partes aéreas de *N. brownii* para o estudo do óleo essencial. Após a coleta o material vegetal foi seco no laboratório, sob condições de baixa umidade e temperatura, e posteriormente foi submetido à moagem em moinho de facas e em seguida feita a extração do óleo essencial através do processo de hidrodestilação, em aparelho graduado Clevenger, usando-se 232 g de folhas, em 1000 mL de água destilada, em temperatura máxima de 100 °C até ebulição, reduzindo-se posteriormente para 75 °C, por um período de aproximadamente 2 horas. Após esse processo, os óleos essenciais foram coletados com uma pipeta e armazenados em tubos de 2 mL do tipo eppendorf, protegidos da luz. Nesse experimento utilizando a hidrodestilação, foi possível obter

uma gota de óleo essencial, suficiente para fazer uma injeção no aparelho CG/EM e posterior análise do perfil químico.

4.3 ESTUDO QUÍMICO DO FUNGO ENDOFÍTICO

4.3.1 Sobre o meio BDA

O meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) é um dos mais utilizados para o cultivo de fungos em placas de Petri, por corresponder às necessidades nutricionais que esses microrganismos dependem para seu crescimento. O meio de cultura ideal seria o que se assemelha ao que o fungo é encontrado na natureza, porém na reprodução em laboratório foi utilizado o meio BDA.

4.3.2 Preparação do meio BDA

No preparo do meio Batata - Dextrose - Ágar (BDA) foram utilizadas 200 g de batata inglesa descascadas, cortadas em cubos e cozidas em 400 mL de água destilada por cinco minutos em forno de microondas. Em seguida, filtrou-se o caldo obtido para um Erlenmeyer de 1L, onde foram acrescentados 20,0 g de dextrose e 15,0 g de ágar bacteriológico, homogeneizando a mistura até dissolução completa e por fim completou-se o volume para um litro de solução. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C e por 15 minutos.

4.3.3 Obtenção do fungo endofítico

O isolamento do fungo endofítico foi realizado no Laboratório de Bioensaios do Programa de Pós-graduação em Química da UFPA. Foram isolados dos tecidos saudáveis das folhas de *Nephrolepis brownii*. Para ter certeza de que seriam isolados somente os fungos que estavam vivendo no interior dos tecidos da planta foi utilizada a seguinte seqüência de imersões, após lavagem do material vegetal com água corrente e sabão: álcool 70%, hipoclorito de sódio 11% e água autoclavada durante 30, 60 e 90 segundos, respectivamente e secagem em gaze estéril.

Os fragmentos vegetais (9 fragmentos), no formato de quadrados, foram inoculados em placa de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo meio BDA. Posteriormente, as placas foram incubadas durante sete dias a 28°C. É importante ressaltar que houve o crescimento de apenas uma colônia nas placas, predominando apenas um fungo endofítico (**Figura 14**).

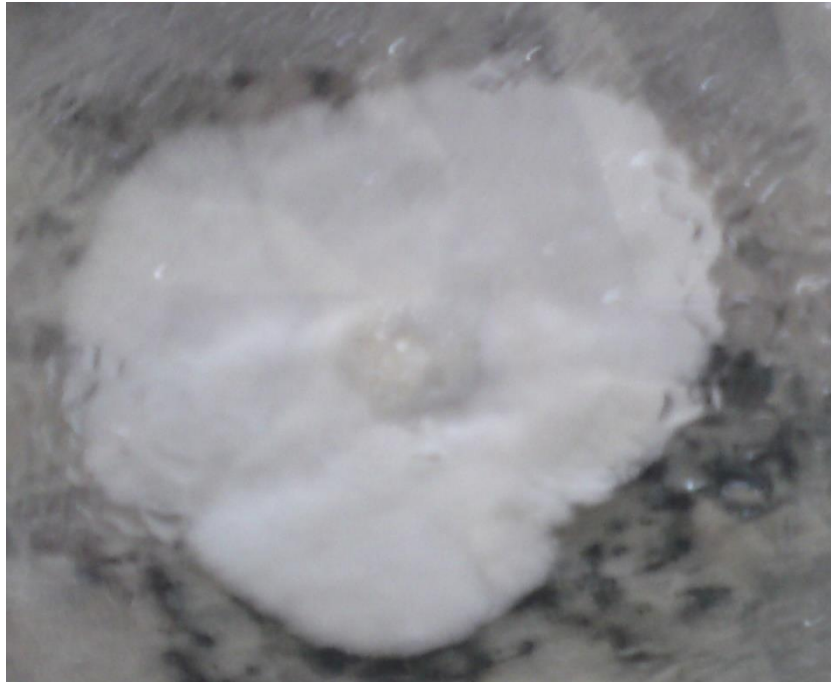
A partir do quinto dia, as primeiras placas começaram a ser repicadas, até a obtenção de uma colônia pura (**Figura 15**). Esse procedimento levou ao isolamento de apenas um fungo endofítico, com a finalidade de ser cultivado posteriormente em larga escala. O fungo endofítico foi denominado **NB-1** e está em fase de classificação.

Figura 14: Fungo **NB-1** isolado a partir das partes aéreas de *Nephrolepis brownii*.



Fonte: autor.

Figura 15: Fungo após repicagem.



Fonte: autor.

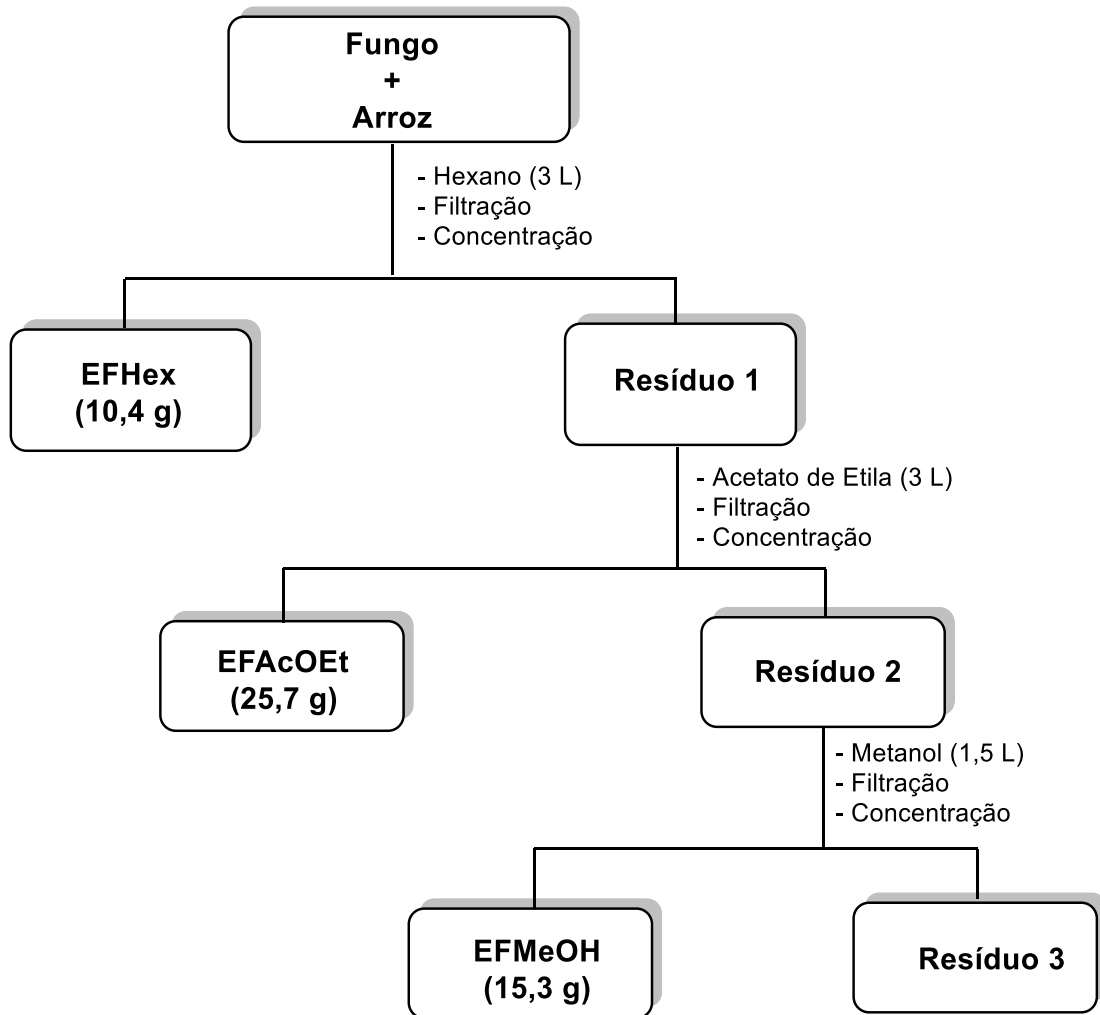
4.3.4 Cultivo no cereal em larga escala (arroz)

Após o isolamento do fungo, o mesmo foi utilizado no cultivo em larga escala, utilizando como meio de cultura o arroz. Para o cultivo no cereal foram colocados 100 g do cereal em frascos de Erlenmeyer de 500 mL e em seguida foram adicionados 70 mL de água destilada, totalizando 30 frascos de Erlenmeyer. Esse meio foi autoclavado por 45 minutos à temperatura de 121°C. Após atingir a temperatura ambiente o fungo foi introduzido nos frascos, e então incubado a 25°C por 25 dias, melhor período observado em um estudo prévio.

4.3.4.1 Obtenção dos extratos em meio sólido

Após o período de incubação foi adicionado hexano até total imersão do fungo, com o objetivo de matar o fungo e obter o extrato hexânico. Na sequência foi realizada a troca de solvente, seguindo a ordem crescente de polaridade, obtendo os extratos acetato de etila e metanólico.

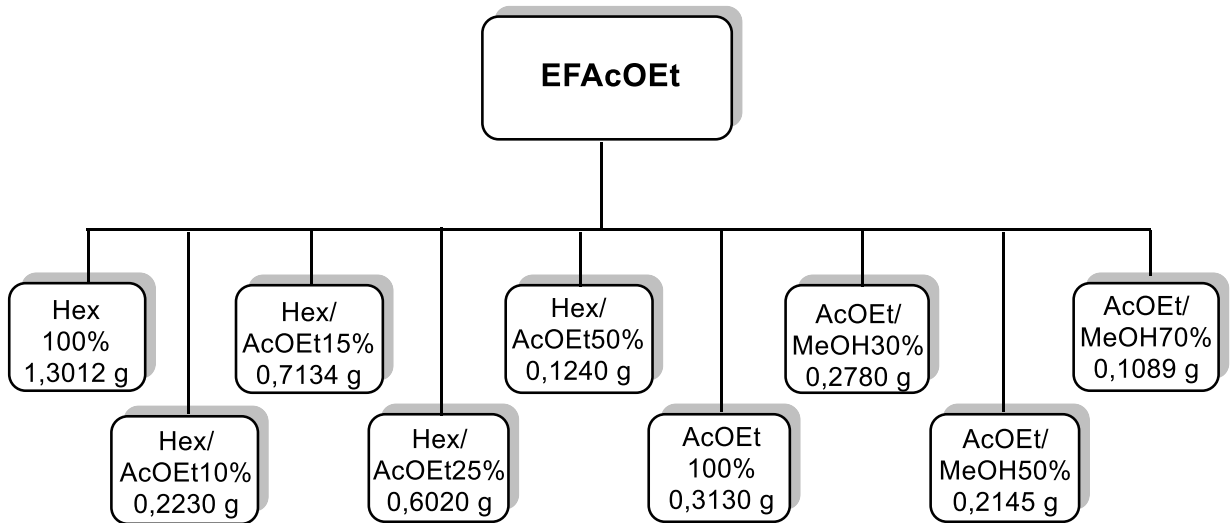
Figura 16: Fluxograma de obtenção dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico do cultivo do fungo em arroz.



4.3.4.2 Fracionamento do extrato EFAcOEt

Uma alíquota de 5 g do extrato acetato de etila do cultivo em arroz foi submetida ao fracionamento em coluna de sílica gel utilizando-se como eluentes hexano, acetato de etila e metanol puros ou misturados em gradientes crescentes de polaridades. Foram obtidas 9 frações que após evaporação do solvente foram monitoradas por CCDC e reunidas quando apresentavam o mesmo perfil. A **Figura 17** mostra o fluxograma do fracionamento de **EFAcOEt**.

Figura 17: Fluxograma de fracionamento do **EFAcOEt**.



Uma alíquota da fração AcOEt 100% (40 mg) foi submetida ao fracionamento em coluna de sílica gel utilizando-se como eluentes hexano e acetato de etila, puros ou em mistura em gradientes crescentes de polaridades, onde foi isolada a substância **S3** (15 mg) da subfração Hex/AcOEt 50% e a substância **S4** (17 mg) da subfração AcOEt 100%. Outra alíquota da fração AcOEt 100% obtida do EFAcOEt foi submetida a uma coluna sephadex LH-20, totalizando 7 frações, onde isolou-se a substância **S5** (15 mg). A identificação dessas substâncias foi realizada por técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C e confirmadas por comparação com dados da literatura.

4.3.5 Cultivo em meio líquido (Czapek)

O fungo endofítico foi submetido a diferentes condições de cultivo com o intuito de determinar melhores condições de crescimento e produção de metabólitos secundários para atividade biológica. Então foi realizado neste trabalho também o cultivo no meio Czapek. Para o cultivo em meio líquido Czapek (**Tabela 2**) enriquecido com 2 % de extrato de levedura, foram utilizados 20 frascos de Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL do meio. Após serem esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121 °C o meio foi resfriado até a temperatura ambiente e então, em capela de fluxo laminar, foram introduzidos 3 pequenos discos do microrganismo, e incubados durante 30 dias.

Tabela 2: Meio Czapek enriquecido com 2% de extrato de levedura.

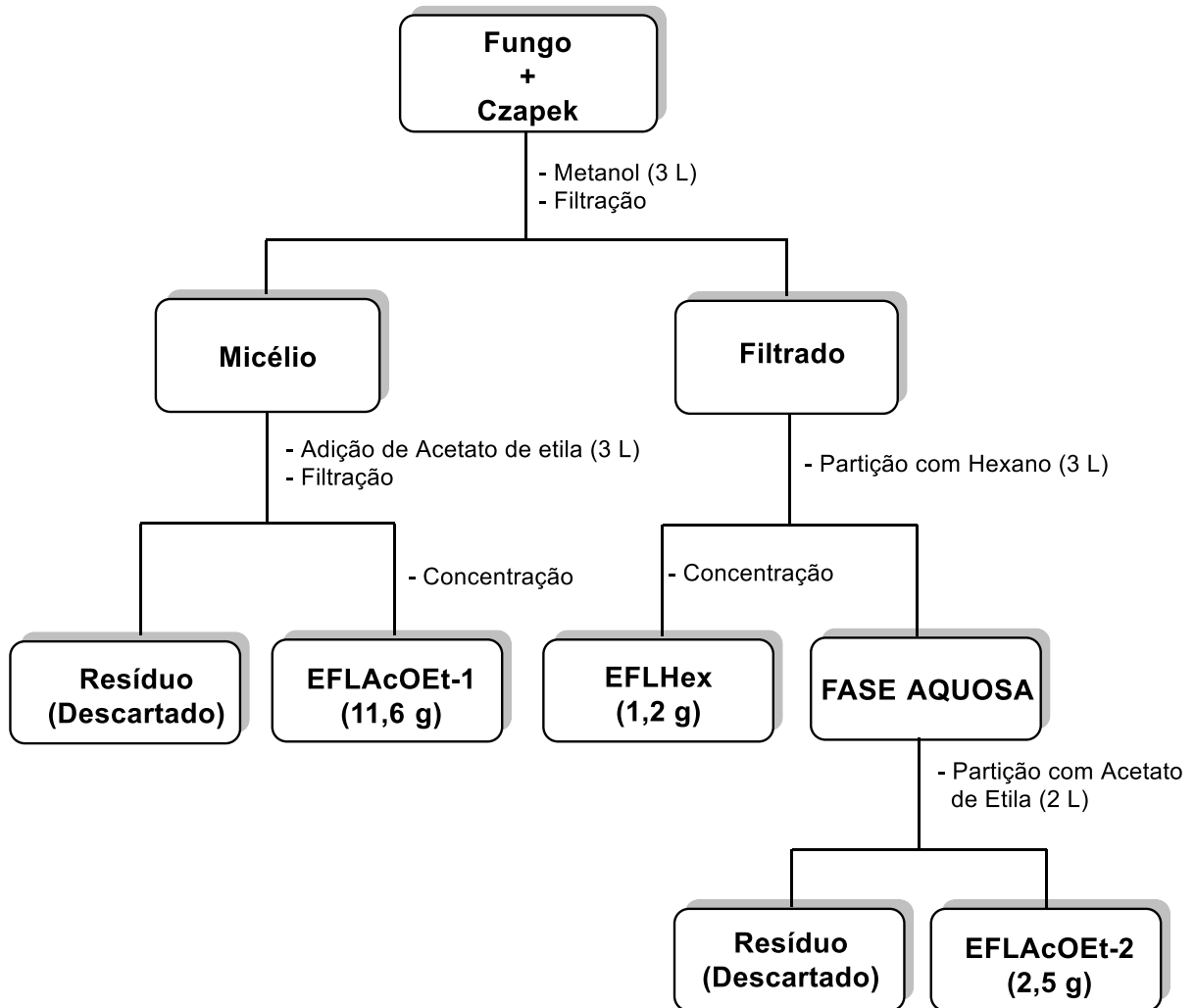
REAGENTES	QUANTIDADES
NaNO ₃	3,0 g
K ₂ HPO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Glicose	30 g
Extrato de levedura	20 g
H ₂ O	1 L

4.3.5.1 Obtenção dos extratos em meio líquido

Após o período de incubação foram obtidos dois materiais por filtração a vácuo, o micélio e o filtrado aquoso. Ao micélio foi adicionado acetato de etila e o sistema ficou em repouso por 24 horas, para que o solvente destruísse os esporos evitando-se o risco de contaminação durante o manuseio. O sistema foi submetido à filtração e a solução foi concentrada, obtendo-se 11,6 g do extrato acetato de etila do micélio (**EFLAcOEt-1**).

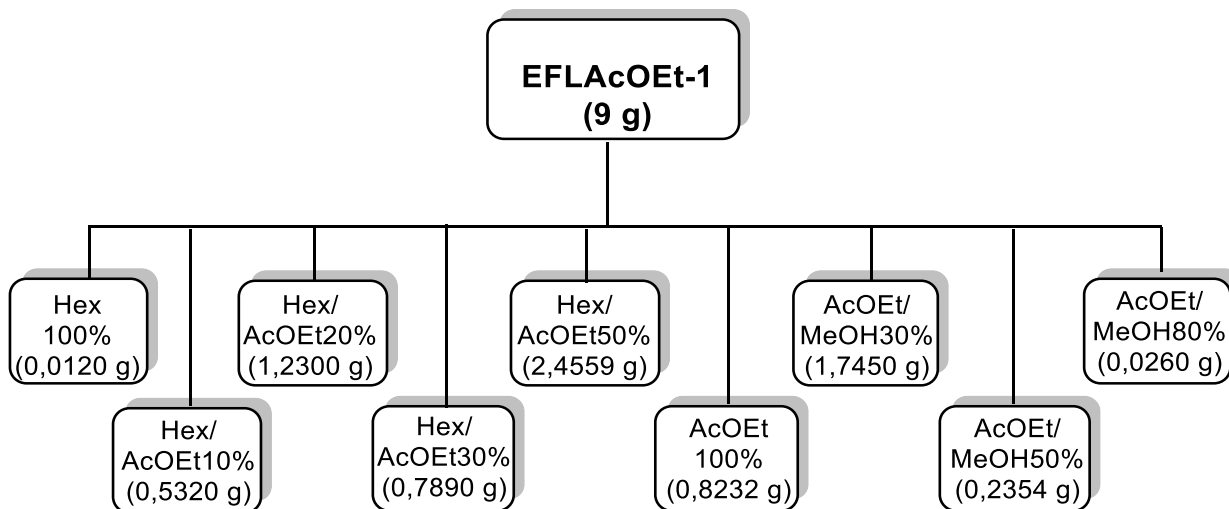
O filtrado aquoso foi submetido à partição com hexano e posteriormente com acetato de etila, na proporção 1:1. A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica secada com Na₂SO₄, filtrada e concentrada para a obtenção de 1,2 g de extrato hexânico (**EFLHex**) e 2,5 g do extrato acetato de etila (**EFLAcOEt-2**). A **Figura 18** mostra o fluxograma com os procedimentos descritos.

Figura 18: Fluxograma de obtenção dos extratos a partir do cultivo do fungo em meio líquido (Czapek).



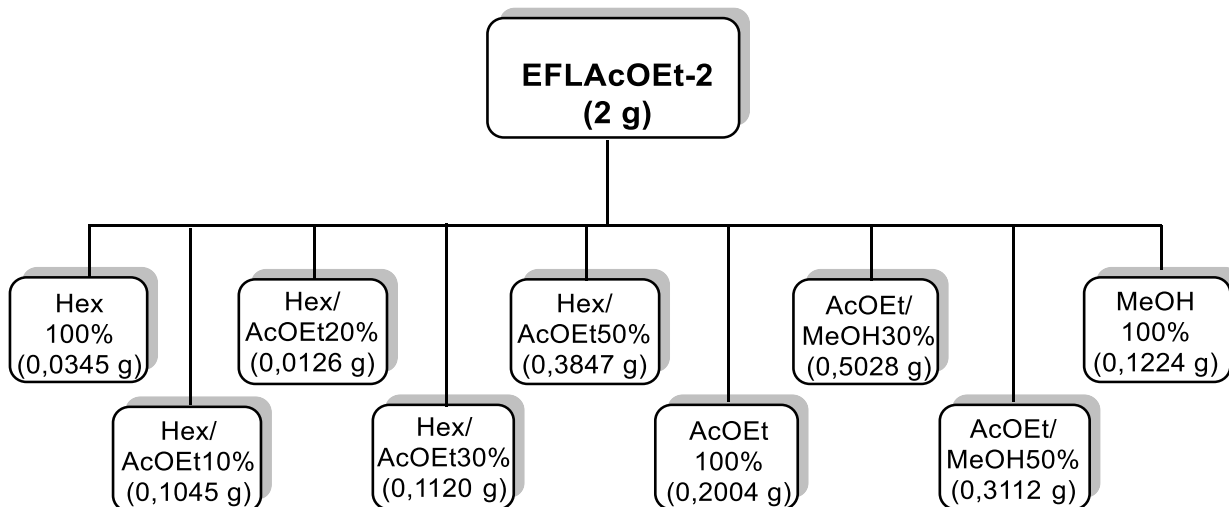
4.3.5.2 Fracionamento do extrato EFLAcOEt-1

O extrato EFLAcOEt-1 (9 g) foi submetido ao fracionamento (**Figura 19**) em coluna de sílica gel utilizando-se como eluentes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou misturados em gradientes crescentes de polaridades, totalizando 9 frações. A partir da fração Hex 100% foi isolada a substância **S6** (12 mg), a qual foi identificada por técnica de RMN de ^1H e comparação com dados da literatura.

Figura 19: Fluxograma do fracionamento do extrato EFLAcOEt-1

4.3.5.3 Fracionamento do extrato EFLAcOEt-2

O extrato EFLAcOEt-2 (2 g) foi submetido ao fracionamento (**Figura 20**) em coluna de sílica gel utilizando-se como eluentes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou misturados em gradientes crescentes de polaridades, que a partir da fração Hex/AcOEt 20% foi isolada a substância **S7** (12,6 mg), a qual foi identificada por técnicas de RMN ^1H , ^{13}C e comparação com dados da literatura.

Figura 20: Fluxograma do fracionamento extrato EFLAcOEt-2

4.4 TÉCNICA DE REAÇÃO DE BIOTRANSFORMAÇÃO

4.4.1 Reativação do microrganismo em placa de Petri

Um fragmento do fungo foi repicado de forma asséptica em placa de Petri separadas, utilizando meio sólido, BDA (batata, dextrose e ágar), onde para o preparo do meio foram utilizados 3,9 g de BDA solubilizados em água destilada e aferido para 100 mL. A solução foi esterilizada em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

O meio foi distribuído para cada placa de Petri e deixado em repouso a temperatura ambiente para que ficasse semissólido. Em seguida, em capela de fluxo laminar, foi inoculado um micélio para cada placa e levadas ao BOD a 27°C, onde permaneceram durante o seu desenvolvimento, para serem inoculados no meio de cultura líquida, nas reações de biotransformações.

4.4.2 Preparação do meio de cultura líquido para cada biotransformação

Na reação de biotransformação foi utilizado como meio de cultivo o extrato de Sabouraud. O meio foi preparado solubilizando em balão de fundo chato com água destilada, 20 g de glicose-d anidra, 10 g de peptona e aferido para 1 litro de solução. O meio foi transferido para frascos de Erlenmeyer e esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121 °C.

4.4.3 Adição do fungo endofítico e do substrato ao meio de cultura

Foram preparados 7 frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio de cultivo. Ao meio de cultivo foram adicionados 3 pellets do fungo e 40 mg do substrato (solubilizado em 50 mL de dimetilsufóxido e 50 mL de cetona) em quatro desses frascos (dois frascos de Erlenmeyer para cada substrato); outros dois ficaram para o controle, em um foi adicionado o substrato ao meio de cultivo, e no outro foi adicionado o fungo ao meio de cultivo. Todos os frascos com o sistema reacional e os de controle foram colocados à mesa agitadora orbital (Shaker) (**Figura 21**) e permaneceram por dez dias.

Figura 21: Sistema reacional na mesa agitadora

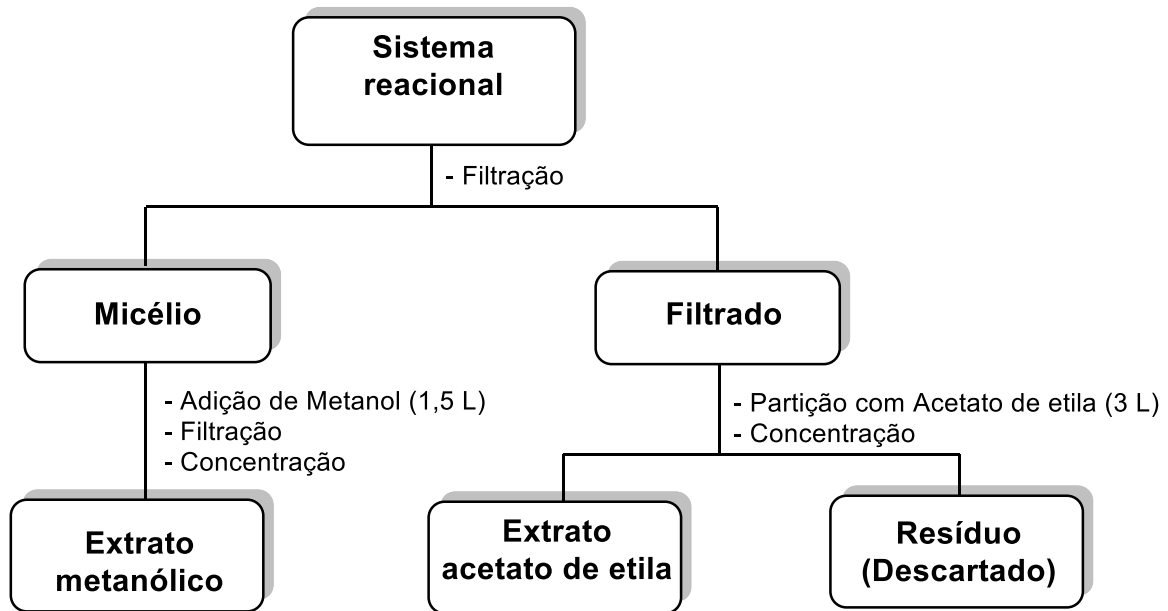


Fonte: autor

4.4.4 Filtração e Partição da solução resultante do meio de cultura

Após o período de agitação, os meios foram filtrados por filtração simples. O filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila na proporção de 1:1, duas vezes ou mais, se necess. A fase acetato de etila resultante foi concentrada. Ao micélio foi adicionado metanol, ficando em repouso durante 4 horas resultando em extrato metanólico (**Figura 22**).

Figura 22: Fluxograma de obtenção dos produtos da biotransformação



4.5 ATIVIDADE FITOTÓXICA

A atividade fitotóxica foi realizada no Laboratório de Agroindústria da EMBRAPA e avaliada em duas etapas. Na primeira, foram avaliados os efeitos dos diferentes extratos brutos sobre a germinação de sementes das plantas invasoras de pastagens *Mimosa pudica* (Malícia) e *Senna obtusifolia* (Mata-pasto). Na segunda etapa os extratos que apresentaram atividade positiva, ou seja, promoveram a inibição da germinação das sementes das plantas invasoras em relação ao tratamento considerado testemunha (apenas água destilada), foram fracionados e as frações testadas em bioensaios subsequentes, até o isolamento das substâncias responsáveis pela atividade alelopática biodirecionado.

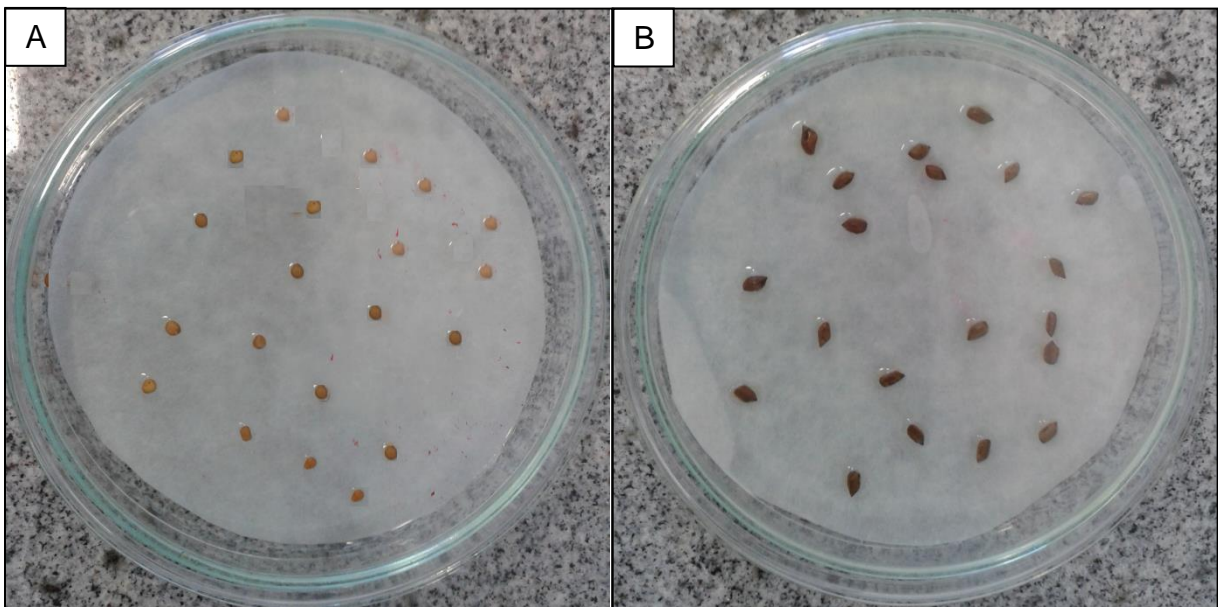
4.5.1 Bioensaio de germinação das sementes

Os bioensaios de germinação das sementes foram realizados em placa de Petri de 9 cm de diâmetro. Em cada placa contendo uma folha de papel de filtro foram adicionadas 20 sementes das espécies receptoras umedecidas com 3 mL da solução a ser testada e, quando necessária, mais água foi adicionada para manter a concentração da solução. Os resultados obtidos foram comparados utilizando como

solução testemunha, água destilada. Os bioensaios foram desenvolvidos em câmara de germinação, em condições controladas a temperatura constante de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

A germinação foi monitorada durante cinco dias, com contagens diárias e eliminação das sementes germinadas. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentavam extensão de 2,0 mm de raiz primária. A **Figura 23** mostra as placas de Petri com as sementes.

Figura 23: Germinação das sementes: (A) sementes de Malícia; (B) sementes de Mata-pasto



Fonte: autor

Os bioensaios foram realizados em triplicata para cada espécie testada e o tratamento estatístico foi calculado de acordo com a equação abaixo.

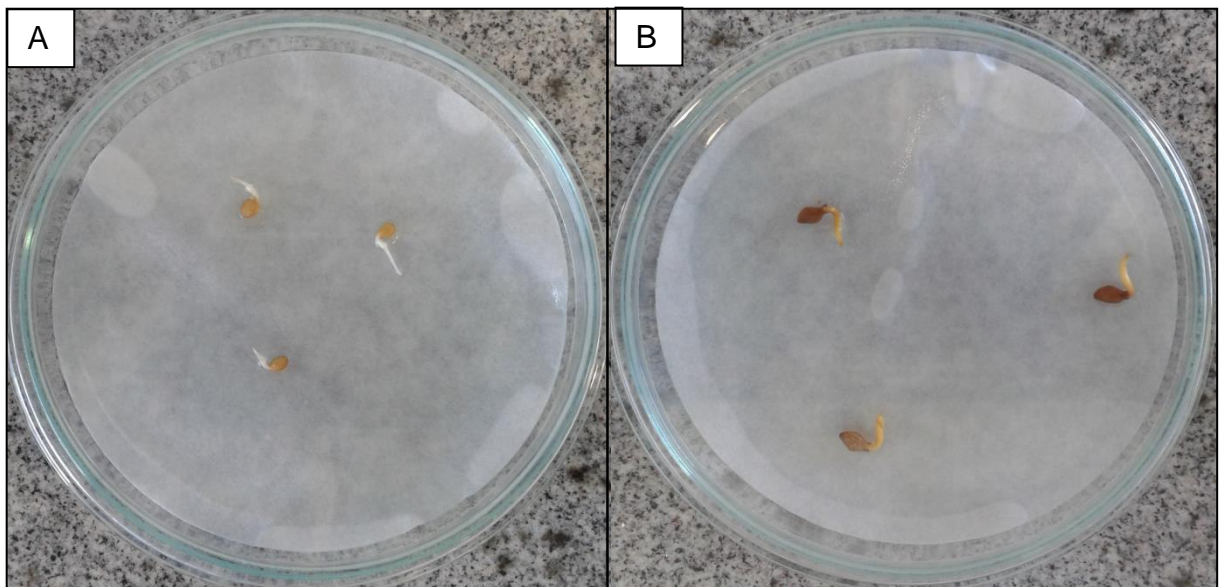
$$\% \text{ de inibição} = 1 - \frac{\bar{\Sigma}\%G}{\bar{\Sigma}\%G_T} \times 100$$

Em que $\bar{\Sigma}\%G$ é a média do somatório dos percentuais de germinação para cada solução testada e $\bar{\Sigma}\%G_T$ é a média do somatório dos percentuais de germinação para a solução testemunha.

4.5.2 Bioensaio de desenvolvimento de radícula e do hipocótilo

Três sementes pré-germinadas de cada espécie receptora com aproximadamente 2,0 cm de germinação foram colocadas em placa de Petri com papel de filtro umedecido com 3 mL da solução a ser testada. Ao final do período de 5 dias de crescimento, mediu-se o comprimento da radícula e do hipocótilo nas duas concentrações e comparou-se com os da solução testemunha. Os ensaios foram desenvolvidos em câmara de germinação em condições controladas de 25 °C de temperatura e fotoperíodo de 24 horas. A **Figura 24** mostra as placas de Petri com as sementes pré-germinadas.

Figura 24: Desenvolvimento da radícula e hipocótilo: (A) sementes de Malícia; (B) sementes de Mata-pasto



Fonte: autor

Os bioensaios foram realizados em triplicata para cada espécie testada e o tratamento estatístico foi calculado de acordo com a equação abaixo.

$$\% \text{ de inibição} = 1 - \frac{\bar{\Sigma}\%G}{\bar{\Sigma}\%G_T} \times 100$$

Em que $\bar{\Sigma}\%G$ é a média do somatório dos percentuais de desenvolvimento do comprimento para cada solução testada e $\bar{\Sigma}\%G_T$ é a média do somatório dos percentuais de desenvolvimento do comprimento para a solução testemunha.

4.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA PARA *Leishmania amazonensis*

4.6.1 Preparação do meio RPMI 1640 para *Leishmania amazonensis*

O conteúdo de um frasco (10,4 g) em pó do meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) foi dissolvido em água ultrapura (1000 mL) sob agitação, em seguida foi adicionado bicarbonato de sódio (2 g), tampão HEPES (5 g), penicilina 10.000 U/L e 50 mg/L de gentamicina. O pH do meio foi verificado e ajustado sempre quando não se encontrava em pH neutro (pH= 7,2). O meio foi esterilizado em membrana de 0,22 µm e acondicionado em frascos estéreis a 4°C (VEIGA, 2013).

4.6.2 Espécie de *Leishmania* e cultivo

O parasita utilizado no presente estudo foram formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, isolada de caso humano procedente do município de Ulianópolis do estado de Pará cedido pelo Instituto Evandro Chagas (ICE, Ananindeua/Pará) sob o registro – MHOM/BR/2009/M26361.

As formas promastigotas da espécie *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas no meio de crescimento Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), sendo mantidas através de passagens semanais como descrito. Foram transferidos 0,5 mL de suspensão de formas promastigotas para garrafas de cultura de células, cada uma contendo 5 mL de meio RPMI completo. Em seguida, observou-se o cultivo em microscópio invertido para verificação da viabilidade das formas em meio RPMI. O cultivo do parasita em meio RPMI completo foi feito a 26°C ± 1°C.

4.6.3 Ensaio da Atividade Antipromastigota

Formas promastigotas de *L. amazonensis* obtidas durante a fase logarítmica de crescimento, foram reunidas por centrifugação em meio RPMI completo a 3500 rpm por 10 minutos. O precipitado foi resuspenso em meio RPMI completo, as promastigotas foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração correspondente a 5×10^6 parasitas/mL. Esta suspensão foi distribuída

em placas com culturas de células com fundo chato previamente dosificadas contendo o extrato vegetal, frações e subfrações em diferentes concentrações. Em seguida, as placas foram incubadas a 26°C por 24 horas.

O controle negativo consistiu de uma suspensão do parasita e meio de cultura, controle do solvente (metanol evaporado + suspensão do parasito + meio) e o controle positivo consistiu de uma suspensão de promastigotas adicionada de Anfotericina B (25,12,5, 6,25, 3,125, 1,5625, 0,78125 e 0,3906 µ/mL).

Após o período de incubação de promastigotas com as amostras e fármacos foram adicionados 10 µL de MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) (5 mg/mL) em cada poço. A placa for recoberta com papel alumínio, sucedendo-se nova incubação por 4 horas em estufa a 26°C para que o MTT seja metabolizado e conseqüentemente fossem formados os cristais de formazan (MOTA et al. 2015).

Depois de 4 horas, foi adicionado 10 µL de dimetilsufóxido (DMSO), para solubilizar os cristais de formazan gerados, através da agitação manual ate completa solubilização dos cristais. Posteriormente, realizou-se leitura da densidade óptica (D.O) das amostras em leitor de placas de ELISA sob comprimento de onda de 490 nm. A viabilidade das formas promastigotas foi avaliada com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada. A porcentagem de células (promastigotas) foi calculada pela seguinte fórmula (NGURE et al., 2009):

$$\% \text{viabilidade} = \frac{\text{abs. Dos poços com amostra} - \text{abs. do reagente (branco)}}{\text{abs. Dos poços sem amostra} - \text{abs. do reagente (branco)}} \times 100$$

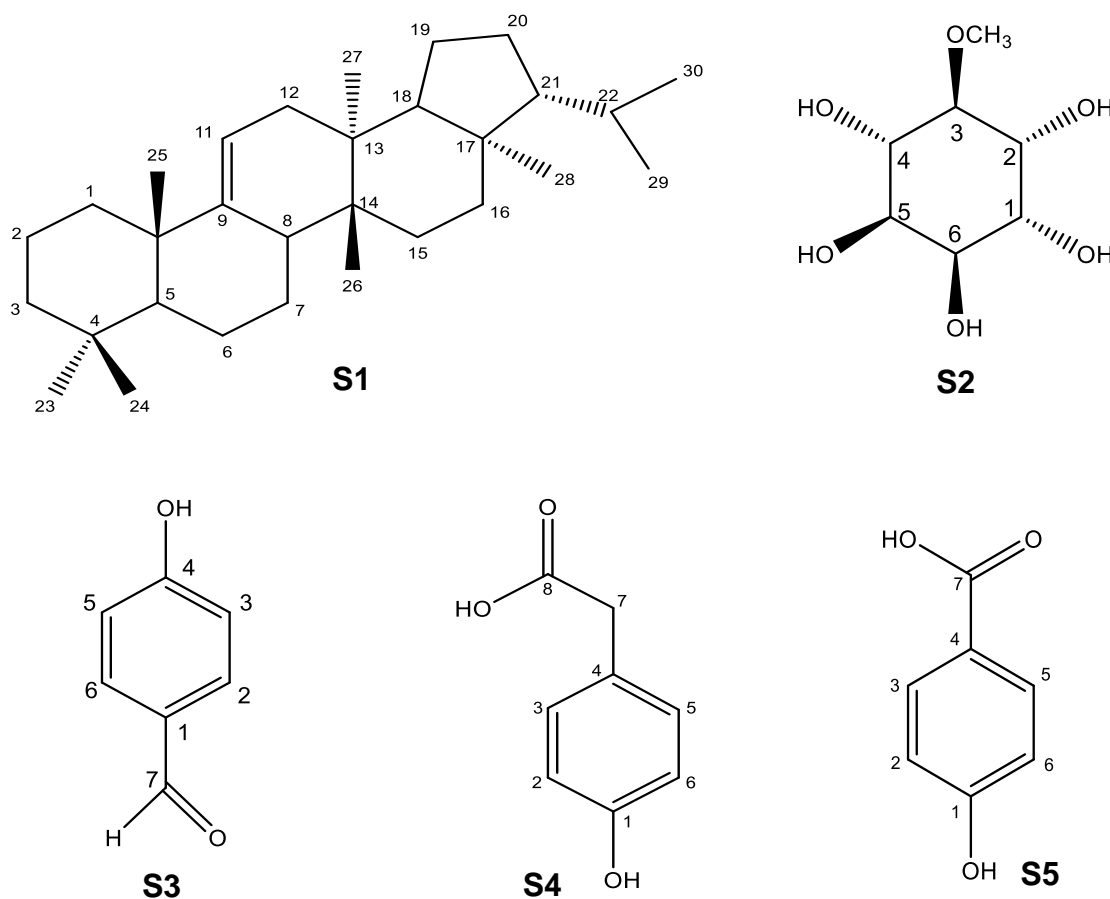
Abs - absorbância

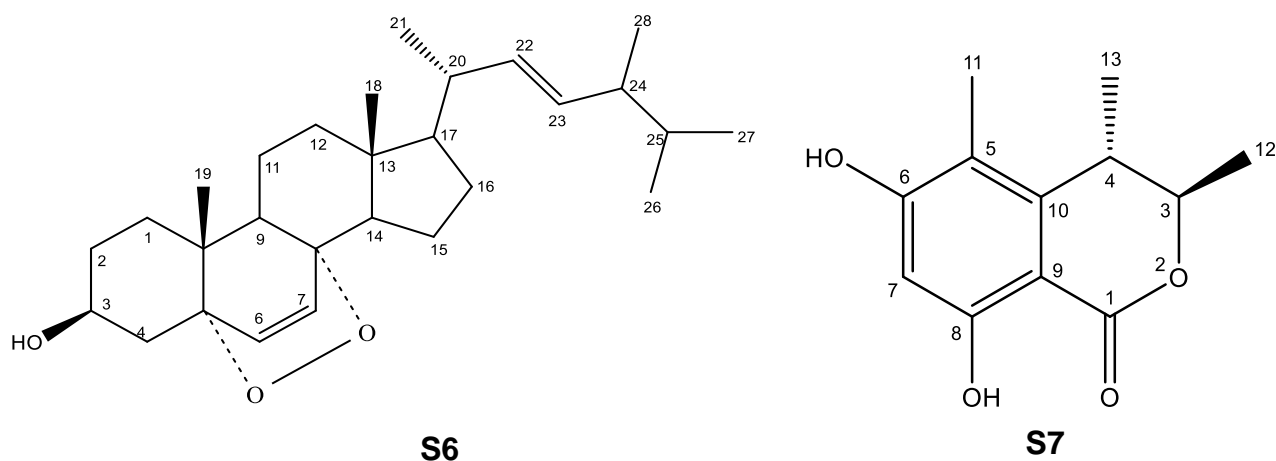
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DAS PARTES AÉREAS DE *Nephrolepis brownii* E DO FUNGO (NB-1) ASSOCIADO À ESPÉCIE

Durante o desenvolvimento deste trabalho foram realizados estudos químicos das partes aéreas de *N. brownii* e dos extratos fúngicos produzidos pelo fungo endofítico associado à planta. As substâncias isoladas e identificadas estão representadas na **Figura 25**.

Figura 25: Substâncias isoladas das partes aéreas de *Nephrolepis brownii* e do fungo (NB-1) associado à espécie

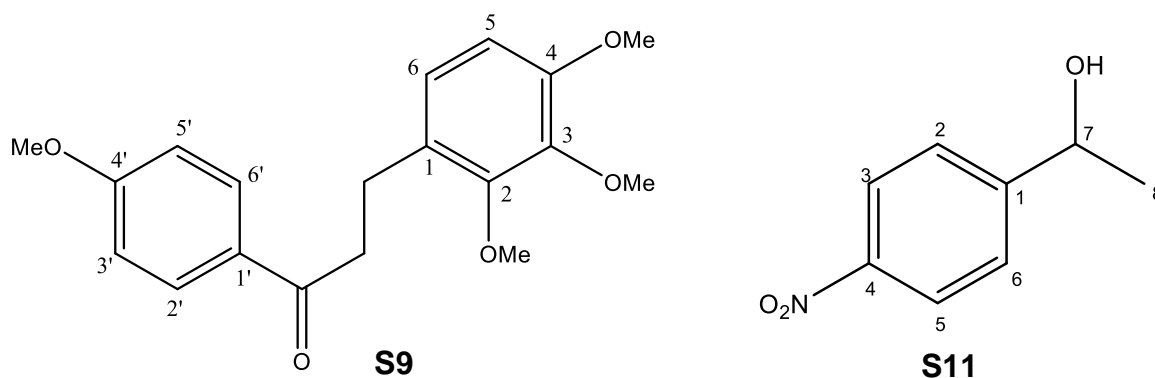




5.2 SUBSTÂNCIAS OBTIDAS POR REAÇÃO DE BIOTRANSFORMAÇÃO PROMOVIDA PELO FUNGO ENDOFÍTICO (NB-1) ASSOCIADO À *Nephrolepis brownii*

As reações de biotransformação promovida pelo fungo endofítico (NB-1) utilizando como substratos a chalcona (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(2,3,4-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ona e a 4-nitroacetofenona forneceram, respectivamente, as substâncias **S9** e **S11** (Figura 26).

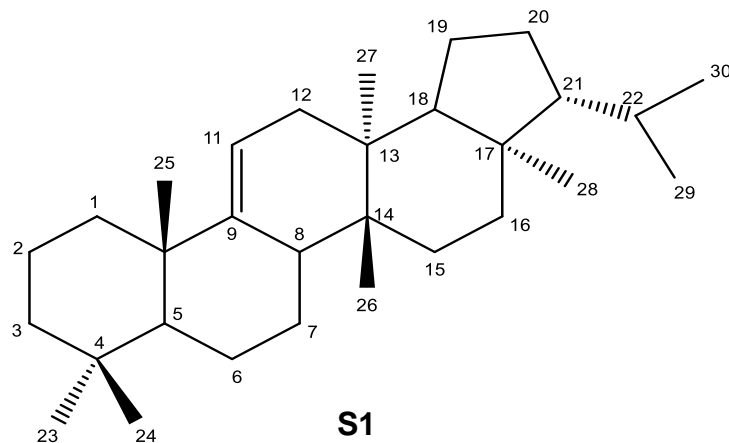
Figura 26: Substâncias obtidas por reação de biotransformação.



5.3 IDENTIFICAÇÃO DO TRITERPENO FERNENO (S1)

O Triterpeno FERN-9(11)-ENO (**Figura 27**) (FERNENO OU DAVALLENO), comumente isolado de plantas, principalmente das samambaias, também encontrado em espécie de mesmo gênero em relação à planta estudada neste trabalho, como a *Nephrolepis biserrata* (AHMAD; RAHMAN,1994) foi isolado a partir da fração hexano 100% obtida de uma coluna cromatográfica de sílica, do extrato EBM/AcOEt. A substância **S1** (20,6 mg) foi purificada por técnica de recristalização, obtendo-se um cristal de cor amarelada.

Figura 27: Estrutura química do Ferneno (**S1**)



No espectro de RMN de ^1H (**Figura 28**) observa-se um sinal de hidrogênio olefínico em $\delta_{\text{H}}=5,28$ (*ddd*, H-11), vários singletos ($\delta_{\text{H}}=1,05$; $\delta_{\text{H}}=0,89$; $\delta_{\text{H}}=0,88$; $\delta_{\text{H}}=0,85$; $\delta_{\text{H}}=0,84$; $\delta_{\text{H}}=0,82$; $\delta_{\text{H}}=0,76$; $\delta_{\text{H}}=0,73$) dos hidrogênios metílicos (H-25, H-29, H-24, H-23, H-30, H-27, H-28 e H-26, respectivamente).

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 30**) estão presentes 30 sinais de carbonos. Desses sinais, destacam-se os sinais de carbono $\delta_{\text{C}}=151,7$ e $\delta_{\text{C}}=115,7$ das posições 9 e 11, respectivamente, característicos de carbonos olefínicos.

O espectro de DEPT (**Figura 32**) ratifica a proposta estrutural do triterpeno, onde estão presentes 8 carbonos metílicos, 10 metilênicos, 6 metínicos e 6 não

hidrogenados. A proposta para elucidação estrutural também foi realizada com dados da literatura, conforme as **Tabelas 3 e 4**.

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H (ppm, 300 MHz, CDCl_3) do Triterpeno **S1**, juntamente com os dados da literatura (BOTTARI, 1972), (ppm, 270 MHz, CDCl_3) para essa substância. Nos parênteses estão os valores das constantes de acoplamento em Hz.

H	S1	S1 ^{lit.}
1		
2		
3		
5		
6		
7		
8		
11	5,28 <i>ddd</i> (2,4)	5,28 <i>ddd</i> (3.0)
12		
15		
16		
18		
19		
20		
21		
22		
23	0,85	0,85
24	0,88	0,89
25	1,05	1,05
26	0,73	0,73
27	0,82	0,82
28	0,76	0,76
29	0,89 d (6,6)	0,89 d (6,4)
30	0,83 d (6,3)	0,83 d (6,4)

Tabela 4. Dados de RMN de ^{13}C (ppm, 75 MHz, CDCl_3) do triterpeno **S1**, juntamente com os dados da literatura (BOTTARI, 1972), (ppm, 68 MHz, CDCl_3).

C	S1	S1^{lit.}
1	41,5	41,5
2	19,6	19,5
3	42,5	42,4
4	33,6	33,6
5	44,9	44,8
6	18,0	17,8
7	19,6	19,5
8	40,0	39,9
9	151,7	151,7
10	37,7	37,7
11	115,6	115,6
12	36,8	36,7
13	36,8	36,7
14	38,1	38,0
15	29,4	29,4
16	36,3	36,2
17	43,0	43,9
18	52,1	52,0
19	20,2	20,1
20	28,3	28,22
21	59,7	59,7
22	30,8	30,8
23	32,8	32,8
24	21,7	21,7
25	25,1	25,0
26	15,9	15,8
27	15,4	15,4
28	14,0	14,1
29	22,2	22,1
30	23,0	23,0

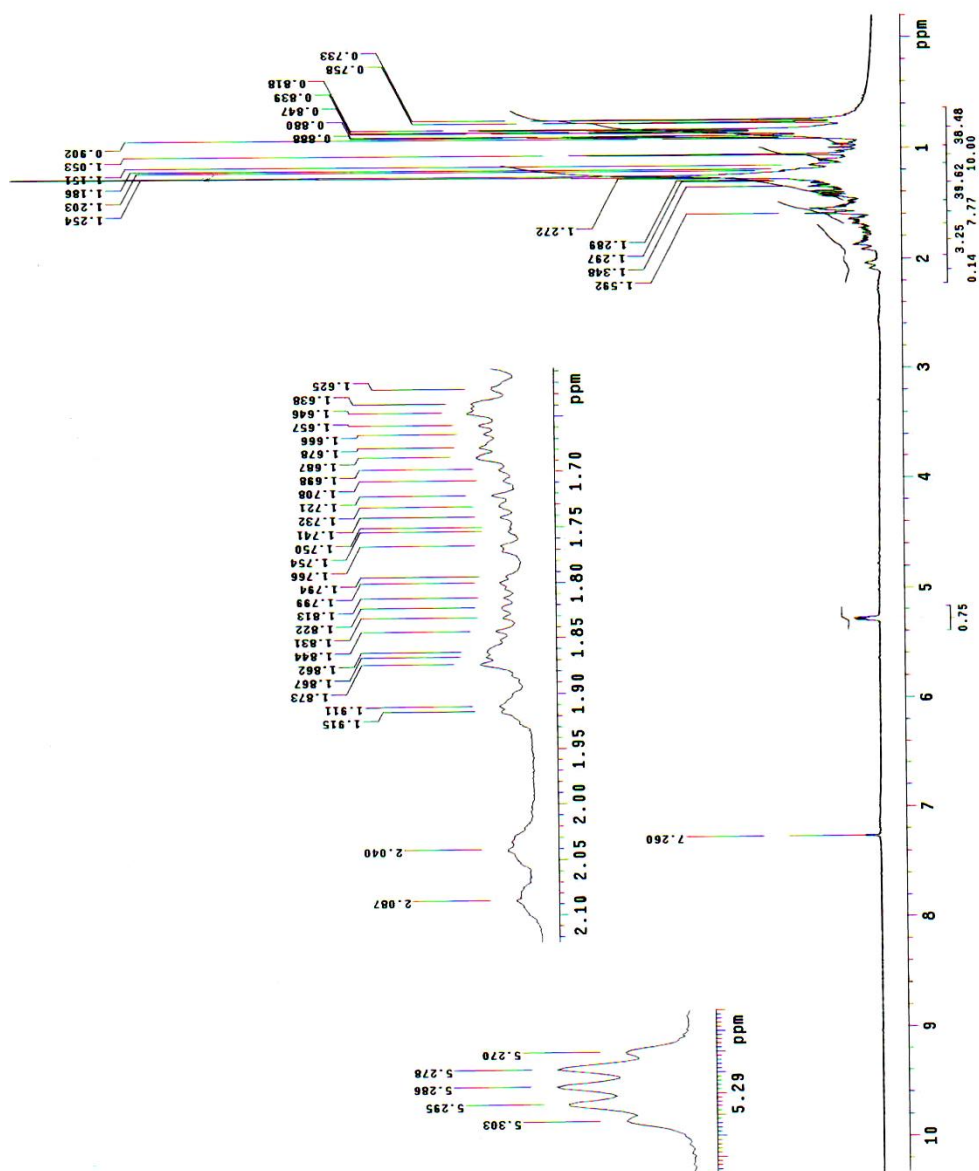
Figura 28 : Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S1**.

Figura 29: Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S1**.

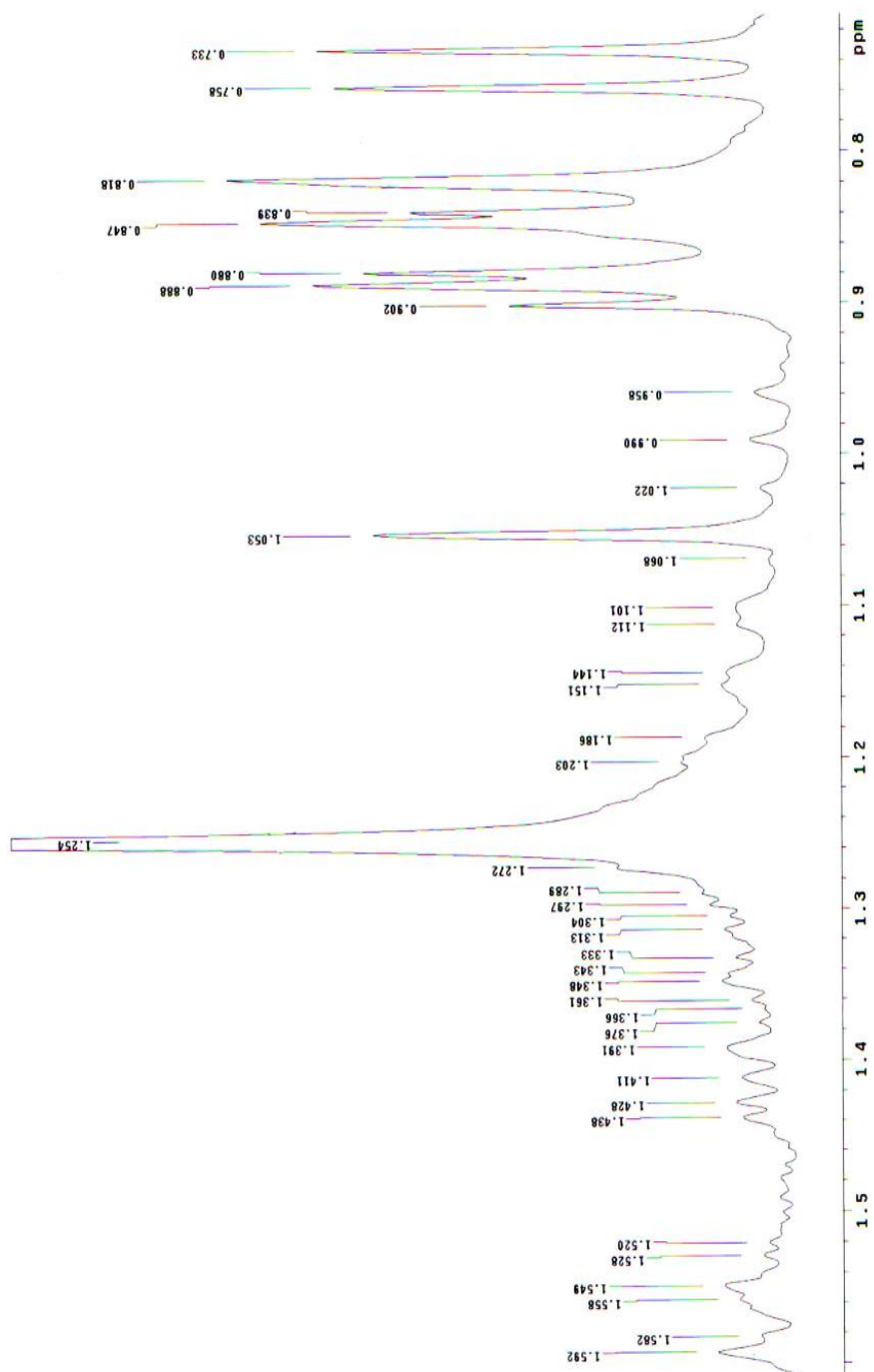


Figura 30: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S1**.

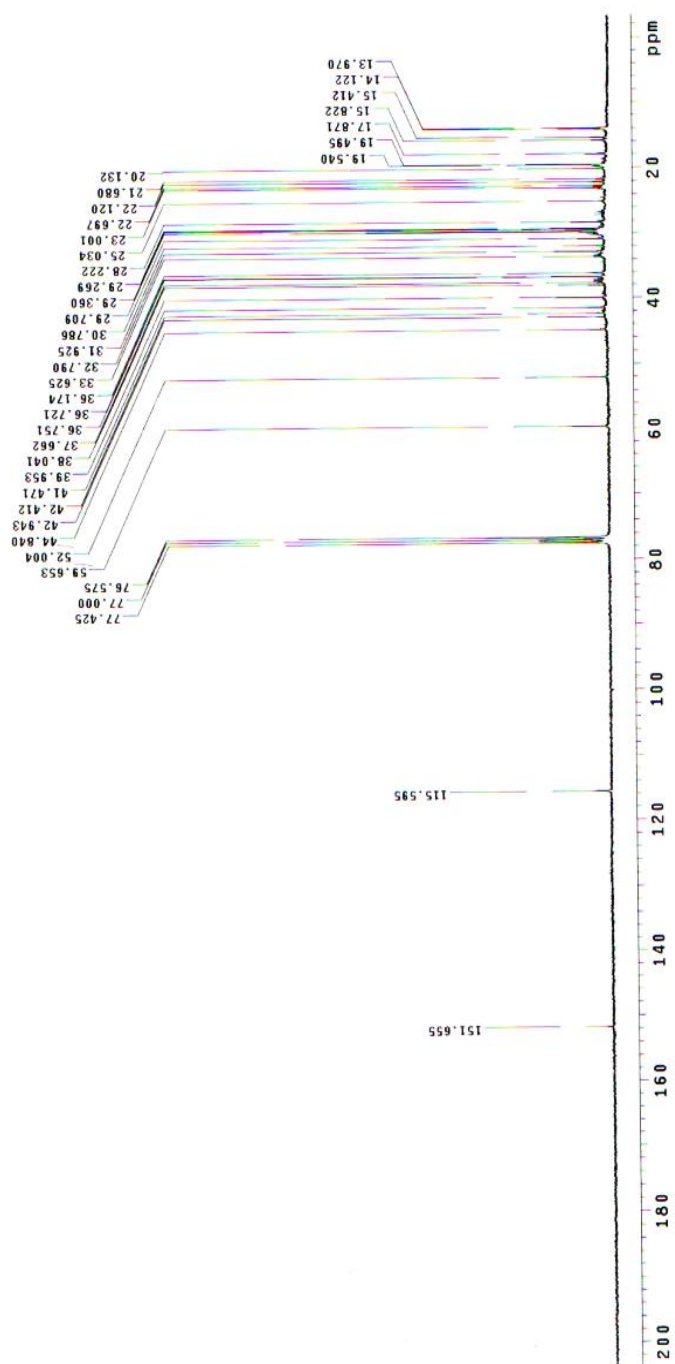


Figura 31: Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S1**.

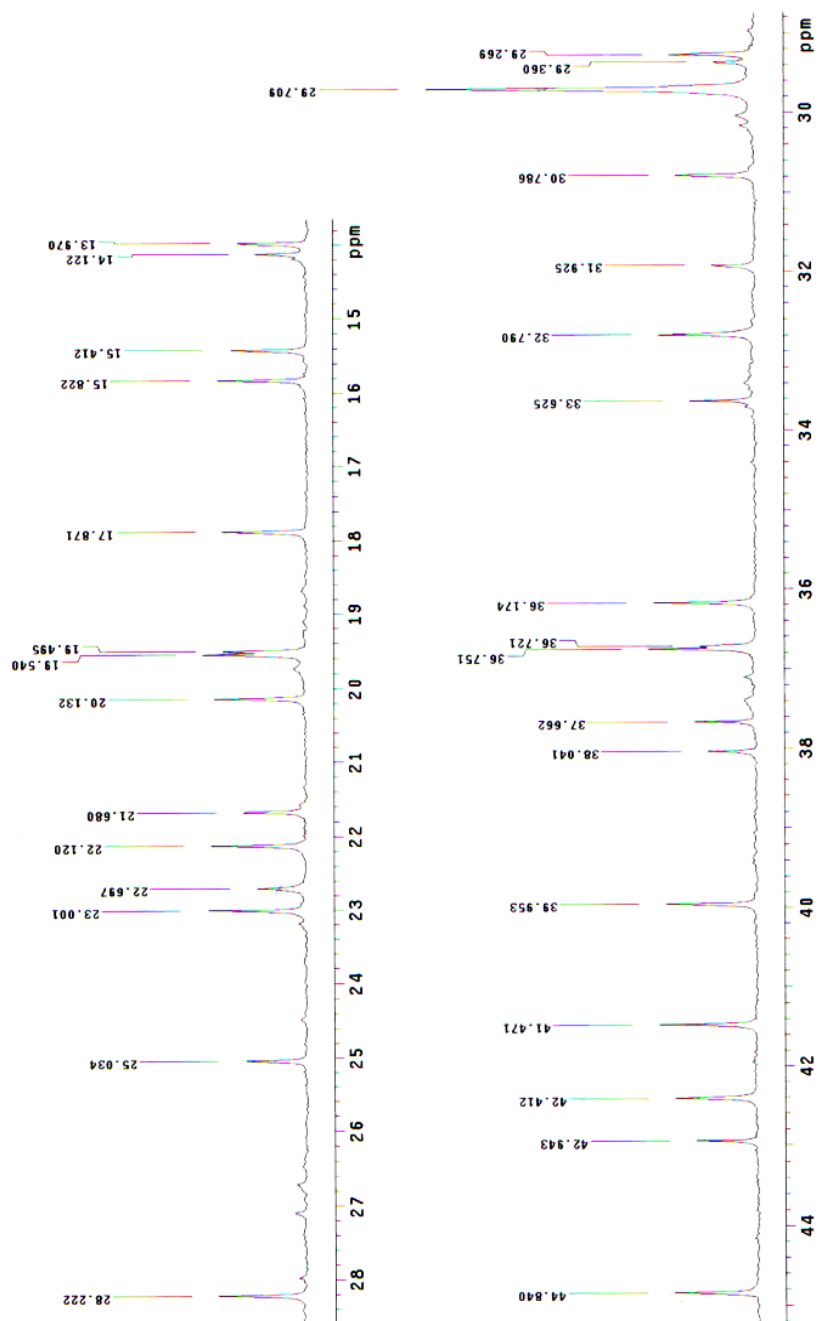


Figura 32: Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3) de **S1**.

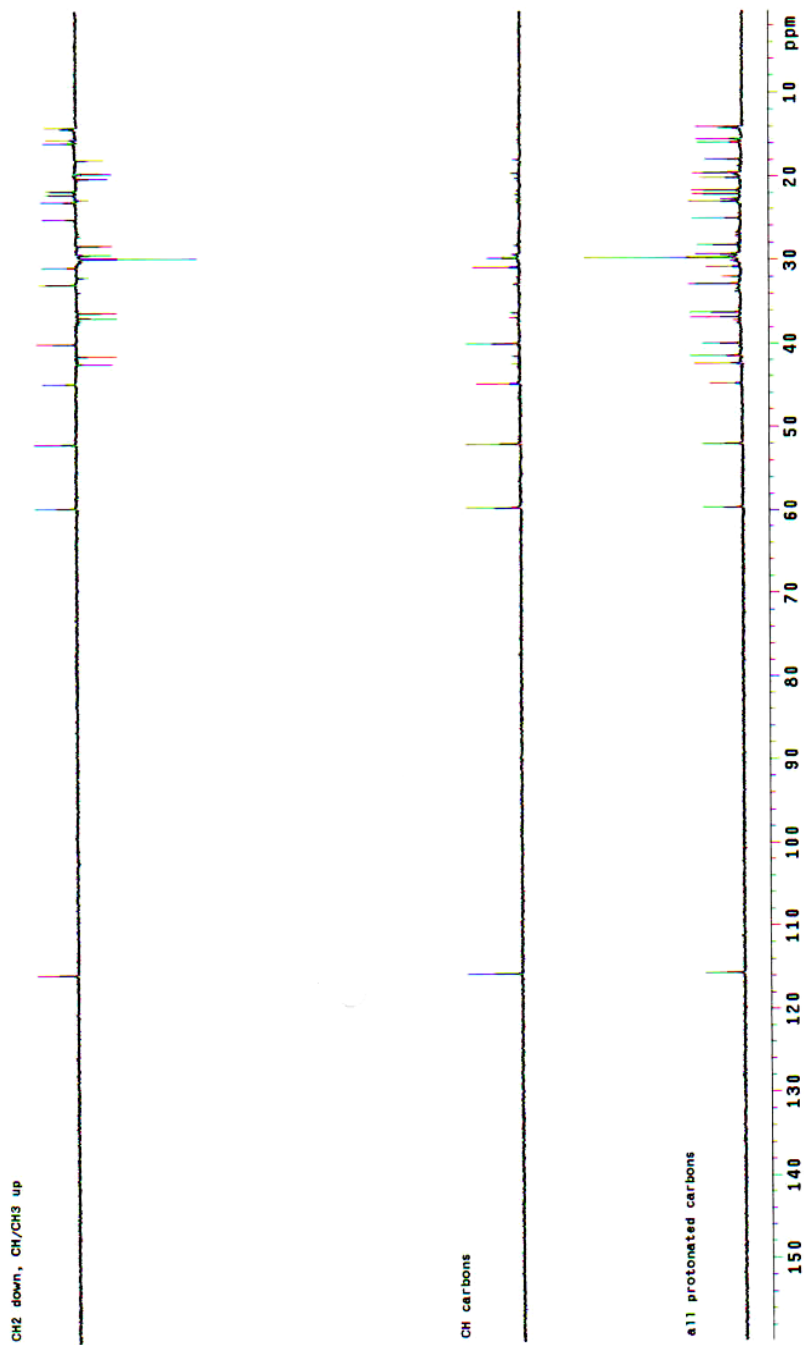
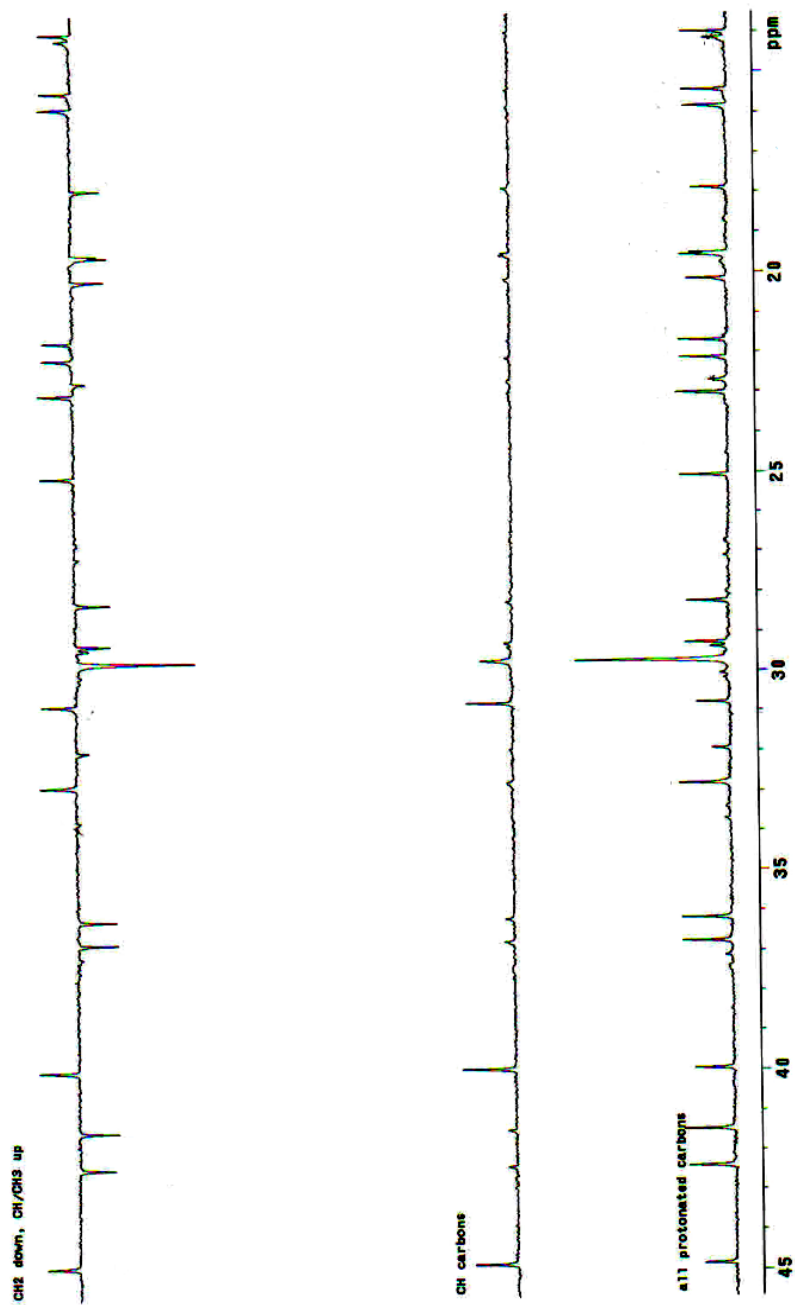


Figura 33: Expansão do espectro de DEPT (75 MHz, CDCl₃) de **S1**.



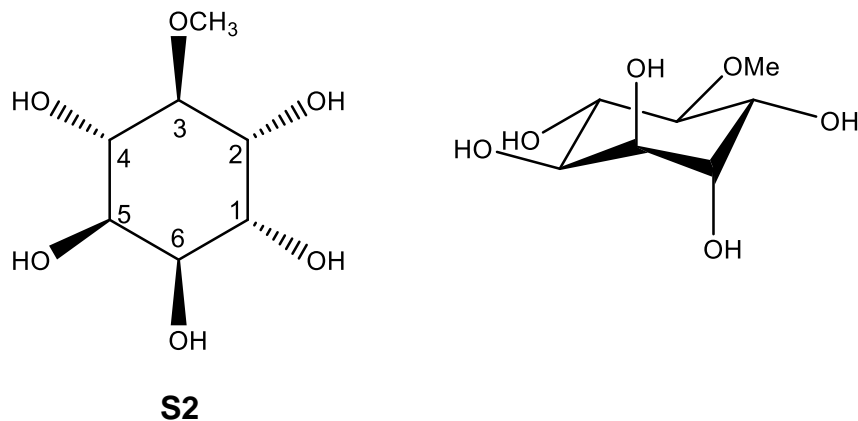
5.4 IDENTIFICAÇÃO DO PINITOL (S2)

O pinitol (**Figura 34**) (3-metoxiciclohexano-1,2,4,5,6-pentaol) foi isolado da fração AcOEt/MeOH 50% do EBM/AcOEt, que após ser lavado com metanol formou cristais brancos tipo agulhas, solúvel apenas em DMSO e água. Essa substância é conhecida por ser anti-diabética, pois acentua a função da insulina e diminui a glicose do sangue. Foi identificada pela primeira vez no Pinho açúcar (*Pinus lambertiana*) (ANDERSON; MACDONALD; FISCHER, 1479). Também apresenta atividade fitotóxica contra as sementes de *Lactuca sativa* (DELLAGRECA et al., 2007), anti-inflamatória (LEE; JUNG; JEONG, 2007) e anti-asmática (LEE; JUNG; JEONG, 2007). Pinitol é usado no tratamento da diabetes mellitus e das complicações crônicas associadas à obesidade, hiperlipidemias, dislipidemias, aterosclerose, hipertensão, doenças cardiovasculares, AIDS, câncer, desnutrição, stress, lúpus, doenças auto-imunes, doenças endócrinas e complicações decorrentes da atividade atlética ou de inatividade (SUKANTHA; SHUBASHINI, 2015).

No espectro de RMN de ^1H (**Figura 35**) observa-se um singlete em $\delta_{\text{H}}= 3,44$, referente aos hidrogênios oximetílicos; sinal de hidrogênio metínico em $\delta_{\text{H}}= 2,67$ (*t*, $J=9,0$ Hz, H-3), 3,12 (*m*, H-1 e H-5), 3,40 (*m*, H-2 e H-4), 3,67 (*dd*, $J=6$, $J=2,7$, H-6). Três sinais de hidrogênios de hidroxilas em $\delta_{\text{H}}= 4,42$; 4,50 e 4,63 (*dd*, OH-1 e OH-5, $J=5,7$; OH-6, $J=3,3$; OH-2 e OH-4, $J=4,5$, respectivamente).

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 37**) junto com o de DEPT (**Figura 38**) foram observados 5 sinais, alguns sobrepostos, sendo seis de carbonos metínicos em $\delta_{\text{C}}= 72,1$ (C-1 e C-5), 72,4 (C-2 e C-4), 72,6 (C-6) e 85,7(C-3); um sinal em $\delta_{\text{H}}= 59,9$ referente a um carbono oximetílico.

No espectro de COSY (**Figura 39**) observa-se correlações entre H-3 e H-1/H-5; entre H-3 e H-2/H-4; entre H-1/H-5 e H-2/H-4; e entre H-1/H-5 e H-6. No espectro de HETCOR (**Figura 40**) confirma-se as posições dos hidrogênios e seus respectivos carbonos, que juntamente com dados da literatura foi possível elucidar a estrutura, como indicado na **Tabela 5**.

Figura 34: Estruturas química do Pinitol (**S2**)**Tabela 5:** Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e COSY (300 MHz, DMSO) do pinitol juntamente com dados da literatura (BLANCO; FLORES; ALMANZA, 2008).

H	δ_{H}	$\delta_{\text{H}}^{\text{Lit.}}$	COSY	δ_{C}	$\delta_{\text{C}}^{\text{Lit.}}$
1	3,12	3,5	H-2,H-6, OH-1	72,1	70,0
2	3,40	3,62	H-1,H-3,OH-2	72,4	72,5
3	2,67	3,0	H-2,H-4	85,7	83,8
4	3,40	3,32	H-3,H-5,OH-4	72,4	72,48
5	3,12	3,41	H-4,H-6,OH-5	72,1	70,9
6	3,67	3,62	H-1,H-5,OH-6	72,6	71,9
OCH ₃	3,44	3,62		59,9	59,63
OH-1	4,42	4,63	H-1		
OH-2	4,63	4,46	H-2		
OH-4	4,63	4,51	H-4		
OH-5	4,42	4,34	H-5		
OH-6	4,50	4,72	H-6		

Figura 35: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) de **S2**.

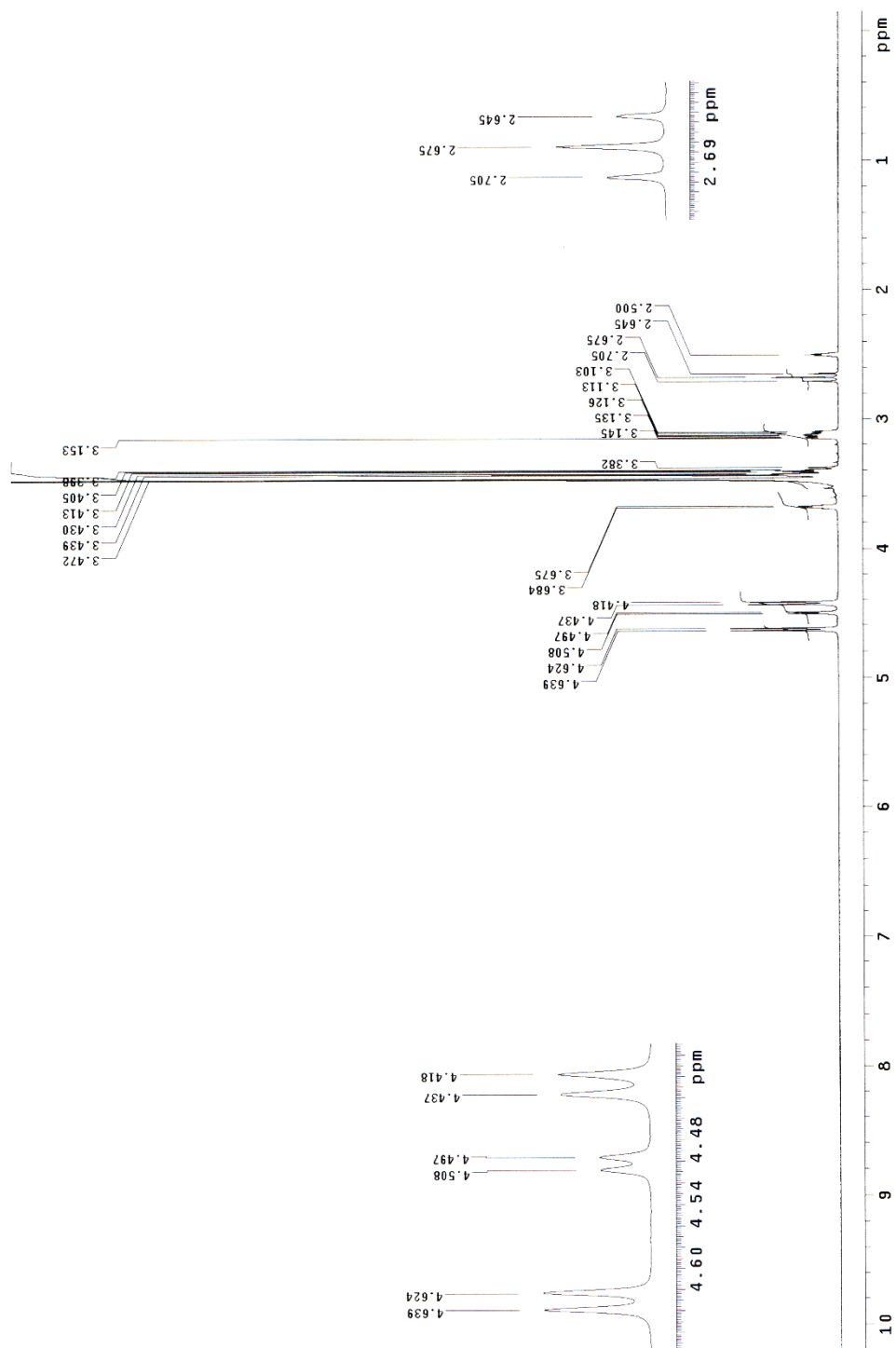


Figura 36: Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, DMSO) de **S2**

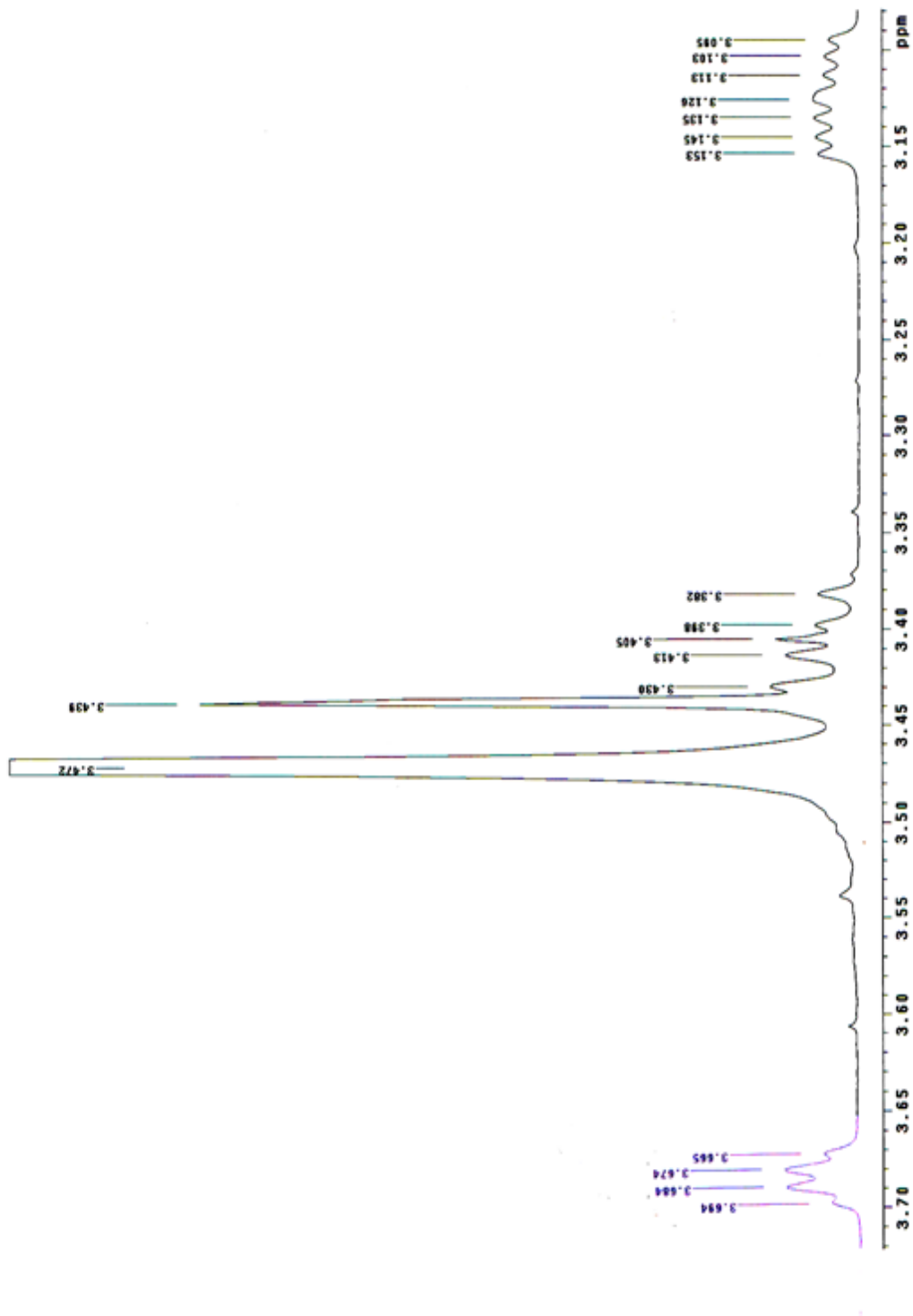


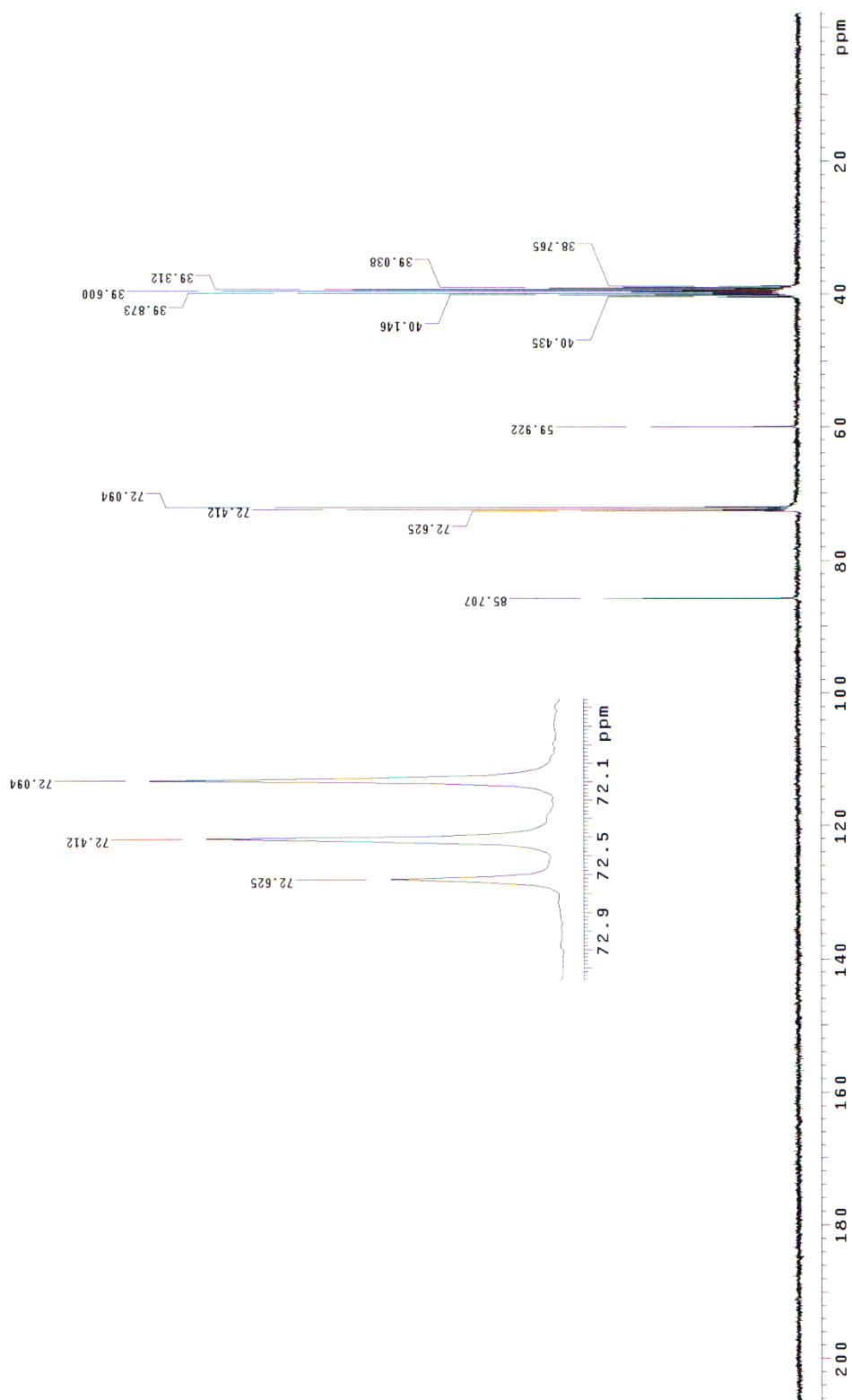
Figura 37: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, DMSO) de **S2**

Figura 38: Espectro de DEPT (75 MHz, DMSO) de **S2**

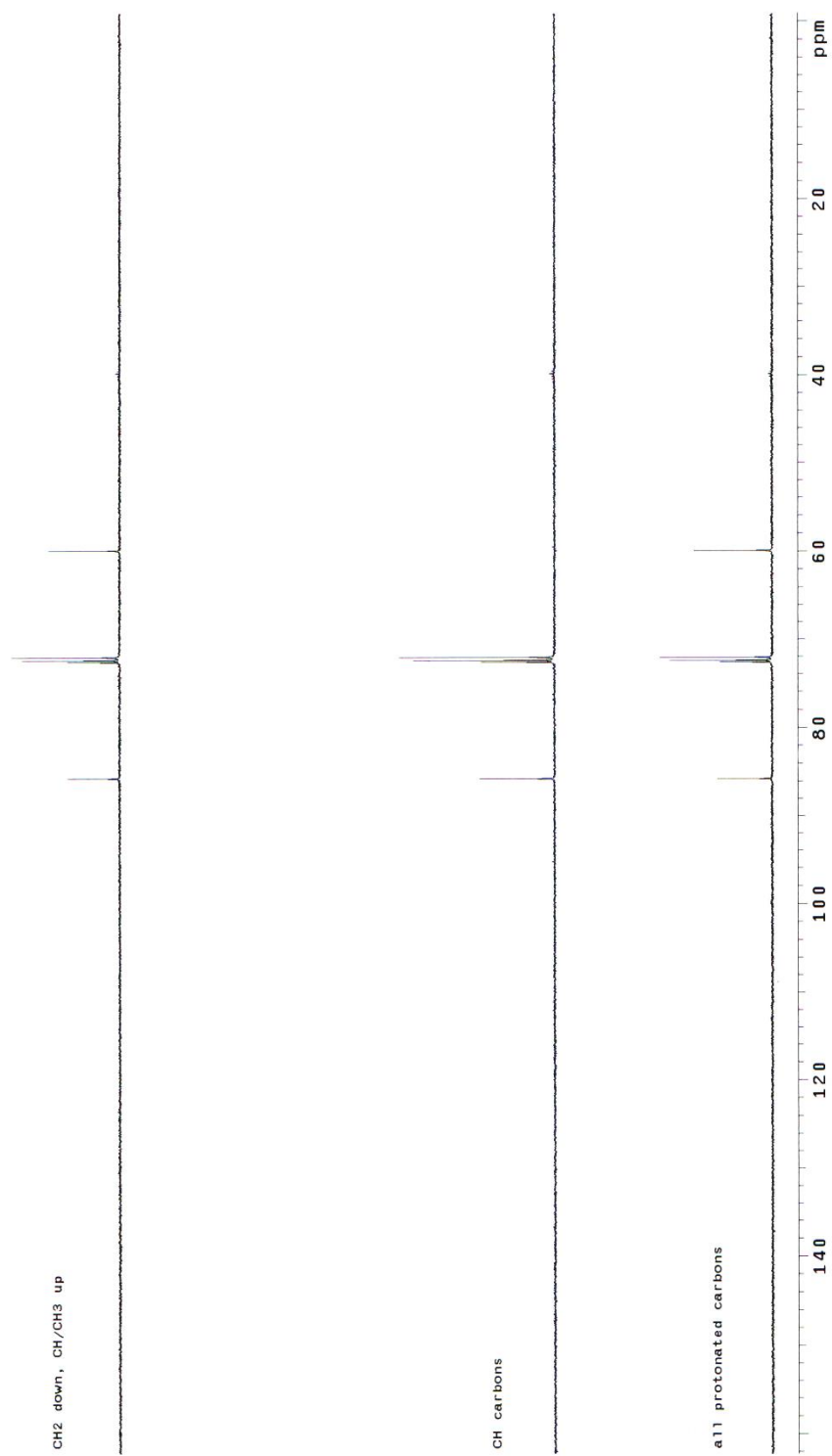


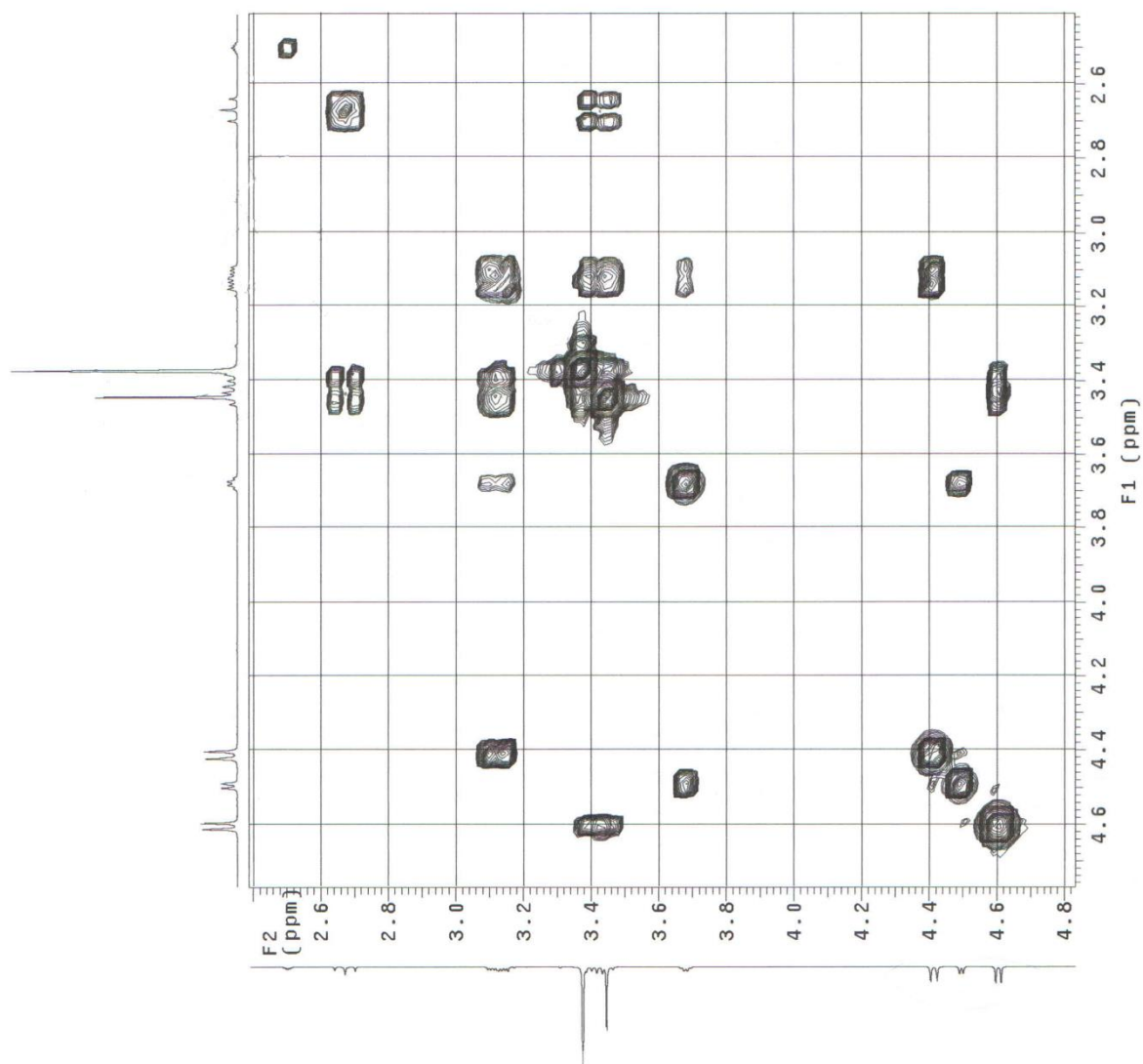
Figura 39: Espectro de COSY (300 MHz, DMSO) de **S2**

Figura 40: Espectro de HETCOR (DMSO) de S2

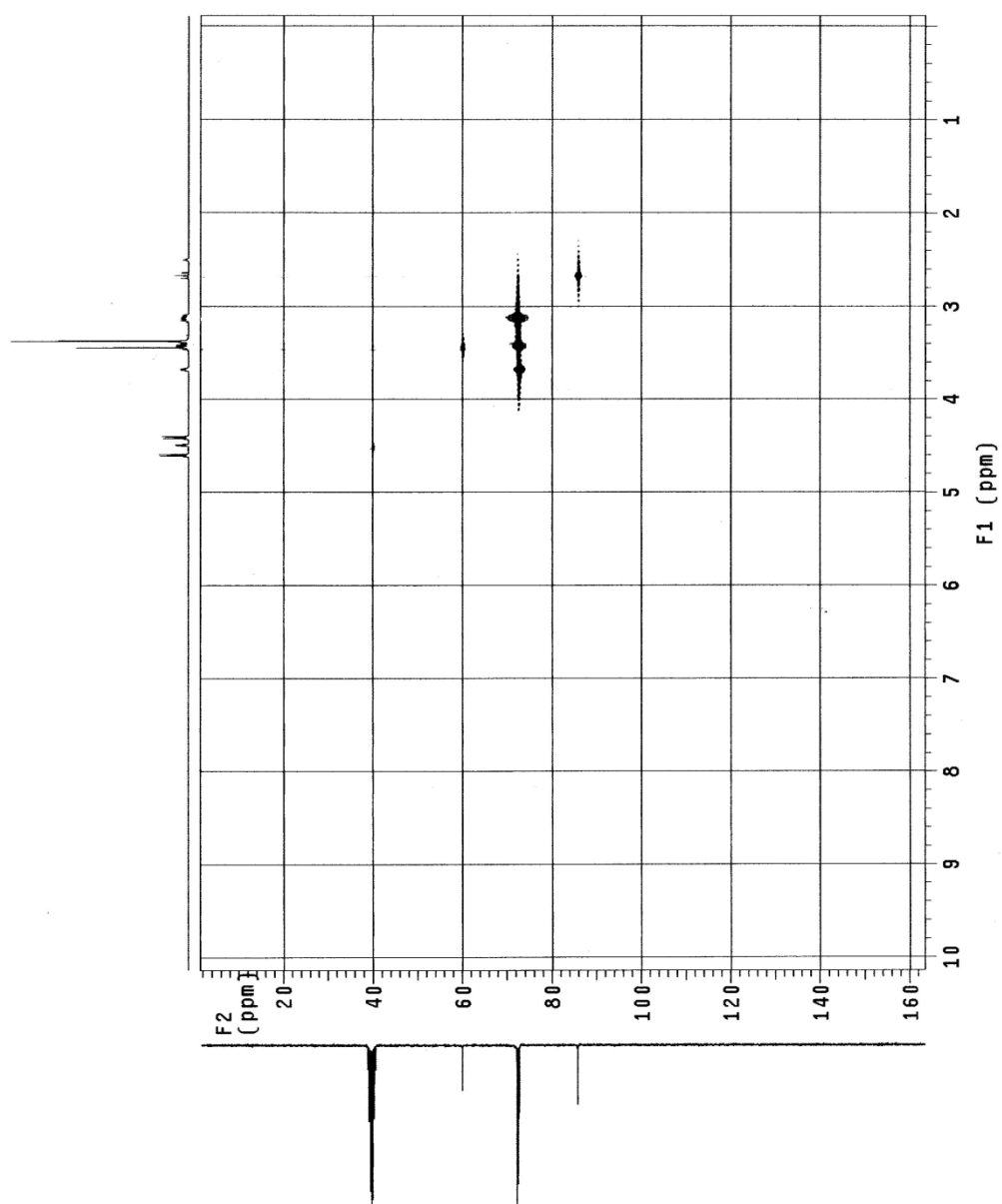


Figura 41: Expansão do espectro de HETCOR (DMSO) de **S2**.

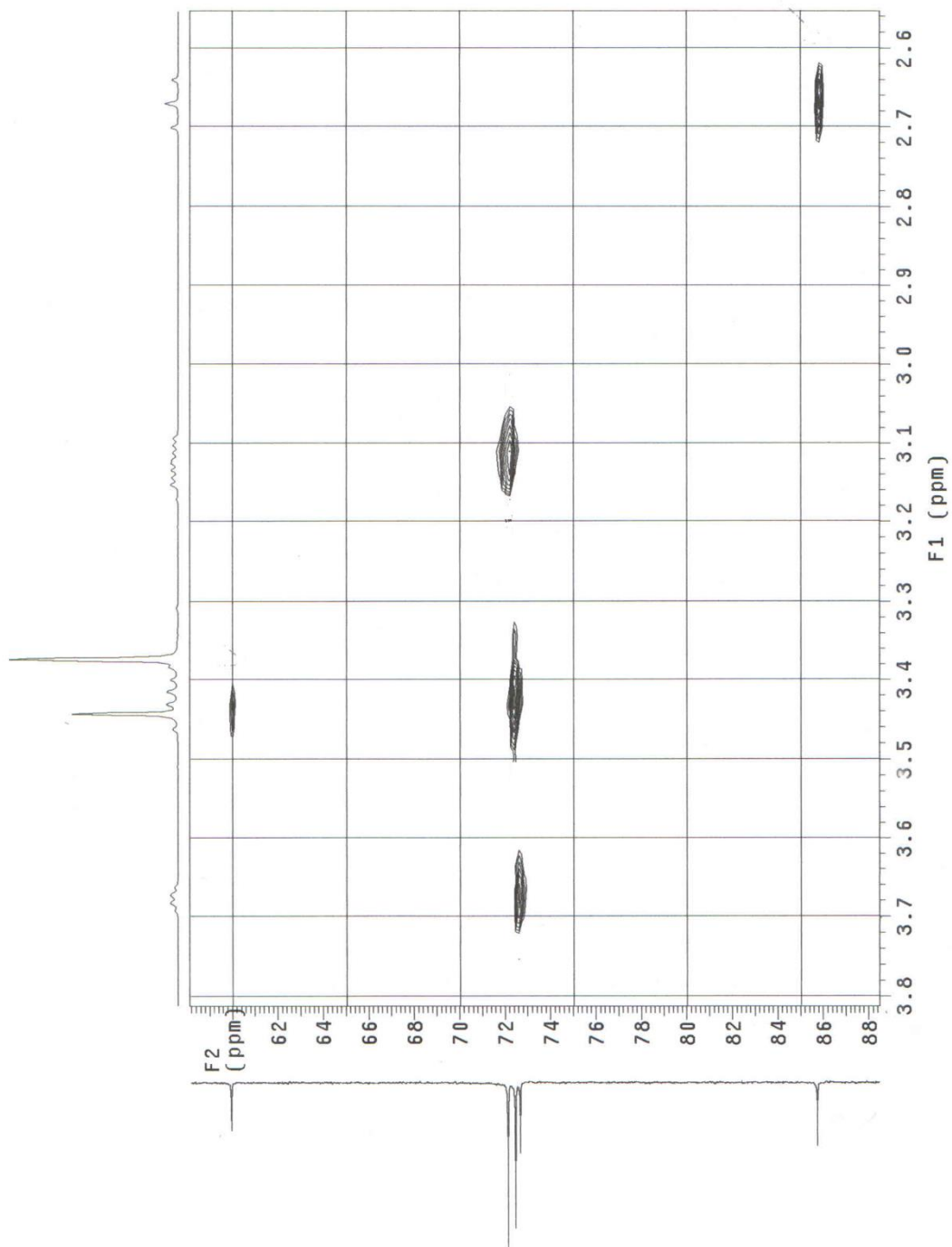
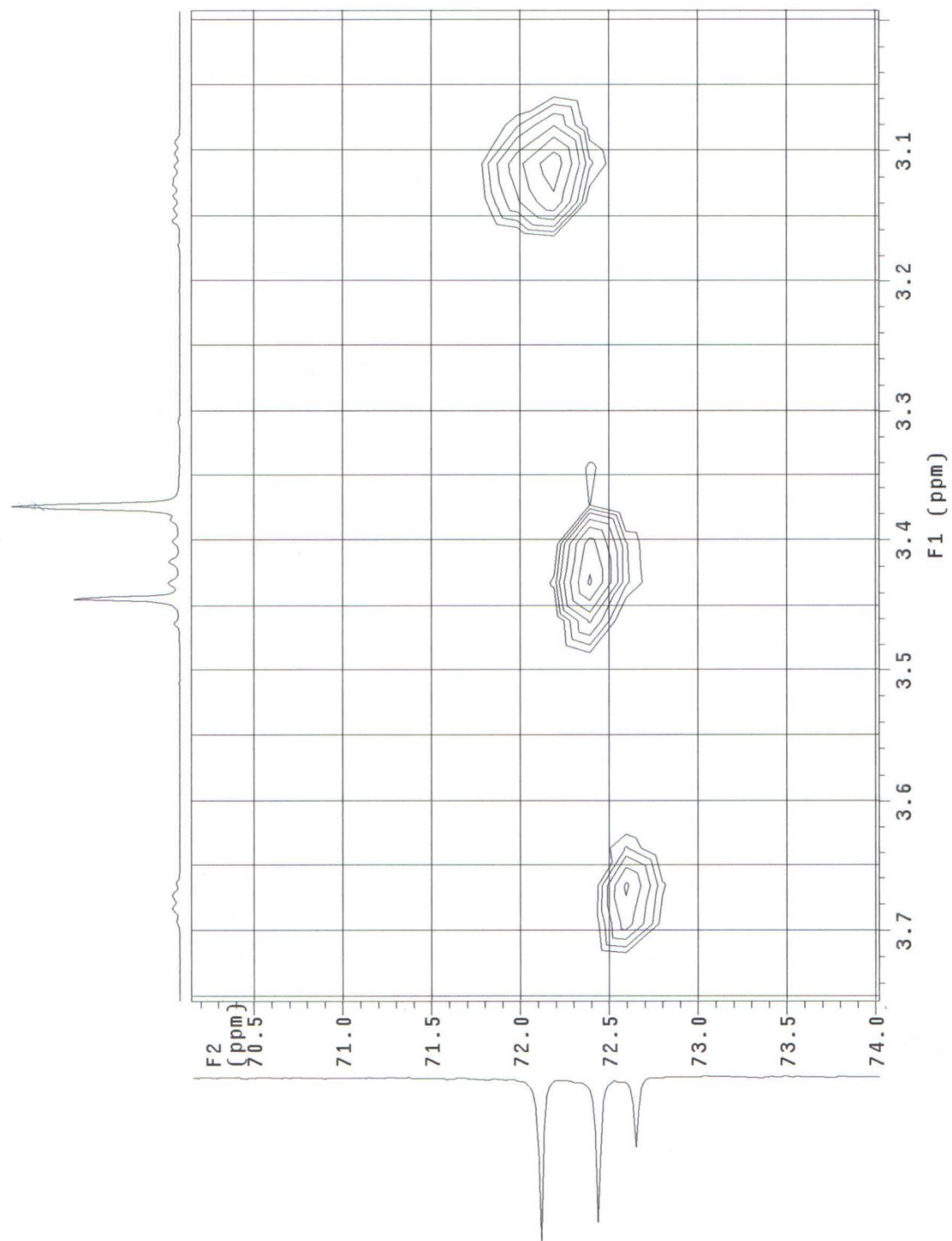


Figura 42: Expansão do espectro de HETCOR (DMSO) de S2.

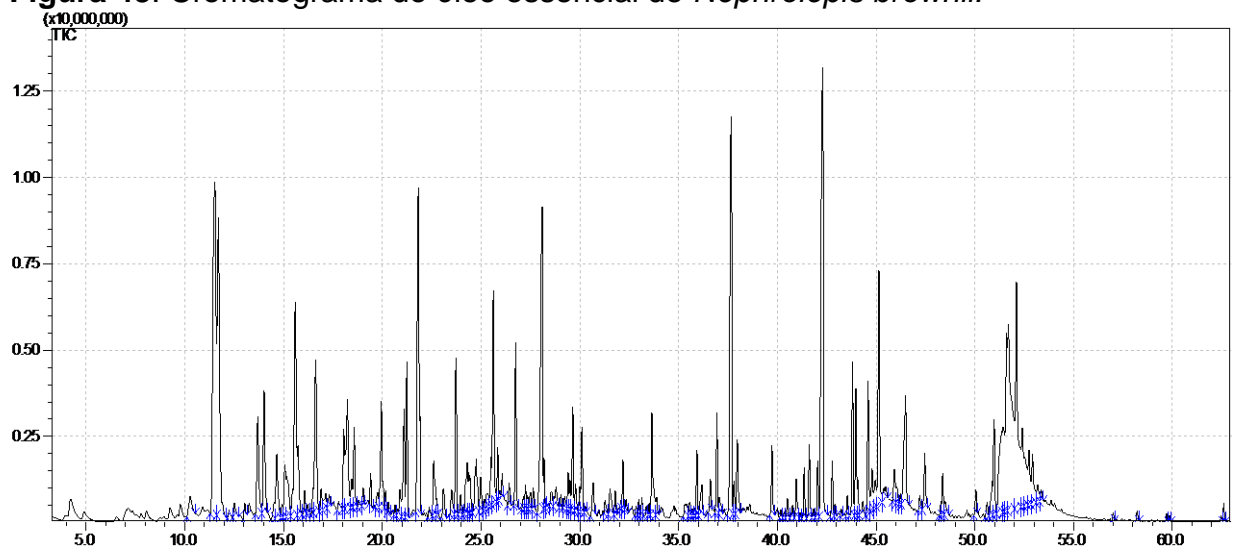


5.5 SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS DO ÓLEO ESSENCIAL OBTIDO DAS PARTES AÉREAS DE *Nephrolepis brownii*

Após a hidrodestilação obteve-se um óleo com cor alaranjada. Para a obtenção do perfil químico do óleo essencial obtido realizou-se uma análise por cromatografia gasosa acoplado à espectrometria de massa (Shimadzu-QP2010) com coluna capilar Rtx-5MS com programação de temperatura de 60°C a 240°C, gradiente de 3°C/min, temperatura do injetor 250°C, com hélio como gás de arraste, tipo de injeção *splitless* (2 µL de uma solução na proporção de 2 µL do óleo para 1 mL de n-hexano) no Laboratório Adolpho Ducke do MPEG. Com o cromatograma (Figura 43) e seus constituintes químicos do óleo essencial de *N. brownii*, juntamente com os registros da biblioteca NIST-05, comparados com os espectros de massa e índice de retenção, foi possível a identificação das substâncias presentes na Tabela 6.

A análise desses dados revelam que o número total de constituintes foi de 157, sendo que os compostos oxigenados foram dominantes, correspondendo a 86,56% do total. Eles foram identificados como sendo aldeídos (29,58%), álcoois (24,48%) e cetonas (29,76%). Os resultados revelaram que Linalol (9,57%), Nonanal (6,27%), (E)- β -Ionona (6,25%), Pentadecanal (6,40%) e Fitona (8,99%) foram predominantes em *Nephrolepis brownii*.

Figura 43: Cromatograma do óleo essencial de *Nephrolepis brownii*.



Fonte: Laboratório Adolpho Ducke.

Tabela 6: Constituintes químicos do óleo essencial de *N. brownii* por GC/EM.

TR	IR	Nome dos compostos	CONC.%
10.275	1068	(cis) óxido de Linalol	0.37
11.525	1101	Linalol	6.29
11.700	1105	Nonanal	4.12
12.225	1117	(trans)p-menta-2,8-dien-1-ol	0.08
12.500	1124	(cis)p-Menta-2-en-1-ol	0.18
13.042	1136	Non-3-en-2-ona	0.13
13.692	1151	Nona-(2E,6Z)-dienal	1.11
14.017	1159	Non-(2E)-enal	1.32
14.500	1170	p-metil-Acetofenona	0.2
14.658	1173	p-etil-Benzaldeído	0.79
14.908	1179	Terpinen-4-ol	0.14
15.058	1182	Naftaleno	0.56
15.175	1185	Dill éter	0.63
15.600	1195	α -Terpineol	2.79
15.733	1198	Safranal	0.69
16.075	1206	Decanal	0.2
16.217	1209	(trans)Pulegol	0.08
16.483	1215	Nona-(2E,4E)-dienal	0.17
16.625	1218	β -Ciclocitral	1.86
16.900	1224	Nerol	0.21
18.050	1249	Geraniol	0.7
18.233	1253	β -Ciclohomicitral	1.51
18.583	1261	Dec-(2E)-enal	0,67
18.792	1266	Geranial	0,05
19.408	1279	Z-2-(3,3-dimetilciclohexilidene)-Etanol	0,23
19.775	1288	Safrol	0,17
19.950	1292	Undecan-2-ona	1,06
20.167	1296	Teaspirano	0,12
20.308	1299	n-Tridecano	0,07
20.642	1307	n-Undecanal	0,07
20.900	1313	o-metil-Orcinol	0,32
21.108	1317	Deca-(2E,4E)-dienal	1,09
23.733	1376	(E)- β -Damasconona	1.21
23.967	1381	(Z)- β -Damascona	0.15
24.758	1399	n-Tetradecano	0.77
24.983	1404	(E)- β -Damascona	0.32
25.625	1419	(E)- α -Ionona	2.33
25.842	1424	Floridral	0.37
26.075	1430	β -Diidroionona	0.23
26.758	1446	Neril acetona	1.24
27.642	1466	dehidro-Aromadendrano	0.15
28.100	1477	(E)- β -Ionona	4.11
28.192	1479	6-Metil-6-(5-metil-furan-2-il)-hept-3-en-2-ona	0.29
29.050	1499	n-Pentadecano	0.11
29.783	1517	α -Bulneseno	0.24
31.283	1554	2-metil-4-(2,6,6-trimetil-2-ciclohexen-1-il)-But-2-enal	0.12

31.533	1560	(E)Nerolidol	0.33
32.183	1576	2-metil-4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-But-2-enal	0.33
32.983	1595	Óxido de Cariofilleno	0.11
33.142	1599	n-Hexadecano	0.12
33.375	1605	Viridiflorol	0.07
33.650	1612	Tetradecanal	1.04
35.408	1657	Pogostol	0.22
35.567	1661	14-hidroxi-9-epi-(E)-Cariofileno	0.14
36.175	1677	n-Tetradecanol	0.38
36.942	1696	Tridecil-metil-cetona	0.72
37.067	1699	Heptadecano	0.18
37.667	1715	Pentadecanal	4.21
37.808	1719	14-hidroxi-4,5-diidro-Cariofileno	0.25
39.725	1771	Ciclocolorenona	0.56
40.183	1783	Acetate de Tetradec-(7Z)-en-1-ol	0.06
40.358	1788	n-Pentadecanol	0.20
40.775	1799	n-Octadecano	0.12
41.367	1816	1-Octadecino	0.34
41.625	1823	Pentadecanolide	0.58
41.825	1828	Acetato de Farnesil	0.07
42.300	1842	Fitona	5.91
44.592	1907	5E,9E-Farnesil acetona	1.1
45.142	1923	Ciclohexadecano	2.62
45.925	1946	Isofitol	0.33
46.492	1963	Ácido n-Hexadecanóico	1.45
47.217	1984	9-hexadecenoato de etila	0.12
47.467	1992	Ácido etil éster Hexadecanóico	0.51
48.283	2017	(Z)13-Octadecenal	0.09
48.525	2024	(E,E)Geranil-linalol	0.16
50.617	2089	Ácido (Z,Z)9,12-Octadecadienóico metil éster	0.12
51.375	2113	1-Octadecanetiol	1.66
51.617	2120	Fitol	1.83
57.008	2299	n-Tricosano	0.06
59.867	2399	n-Tetracosano	0.05
62.458	2494	9-(3-ciclopentilpropil)-Heptadecano	0.04
62.608	2499	n-Pentacosano	0.12

5.6 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO FUNGO ENDOFÍTICO

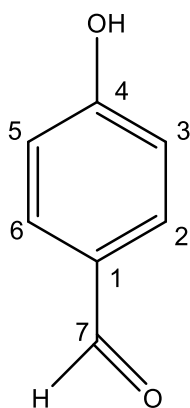
5.6.1 Substâncias isoladas de extratos obtidos do cultivo do fungo endofítico NB-1 em meio sólido (arroz)

5.6.1.1 Identificação do p-hidróxibenzaldeído (**S3**)

A fração acetato de etila 100% proveniente do extrato fúngico acetato de etila, obtido do cultivo em meio sólido (arroz) foi submetida a uma coluna de sílica gel fornecendo a fração Hexano/Acetato de etila 50%, sendo identificada a substância o p-Hidróxibenzaldeído (**S3**) (**Figura 44**), em mistura com outras substâncias.

No espectro de RMN de ^1H de **S3** (**Figura 45**) foi observada a presença de um singleto em $\delta_{\text{H}}=9,84$ (H-7), característico da função aldeído. Também observou-se sinais de hidrogênio aromáticos orto-dissubstituídos: $\delta_{\text{H}}=7,78$ (H-2 e H-6) e $\delta_{\text{H}}=6,95$ (H-3 e H-5), dois dubletos integrados para dois hidrogênios cada, com constantes de acoplamento característicos de hidrogênios acoplado em relação *orto* ($J=8,4$ Hz).

No espectro de RMN de ^{13}C de **S3** (**Figura 46**) foram visualizados quatro sinais de carbonos aromáticos com os seguintes deslocamentos: $\delta_{\text{C}}=132,3$ dos carbonos metínicos C-2 e C-6; $\delta_{\text{C}}=161,9$ referente ao carbono C-4, não hidrogenado; $\delta_{\text{C}}=115,9$ referente aos carbonos metínicos C-3 e C-5; $\delta_{\text{C}}=129,6$ referente ao carbono não hidrogenado C-1; e um sinal em $\delta_{\text{C}}=190,9$ característico de carbonila de aldeído conjugada com o anel aromático, tornando-se protegida quanto ao seu sinal de RMN ^{13}C . Os valores foram comparados com dados da literatura (GUBIANI, 2011) (**Tabela 7**), onde confirmou-se a estrutura proposta para o p-hidroxibenzaldeído.

Figura 44: Estrutura química do *p*-hidróxibenzaldeído (**S3**)**S3****Tabela 7:** Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) juntamente com dados da literatura (GUBIANI, 2011) de **S3**.

Posição	H	C	H ^{lit}	C ^{lit}
1		129,6		130,1
2	7,78(<i>d</i> ;8,4 Hz)	132,3	7,73 (<i>d</i> ;8,5Hz)	132,1
3	6,95(<i>d</i> ;8,4Hz)	115,9	6,87(<i>d</i> ;8,5Hz)	116,1
4		161,9		160,1
5	6,95(<i>d</i> ;8,4 Hz)	115,9	6,87(<i>d</i> ;8,5Hz)	116,1
6	7,78(<i>d</i> ;8,4 Hz)	132,3	7,73 (<i>d</i> ;8,5Hz)	132,1
7	9,84 (s)	190,9	9,80 (s)	190,1

Figura 45: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S3**.

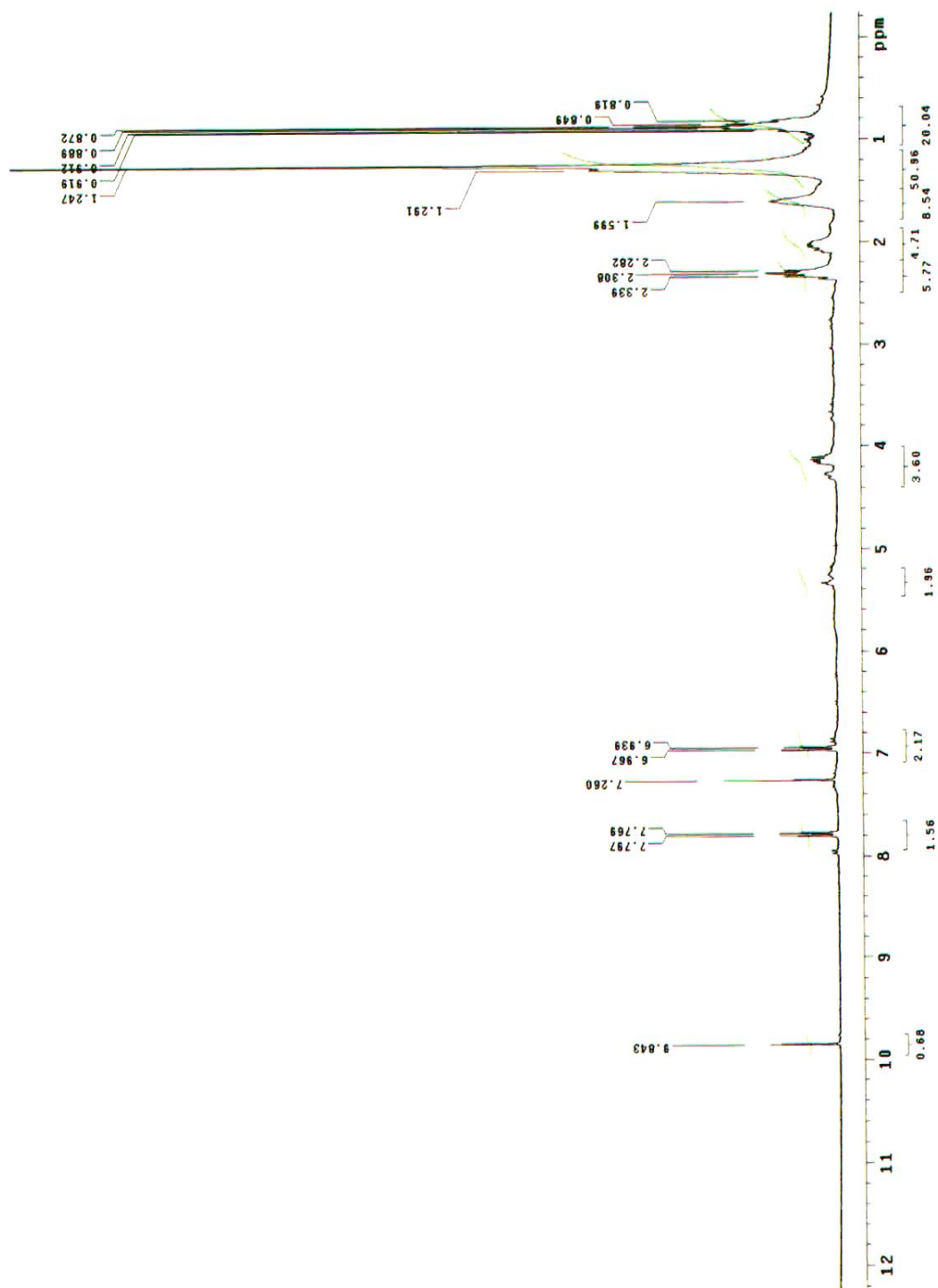
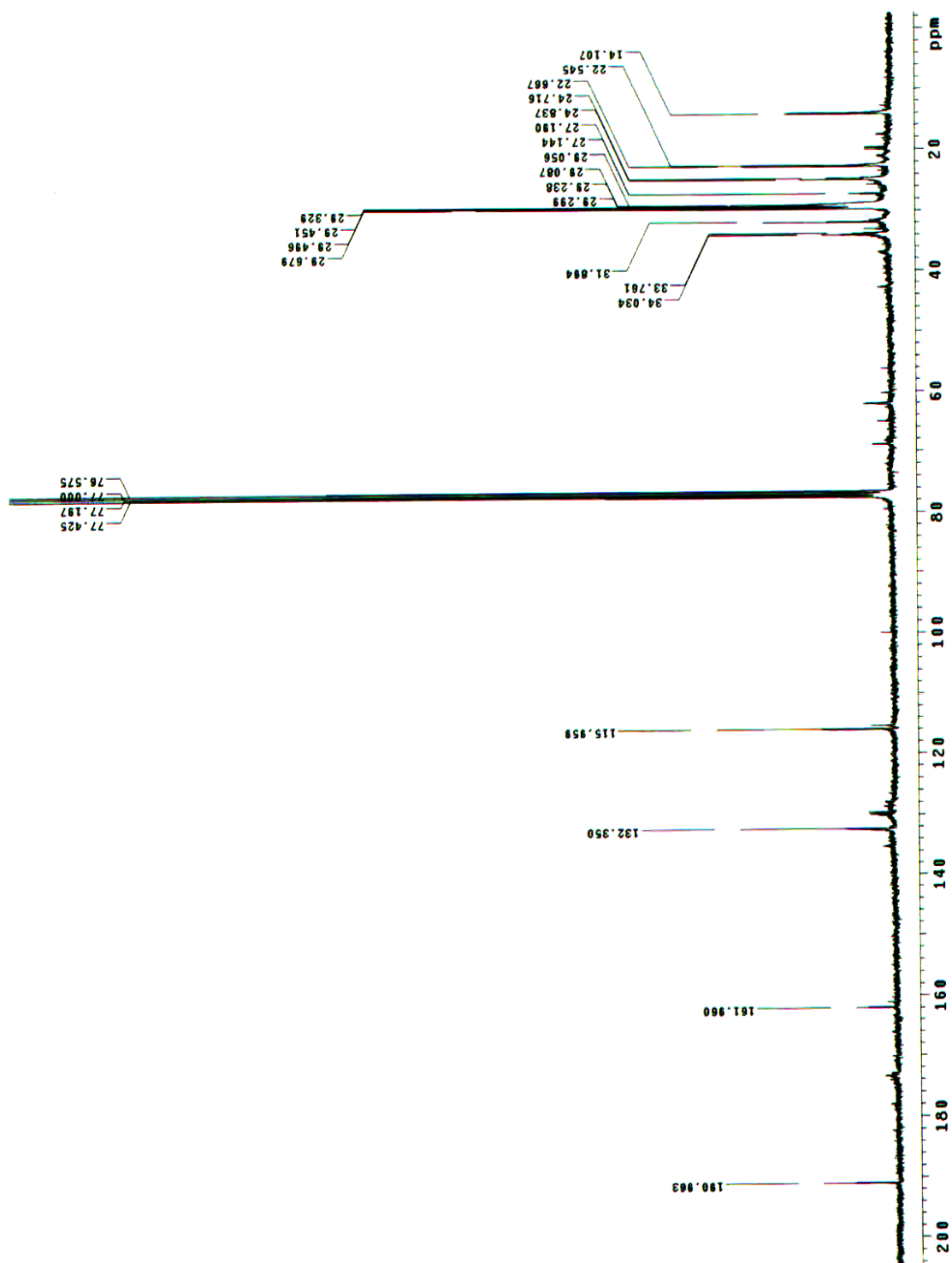


Figura 46: Espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de S3



5.6.1.2 Identificação do ácido p-hidroxifenilacético (**S4**)

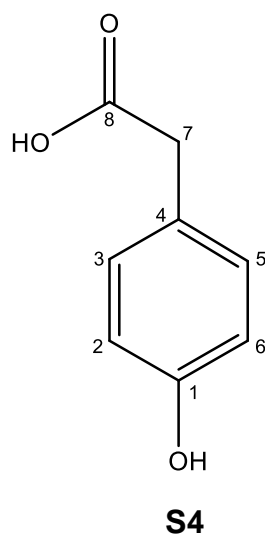
O ácido p-hidroxifenilacético (**S4**) (**Figura 47**) foi isolado a partir da fração AcOEt 100% do extrato fúngico acetato de etila, o qual apresenta cor amarelada e um odor forte.

No espectro RMN de ^1H de **S1** (**Figura 48**) foi observada a presença de dois dupletos em $\delta_{\text{H}}=6,79$ ($J=8,7$) e $\delta_{\text{H}}=7,16$ ($J=8,4$) referentes a H2/H6 e H3/H5 respectivamente, característico de anel aromático para dissubstituído. Observa-se também um simpleto em $\delta_{\text{H}}=3,59$ referente aos hidrogênios H7.

No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 49**) juntamente com o de HETCOR (**Figura 52**) estão presentes 6 sinais de carbono, dos quais 4 são de carbonos aromáticos, em $\delta_{\text{C}}=154,88$; 130,59; 125,47; e 115,52 referentes aos carbonos C1, C3/C5, C4 e C2/C6. No espectro de DEPT (**Figura 50**) confirma-se que C1 e C4 não são hidrogenados e que C2, C3, C5 e C6 são metínicos, além do sinal em $\delta_{\text{C}}=39,91$ de um carbono metilênico vizinho de uma carbonila de ácido carboxílico, referente a C7.

O espectro de COSY (**Figura 51**) apresenta correlações entre H2/H6 e H3/H5, evidenciando que o anel aromático é *para*-dissubstituído.

No espectro de HMBC (**Figura 53**) observa-se correlações entre H7-C8 (J^3), confirmando o grupo ácido nessa posição, H7-C3/C5 (J^3), H7-C2/C6 (J^4); H3/H5-C1 (J^3), H3/H5-C7 (J^3); e entre H2/H6-C4 (J^3). Os dados espectrométricos de **S4** estão de acordo com os dados da literatura (ANDRIOLI, 2008) da substância ácido *p*-hidroxifenilacético (**Tabela 8**).

Figura 47: Estrutura química do ácido p-hidroxifenilacético (**S4**)**Tabela 8:** Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S4** juntamente com dados da literatura (ANDRIOLI, 2008).

Posição	δH	δC	$\delta\text{H}^{\text{Lit.}}$	$\delta\text{C}^{\text{Lit.}}$
1		154,88		157,5
2	6,79 (<i>d</i> , $J=8,7$ Hz)	115,52	6,72 (<i>d</i> , $J=8,6$ Hz)	116,3
3	7,16 (<i>d</i> , $J=8,4$ Hz)	130,59	7,08 (<i>d</i> , $J=8,6$ Hz)	131,4
4		125,47		126,9
5	7,16 (<i>d</i> , $J=8,7$ Hz)	130,59	7,08 (<i>d</i> , $J=8,6$ Hz)	131,4
6	6,79 (<i>d</i> , $J=8,7$ Hz)	115,52	6,72 (<i>d</i> , $J=8,6$ Hz)	116,3
7	3,59 (<i>s</i>)	39,90	3,45 (<i>s</i>)	41,2
8		176,36		177,3

Figura 48: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S4**

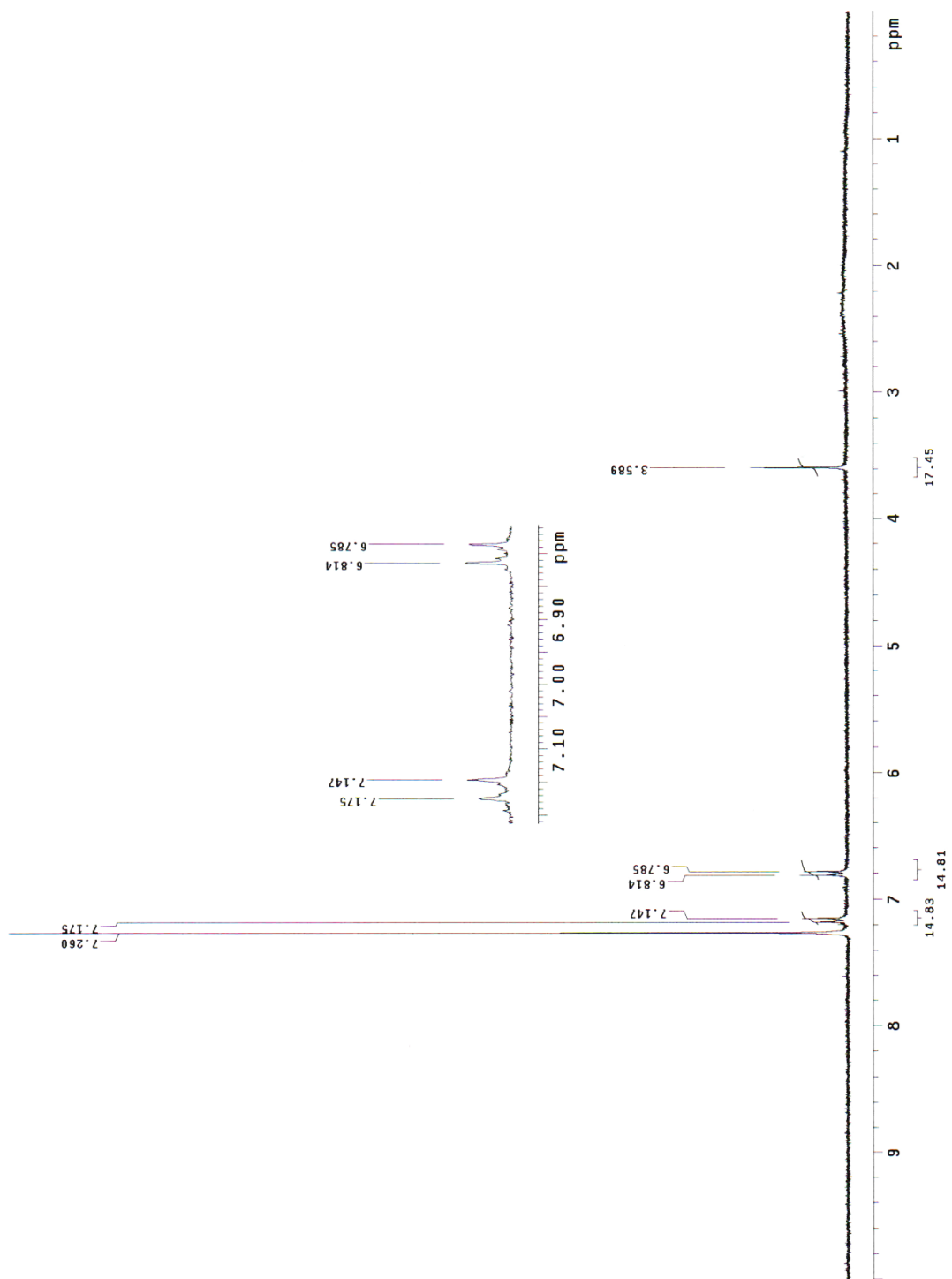


Figura 49: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S4**

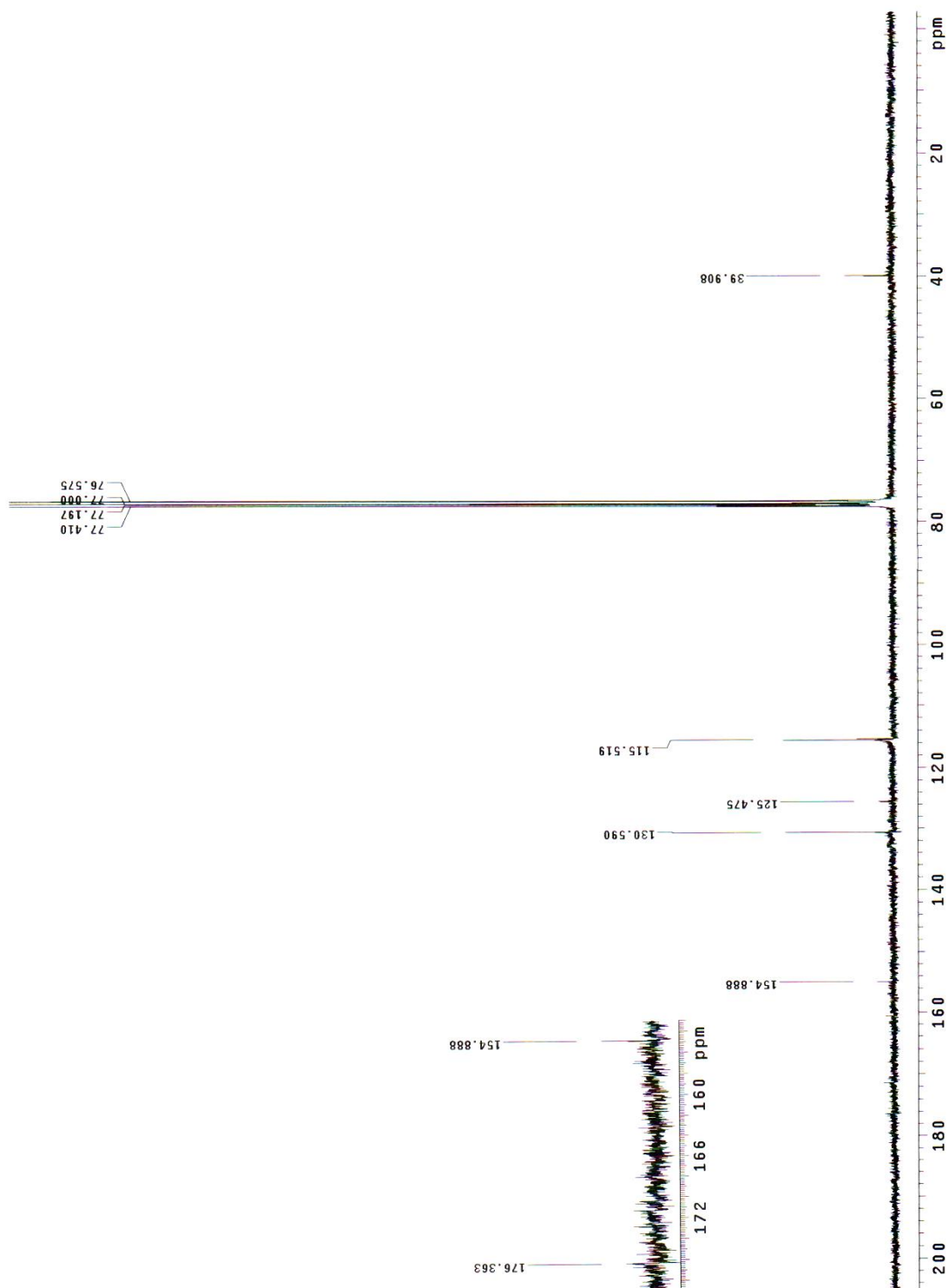


Figura 50: Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3) de **S4**

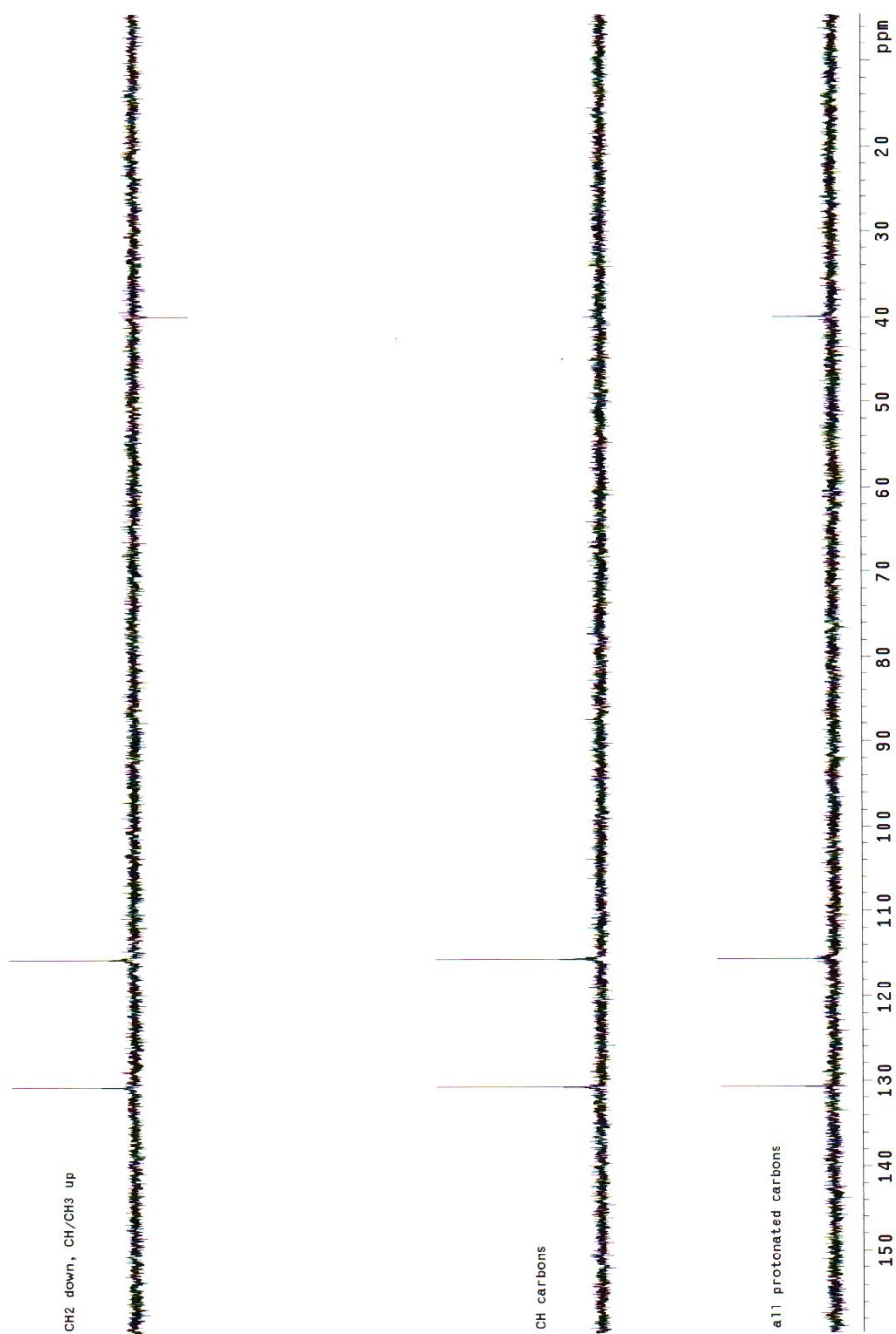


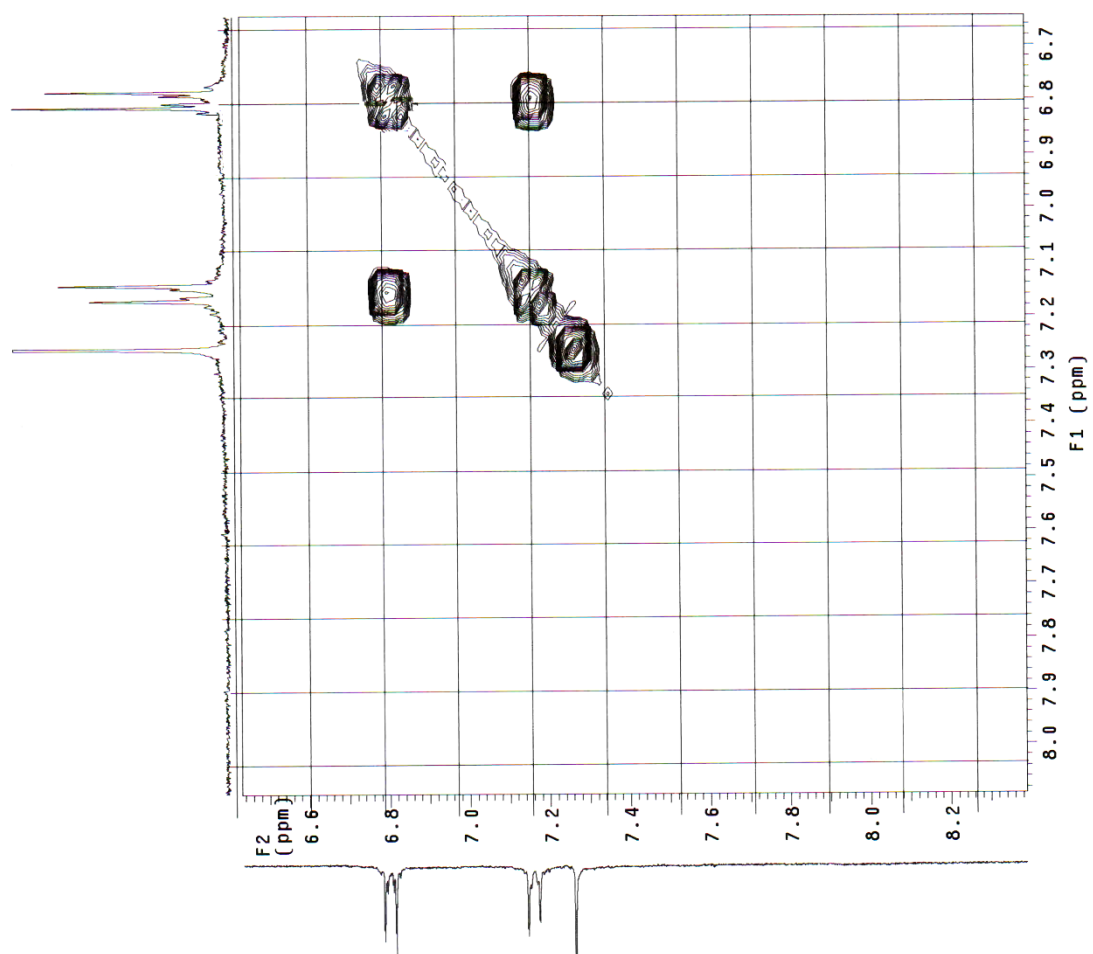
Figura 51: Espectro de COSY (300 MHz, CDCl₃) de **S4**

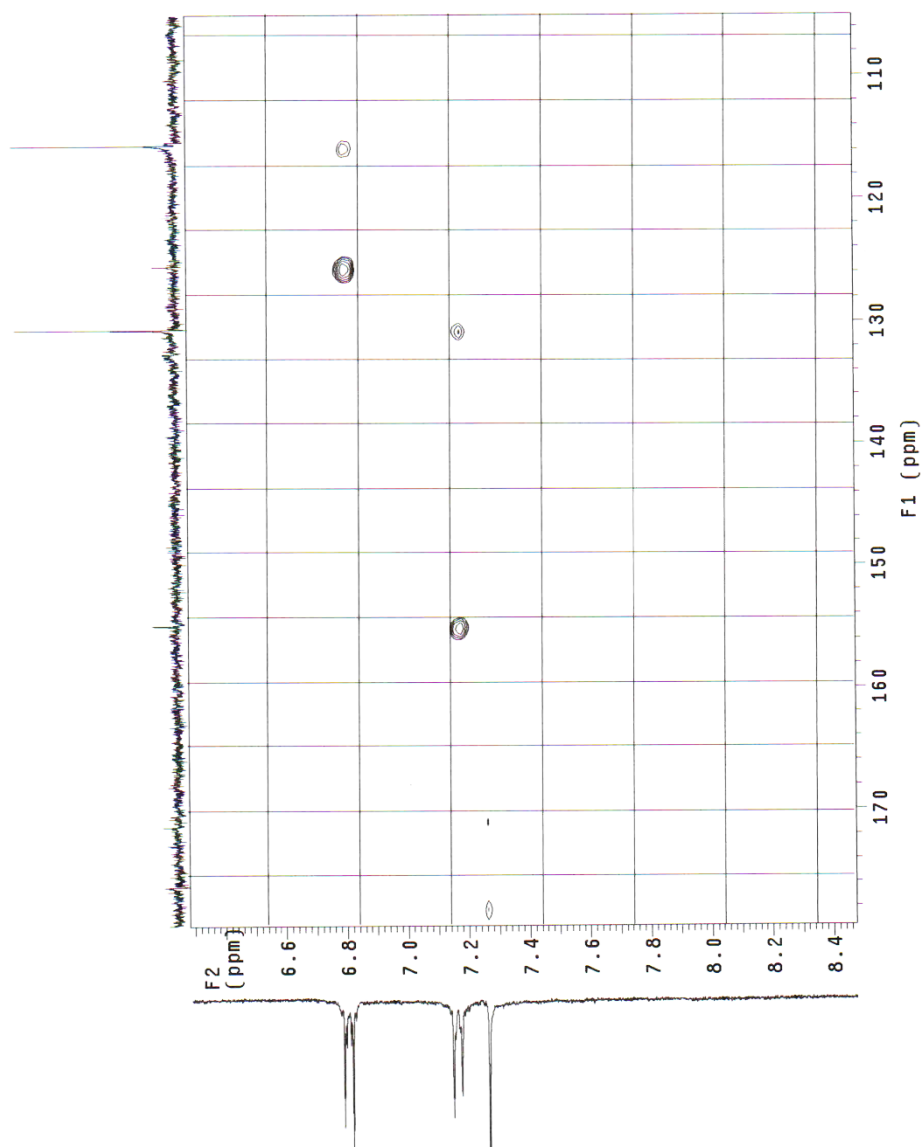
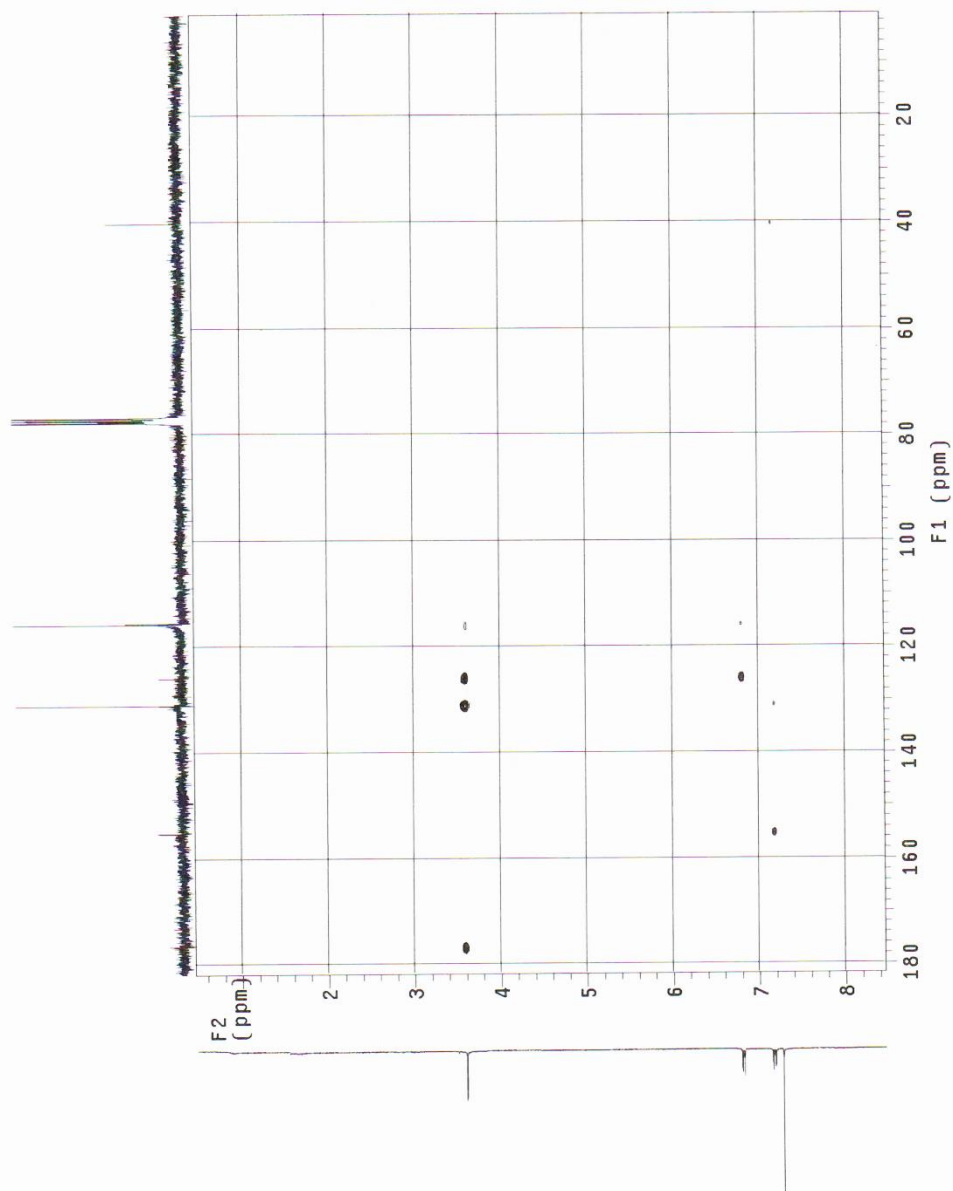
Figura 52: Espectro de HETCOR (CDCl₃) de S4

Figura 53: Espectro de HMBC (CDCl_3) de **S4**

5.6.1.3 Identificação do ácido 4-hidroxibenzoico (**S5**)

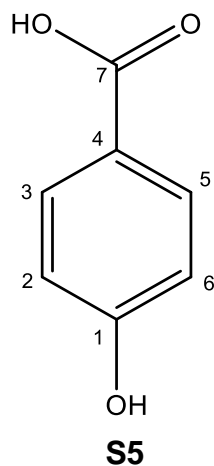
O ácido 4-hidroxibenzoico (**S5**) também foi isolado a partir da fração AcOEt 100% do extrato fúngico acetato de etila, a qual foi submetida a cromatografia em coluna sephadex LH-20.

Estudos realizados com o ácido 4-hidroxibenzoico mostraram que apresenta efeito hipoglicêmico, retardando a absorção de glicose no organismo (PEUNGVICHA et al., 1998); efeito antibacteriano, especialmente na infecção gastrointestinal (LABAUNE et al., 1986).

No espectro de RMN de ^1H de **S5** observou-se a presença de dois dupletos em $\delta\text{H}=7,98$ ($J=8,7$) e $\delta\text{H}=6,87$ ($J=8,7$) referentes aos hidrogênios H3/H5 e H2/H6 respectivamente, característico de anel paradissubstituído.

No espectro de RMN de ^{13}C de **S5** (**Figura 56**) estão presentes 5 sinais de carbonos, dos quais 4 são de carbonos aromáticos, em $\delta_{\text{C}}=160,6$; 132,6; 125,4; e 115,3 referentes aos carbonos C1, C3/C5, C4 e C2/C6. No espectro de DEPT (**Figura 57**) confirma-se que C1 e C4 não são hidrogenados e que C2, C3, C5 e C6 são metínicos.

O espectro de COSY (**Figura 58**) apresenta correlações entre H2/H6 e H3/H5, evidenciando que o anel aromático é *para*-dissubstituído. Os dados de RMN de **S5** juntamente com os dados da literatura (CHO et. al. 2014), estão apresentados na **Tabela 9**.

Figura 54: Estrutura química do ácido *p*-hidroxibenzóico (**S5**)**Tabela 9:** Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S5** juntamente com dados da literatura (CHO et. al. 2014).

Posição	H	C	H ^{Lit.}	C ^{Lit.}
1		160,6		159,9
2	6,86(<i>d</i> , <i>J</i> =8,5 Hz)	115,3	6,71(<i>d</i> , <i>J</i> =7,95 Hz)	114,4
3	7,98(<i>d</i> , <i>J</i> =9 Hz)	132,6	7,73 (<i>d</i> , <i>J</i> =7,95 Hz)	131,1
4		125,4		127,5
5	7,98(<i>d</i> , <i>J</i> =9 Hz)	132,6	7,73 (<i>d</i> , <i>J</i> =7,95 Hz)	131,1
6	6,86(<i>d</i> , <i>J</i> =8,5 Hz)	115,3	6,71(<i>d</i> , <i>J</i> =7,95 Hz)	114,4
7		168,2		169,4

Figura 55: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S5**.

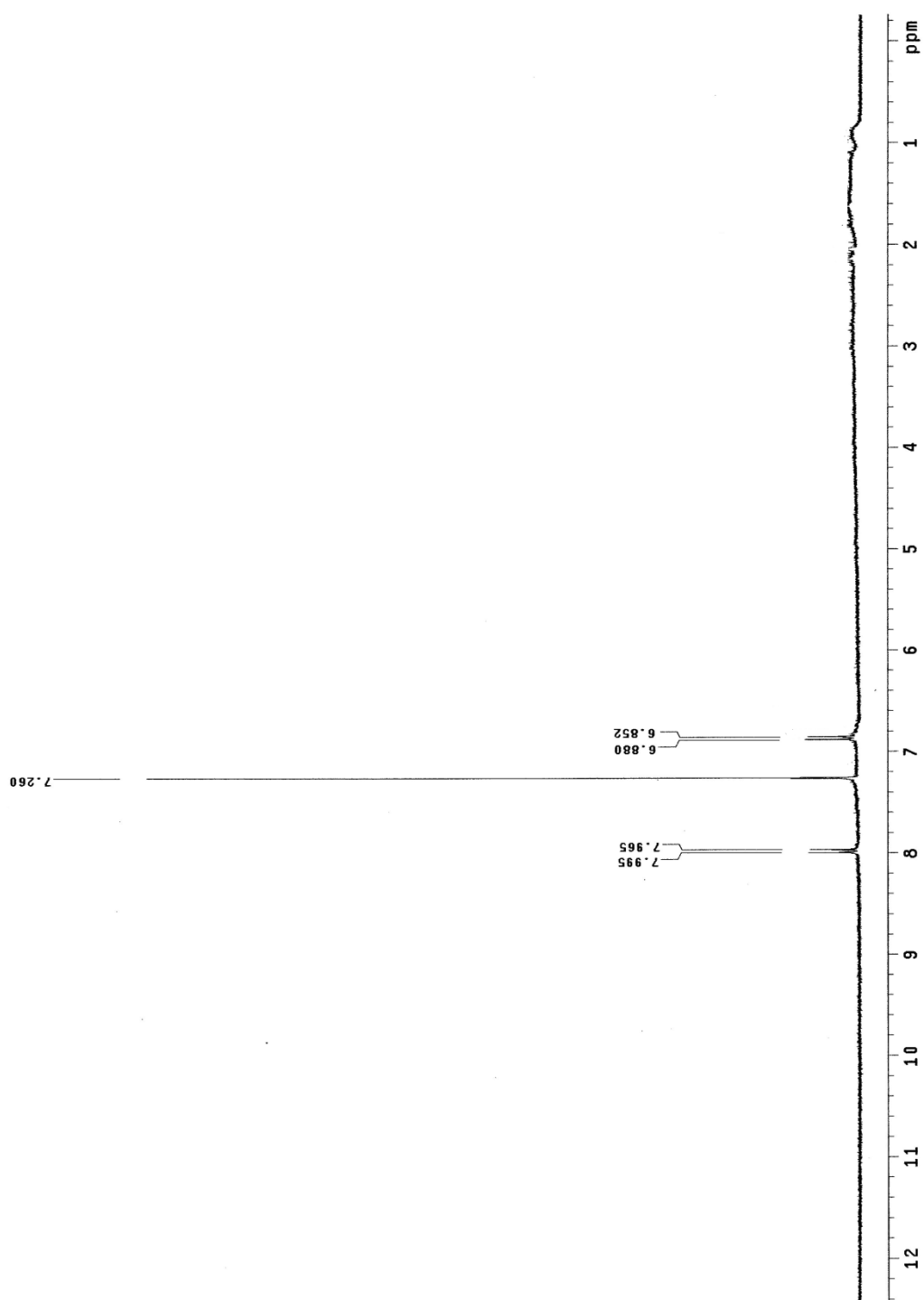


Figura 56: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S5**.

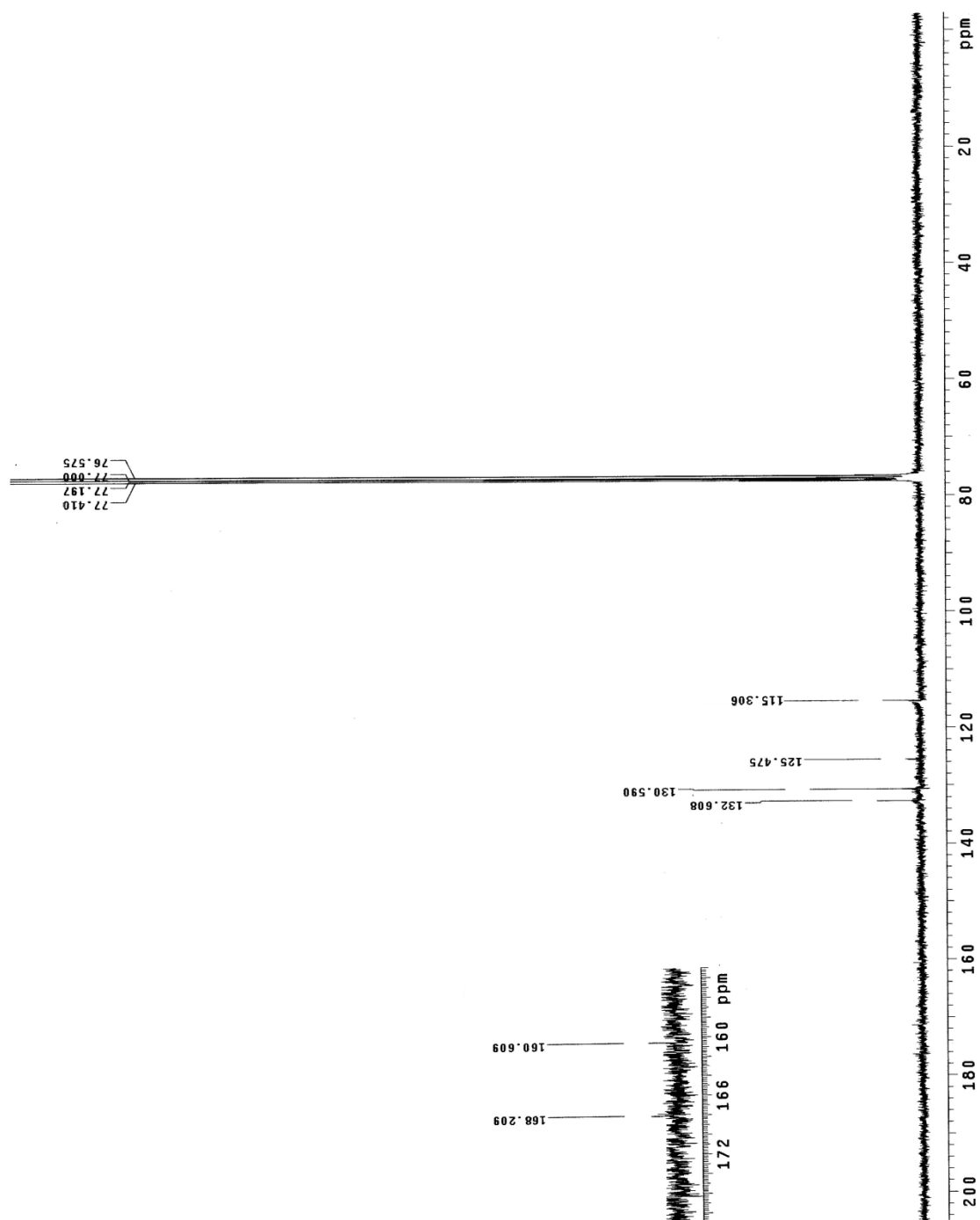


Figura 57: Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3) de S5.

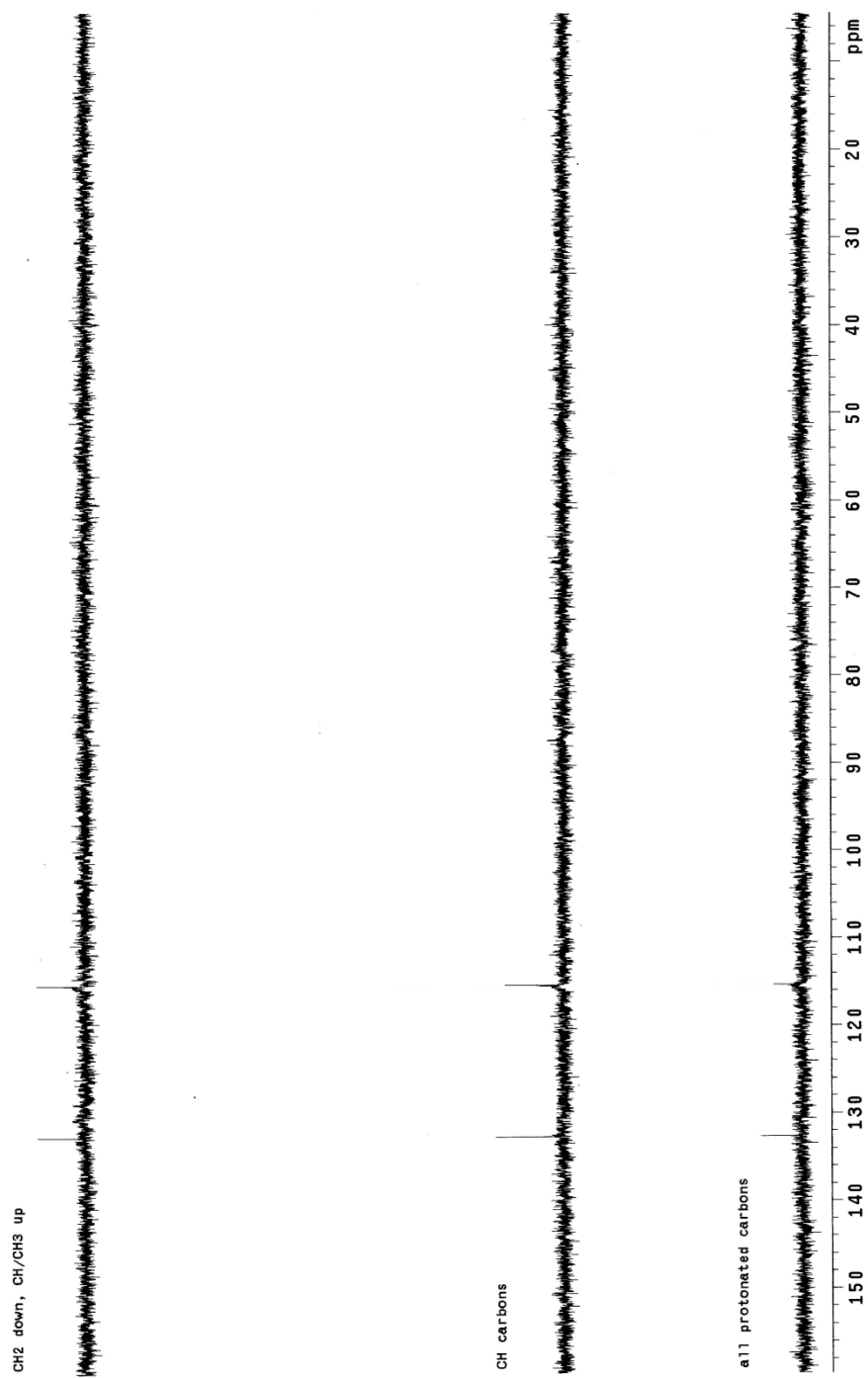
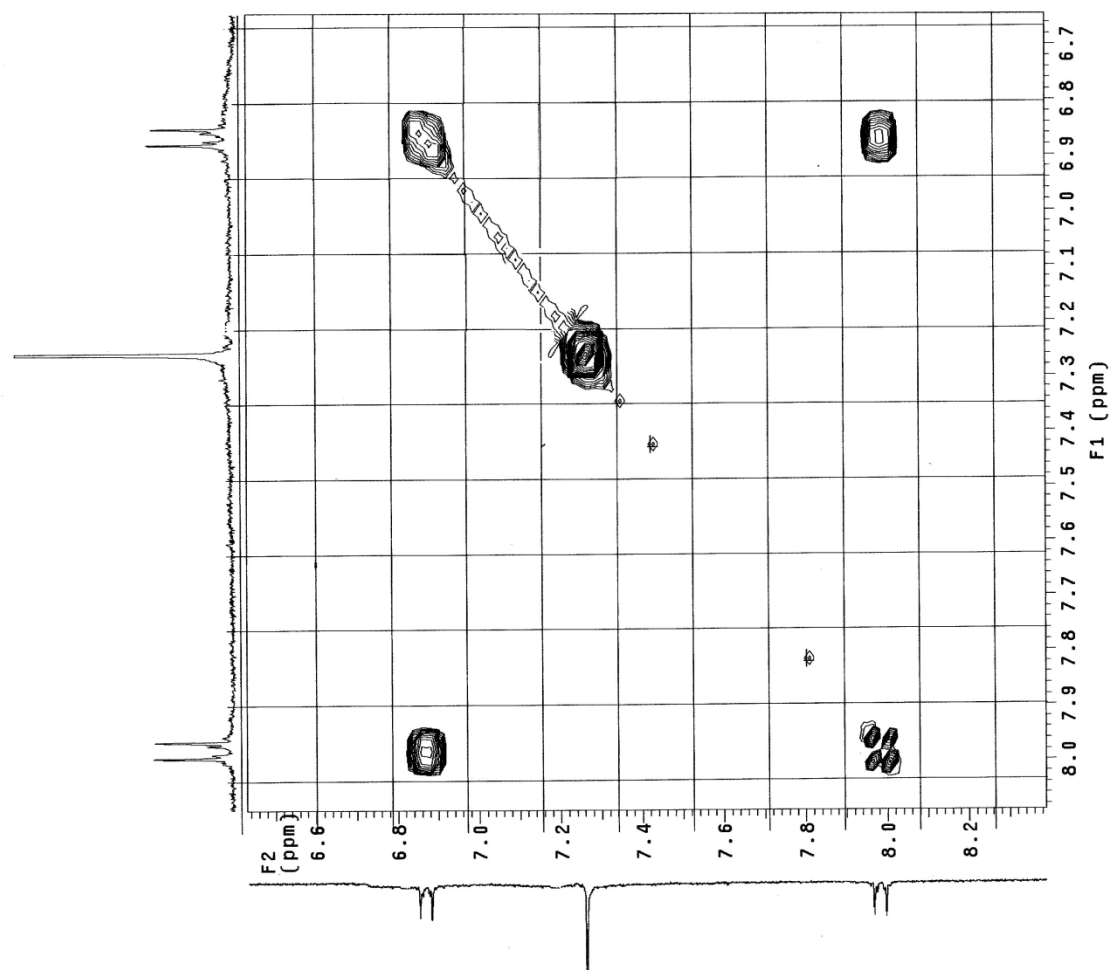


Figura 58: Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de **S5**.



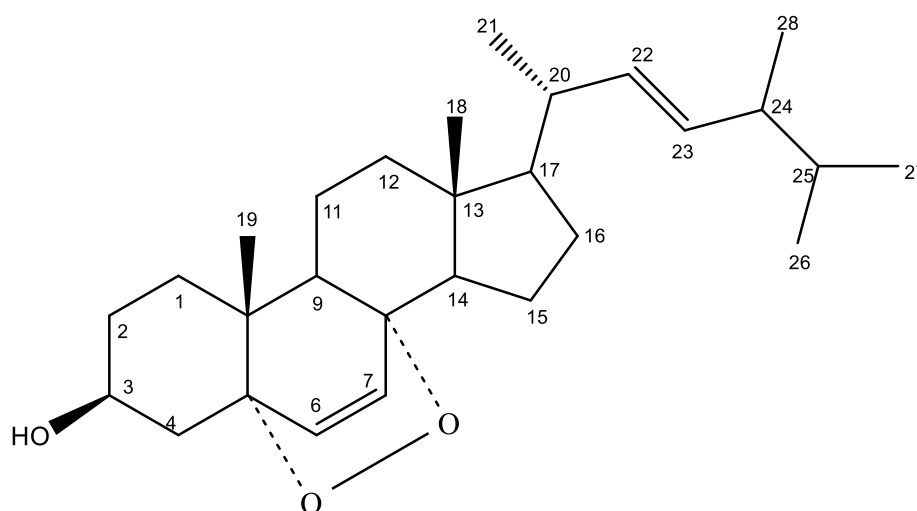
5.6.2 Substâncias isoladas de extratos obtidos do cultivo do fungo endofítico em meio líquido (Czapeck)

5.6.2.1 Identificação do peróxido de ergosterol (S6)

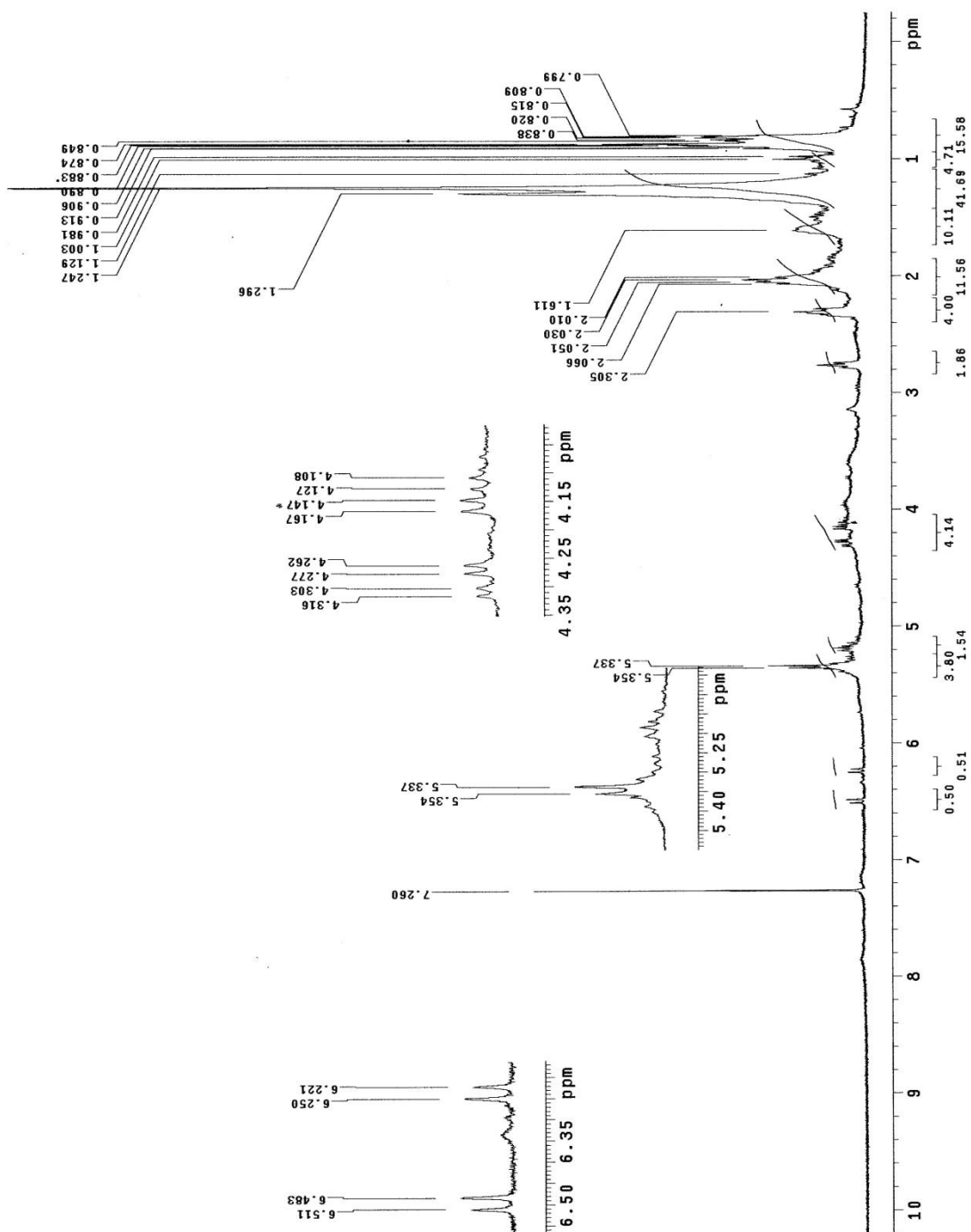
A substância **S6 (Figura 59)** pertence à classe dos esteroides e foi isolada a partir da fração hexano 100% do extrato **EFLAcOEt-1**. Por ser uma substância bastante comum nos fungos, fazendo parte da sua estrutura celular, foi possível sua identificação mesmo em mistura, através de técnica de RMN de ^1H e comparação com dados da literatura (MARINHO; MARINHO, RODRIGUES FILHO, 2007).

No espectro de RMN ^1H (**Figura 60**) observa-se a presença de um quinteto em δ_{H} 3,54 referente ao hidrogênio oximetínico H-3 e de um multipletto em δ_{H} 5,18 referente aos sinais dos hidrogênios olefinicos H-22 e H-23. Em δ_{H} 6,23 e δ_{H} 6,49 a presença de dois dupletos ($J= 8,4$ Hz) são referentes aos sinais dos hidrogênios H-6 e H-7, respectivamente.

Figura 59: Estrutura química do peróxido de ergosterol (**S6**)



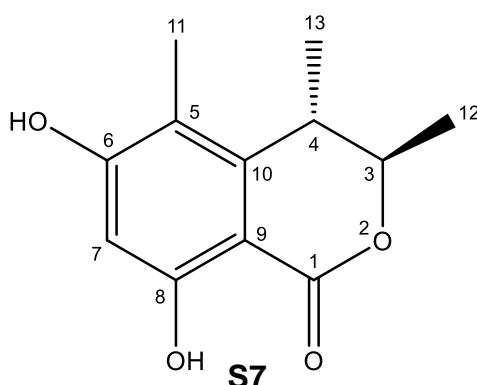
S6

Figura 60: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de S6.

5.6.2.2 Identificação do stoloniferol B (**S7**)

A substância **S7** (**Figura 61**) conhecida como stoloniferol B foi obtida a partir da fração Hex/AcOEt 20% do **EFLAcOEt-2**. No espectro de RMN de ^1H (**Figura 62**) observa-se um simpleto referente à hidroxila da posição 8, característica de hidroxila quelada à carbonila; um simpleto em δ_{H} 6,3 referente ao hidrogênio aromático H-7; um quarteto em δ_{H} 4,69 que corresponde ao hidrogênio H-3, característico de carbono metínico vizinho à oxigênio; um quarteto em δ_{H} 2,98 que corresponde ao hidrogênio H-4; um simpleto em δ_{H} 2,1 referente H-11, integrando para 3 hidrogênios, sinal característico de metila ligada a anel aromático; e dois dupletos em δ_{H} 1,33 ($J=6,9$ Hz) e δ_{H} 1,30 ($J=7,2$ Hz), integrando para 6 hidrogênios, que corresponde aos hidrogênios metílicos H-12 e H-13, respectivamente.

Figura 61: Estrutura química do stoloniferol B (**S7**)



No espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 64**) observa-se um sinal em δ_{C} 168,6 referente a C-1, característico de carbonila de éster; dois sinais bem desprotegidos em δ_{C} 160,9 e δ_{C} 162,3, característicos de carbonos aromáticos ligados a oxigênio, referentes a C-6 e C-8, respectivamente; um sinal em δ_{C} 79,97 referente a C-3, característico de carbono metínico ligado a oxigênio; em δ_{C} 9,84 sinal característico de metila ligada a anel aromático, referente à C-11. As posições dos carbonos e a multiplicidade dos sinais de hidrogênio são confirmadas pelo HETCOR (**Figura 68**).

O DEPT de **S7** (**Figura 65**) confirma a presença de 6 carbonos totalmente substituídos, 3 carbonos metínicos e 3 carbonos metílicos.

O espectro de COSY de **S7** (**Figura 66**) apresenta correlações entre o hidrogênio metínico em δ_{H} 4,69 (H-3) e em δ_{H} 1,32 (H-12), assim como observa-se

correlações entre os sinais em δ_H 2,98 (H-4) e em δ_H 1,32 (H-13); e entre os sinais δ_H 4,69 (H-3) e δ_H 2,98 (H-4).

O espectro de HMBC de **S7** (Figura 69) apresenta as seguintes correlações: o sinal em δ_H 4,69 (H-3) correlaciona-se com os sinais em δ_C 168,54 (C-1) e em δ_C 143,1 (C-10) a 3J ; e com o sinal em δ_C 19,66 (C-12) a 2J . Entre o sinal em δ_H 2,98 (H-4) e em δ_C 113,3 (C-5) e δ_C 100,3 (C-9) a 3J e com os sinais em δ_C 143,1 (C-10) e em δ_C 19,98 (C-13) a 2J . Entre o sinal em δ_H 6,3 (H-7) com os sinais em δ_C 160,9 (C-6) e em δ_C 162,3 (C-8) a 2J , com os sinais em δ_C 113,3 (C-5) e δ_C 100,3 (C-9) a 3J , e com o sinal em δ_C 168,54 (C-1) a 4J . Entre o sinal em δ_H 11,36 (8-OH) com o sinal em δ_C 162,3 (C-8) a 2J , com os sinais em δ_C 101,36 (C-7) 100,3 (C-9) a 3J , e com o sinal em 143,1 (C-10) a 4J . Observa-se também correlação entre o sinal em δ_H 9,84 (H-11) com o sinal em δ_C 113,3 (C-5) a 2J , e com os sinais em δ_C 160,9 (C-6) 143,1(C-10) a 3J . As correlações descritas anteriormente juntamente com as demais contidas na Tabela 10 em comparação com os dados na literatura (XIN et al., 2007) confirmam a proposta estrutural da substância **S7**.

Tabela 10: Dados de RMN de **S7** juntamente com dados da literatura (XIN et al., 2007).

Posição	1H (<i>J</i> em Hz)	^{13}C	$^1H^{Lit.}$	$^{13}C^{Lit.}$	HMBC(HC)	$^1H-^{13}C$ COSY
1		168,54		168,6		
3	4,69(<i>q</i> ;6,6)	79,97	4,69(<i>q</i> ;6,6)	80,0	C1,C10,C12	12
4	2,98(<i>q</i> ;7,2)	34,8	2,98(<i>q</i> ;7,3)	34,8	C5,C9,C13,C10	13
5		113,3		113,3		
6		160,9		161,0		
7	6,3(<i>s</i>)	101,36	6,31(<i>s</i>)	101,4	C1,C5,C6,C8,C9	
8		162,3		162,3		
8-OH	11,36(<i>s</i>)		11,36(<i>s</i>)		C7,C8, C9,C10	
9		100,3		100,3		
10		143,1		143,1		
11	2,1(3H, <i>s</i>)	9,84	2,10(3H, <i>s</i>)	9,9	C5,C6,C10	
12	1,33(3H, <i>d</i>)	19,66	1,34(3H, <i>d</i>)	19,7	C3,C-4	3
13	1,30(3H, <i>d</i>)	19,98	1,32(3H, <i>d</i>)	20,0	C3,C4,C10	4

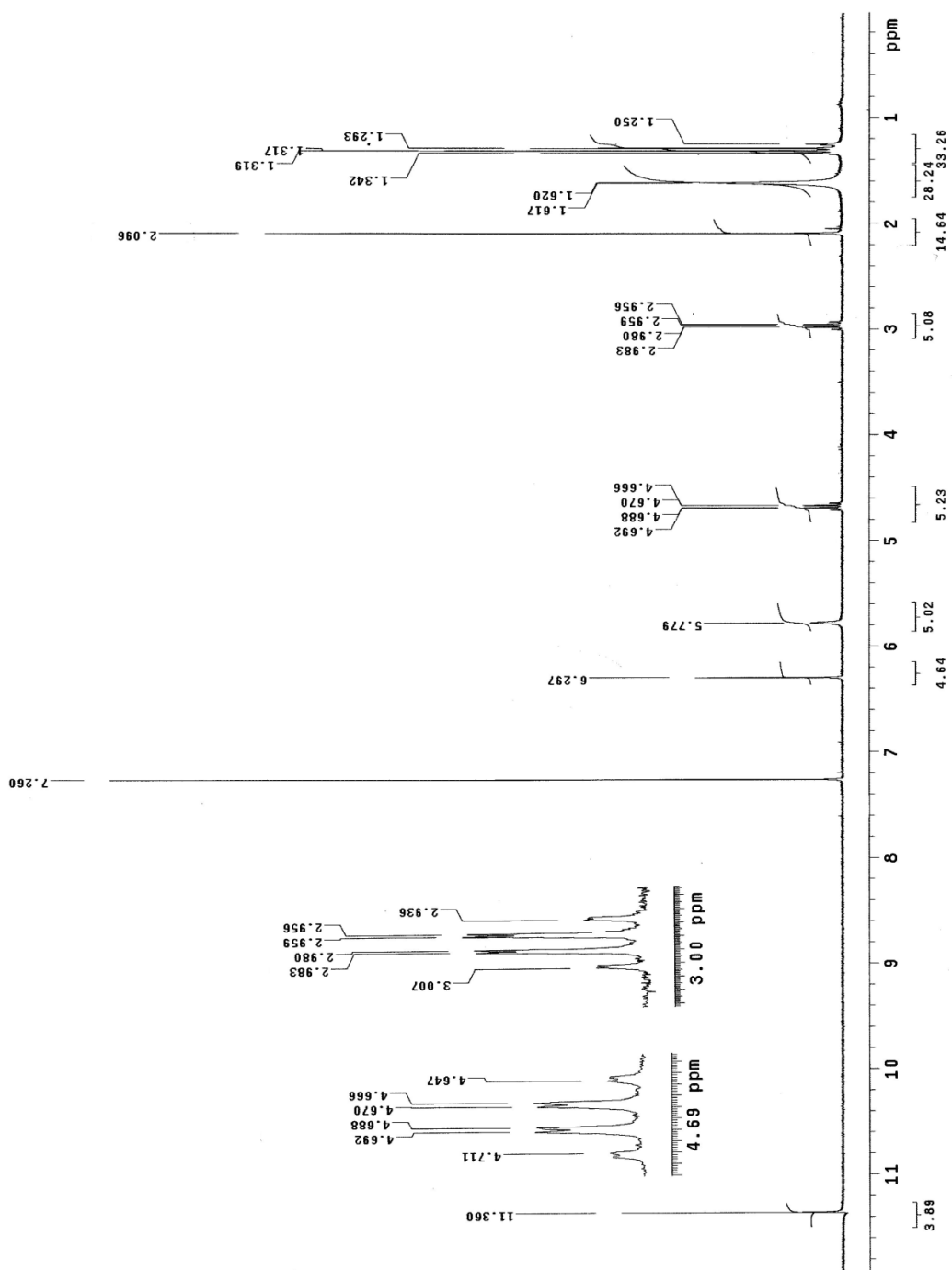
Figura 62: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S7**.

Figura 63: Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S7**.

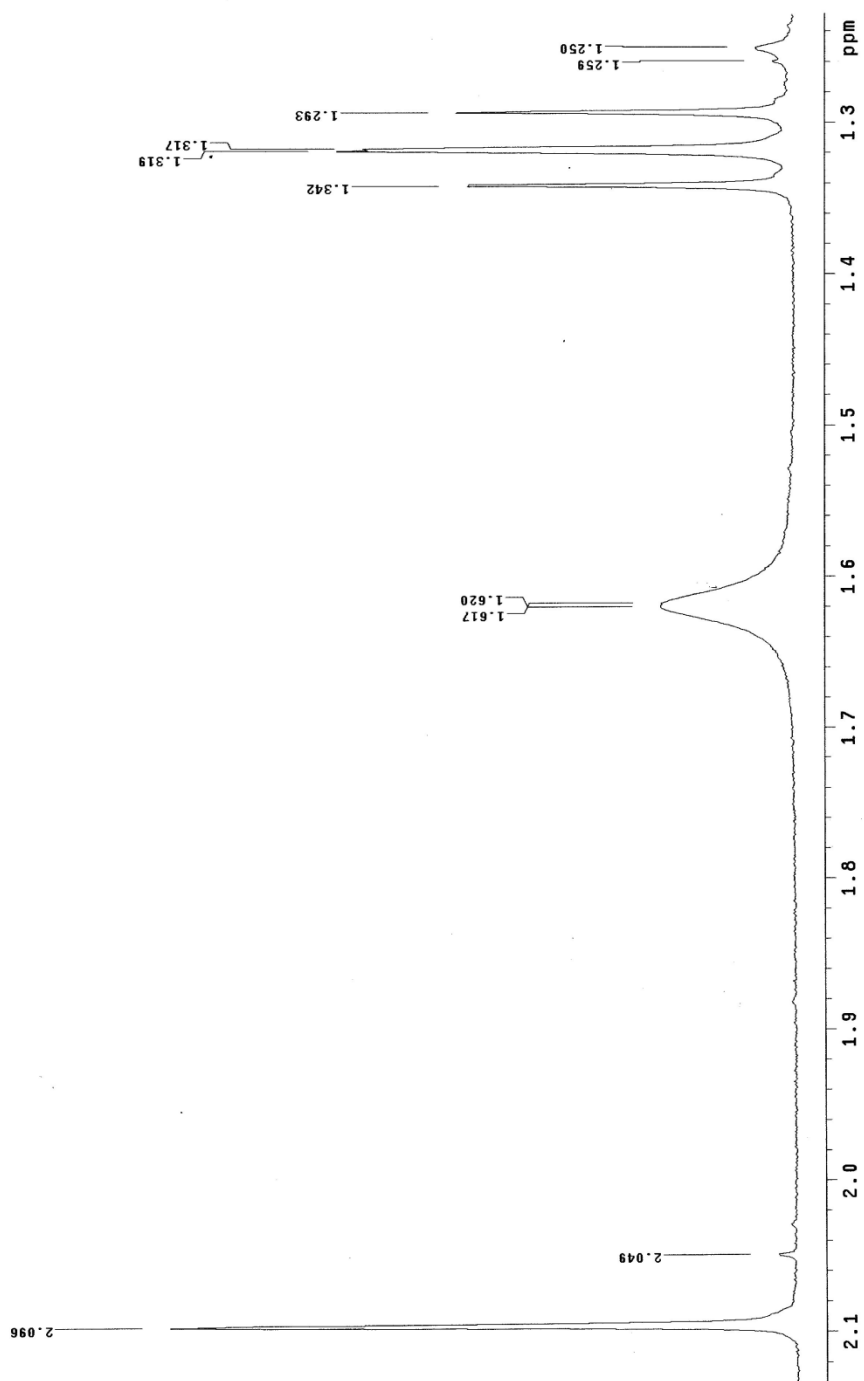


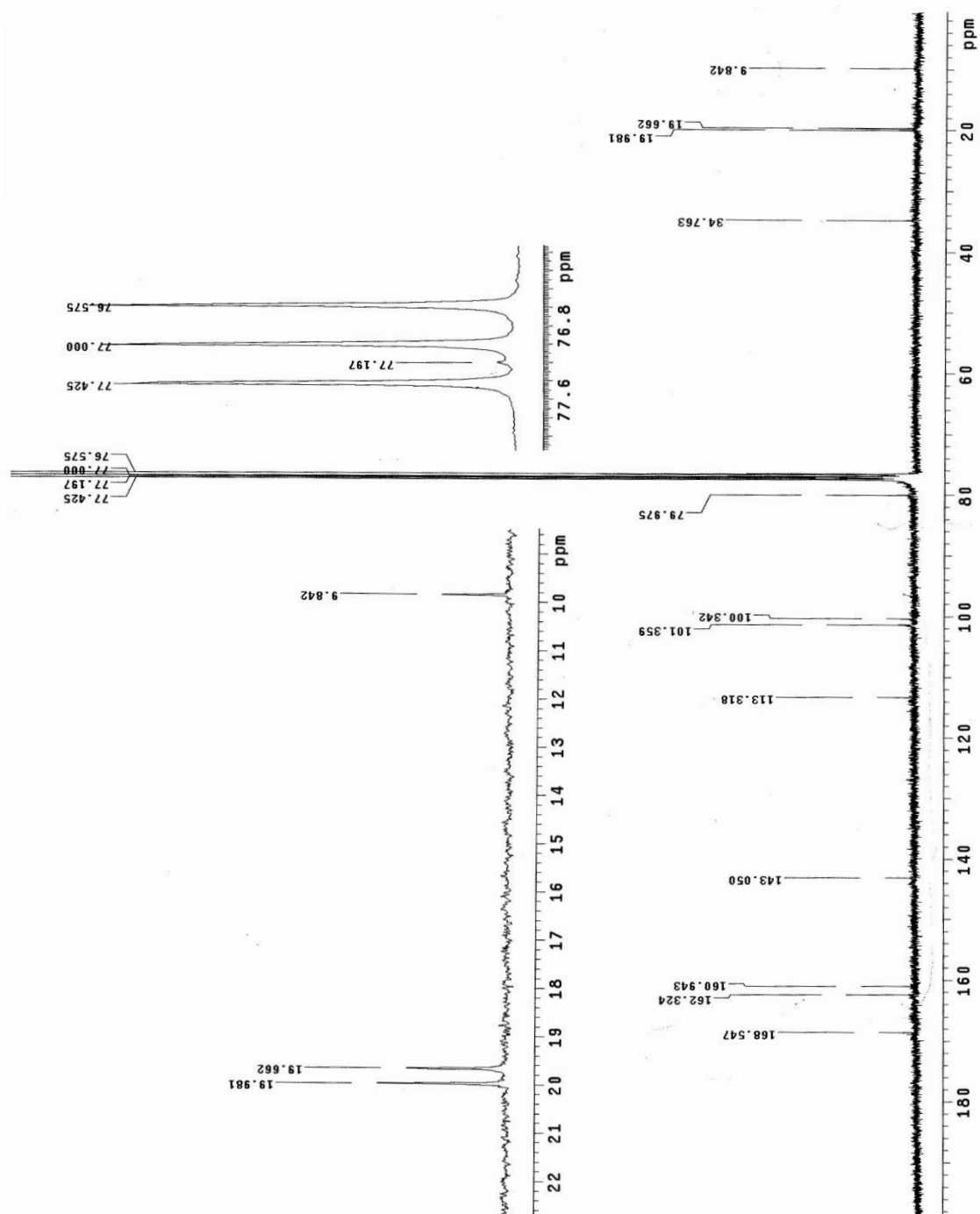
Figura 64: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **S7**.

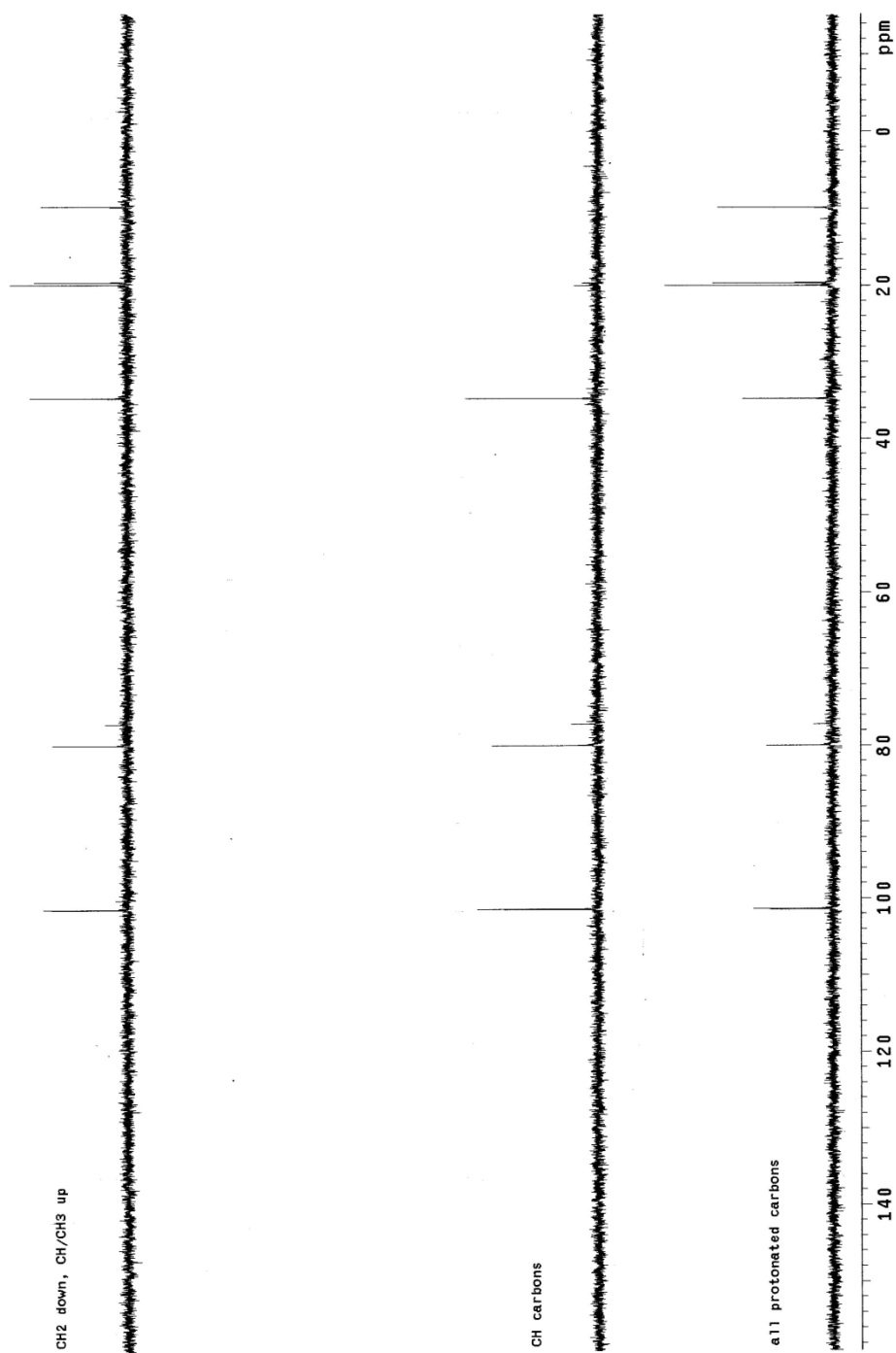
Figura 65: Espectro de DEPT (75 MHz, CDCl_3) de **S7**

Figura 66: Espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de **S7**.

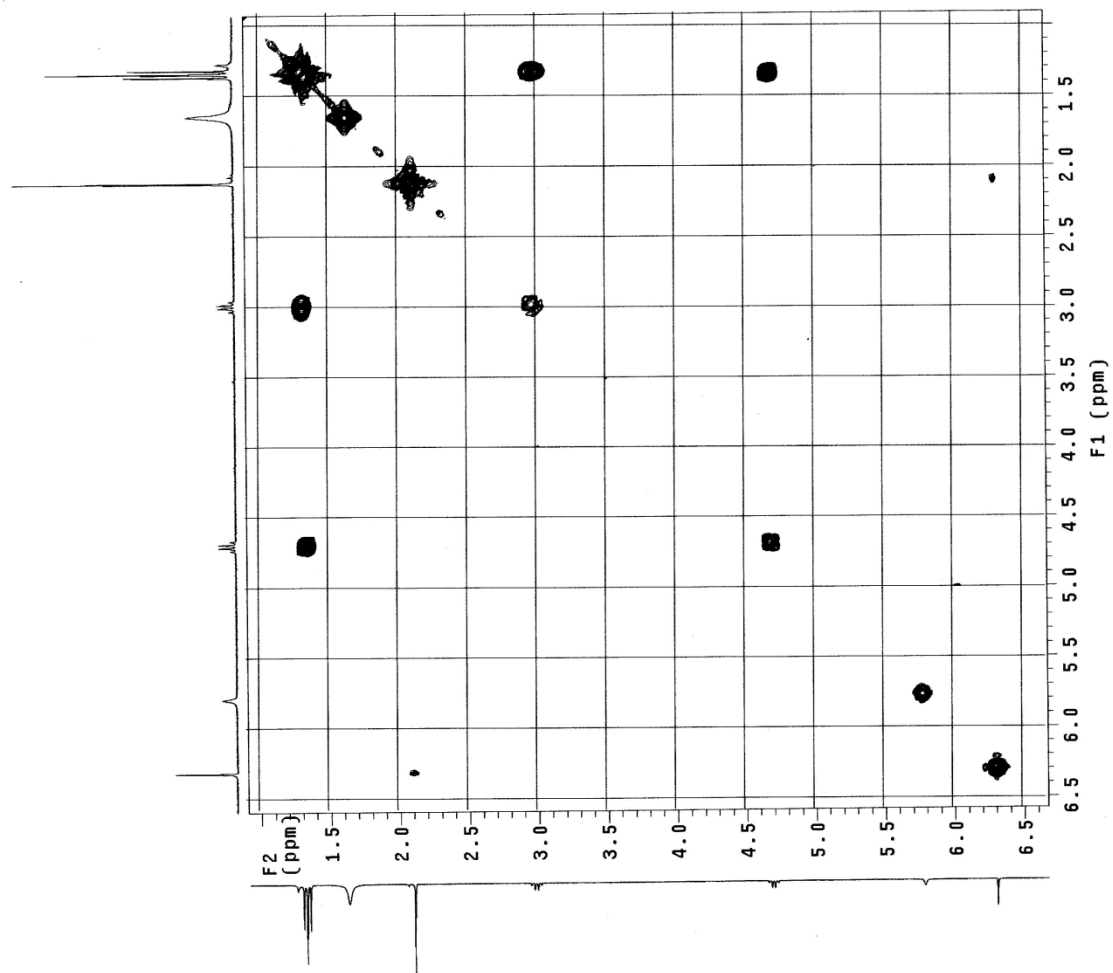


Figura 67: Expansão do espectro de COSY (300 MHz, CDCl_3) de **S7**.

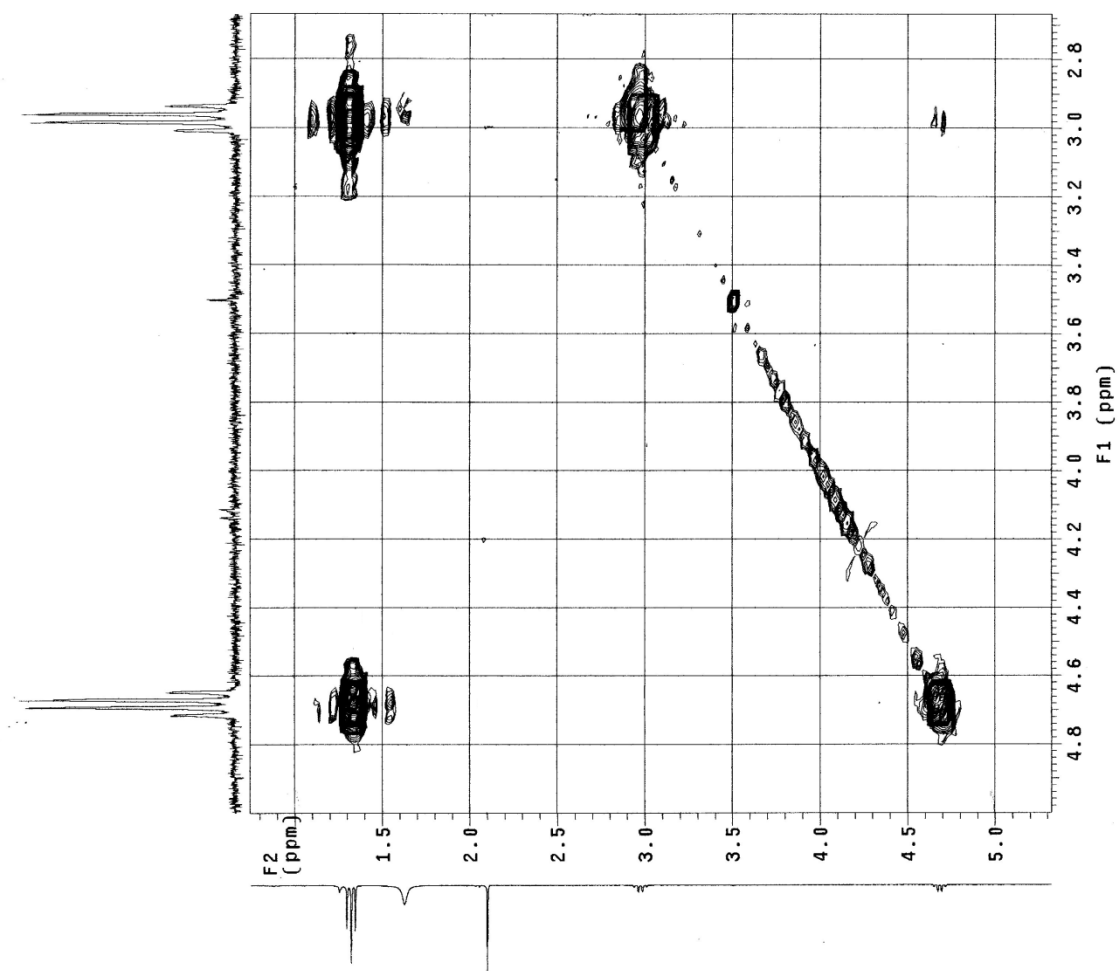


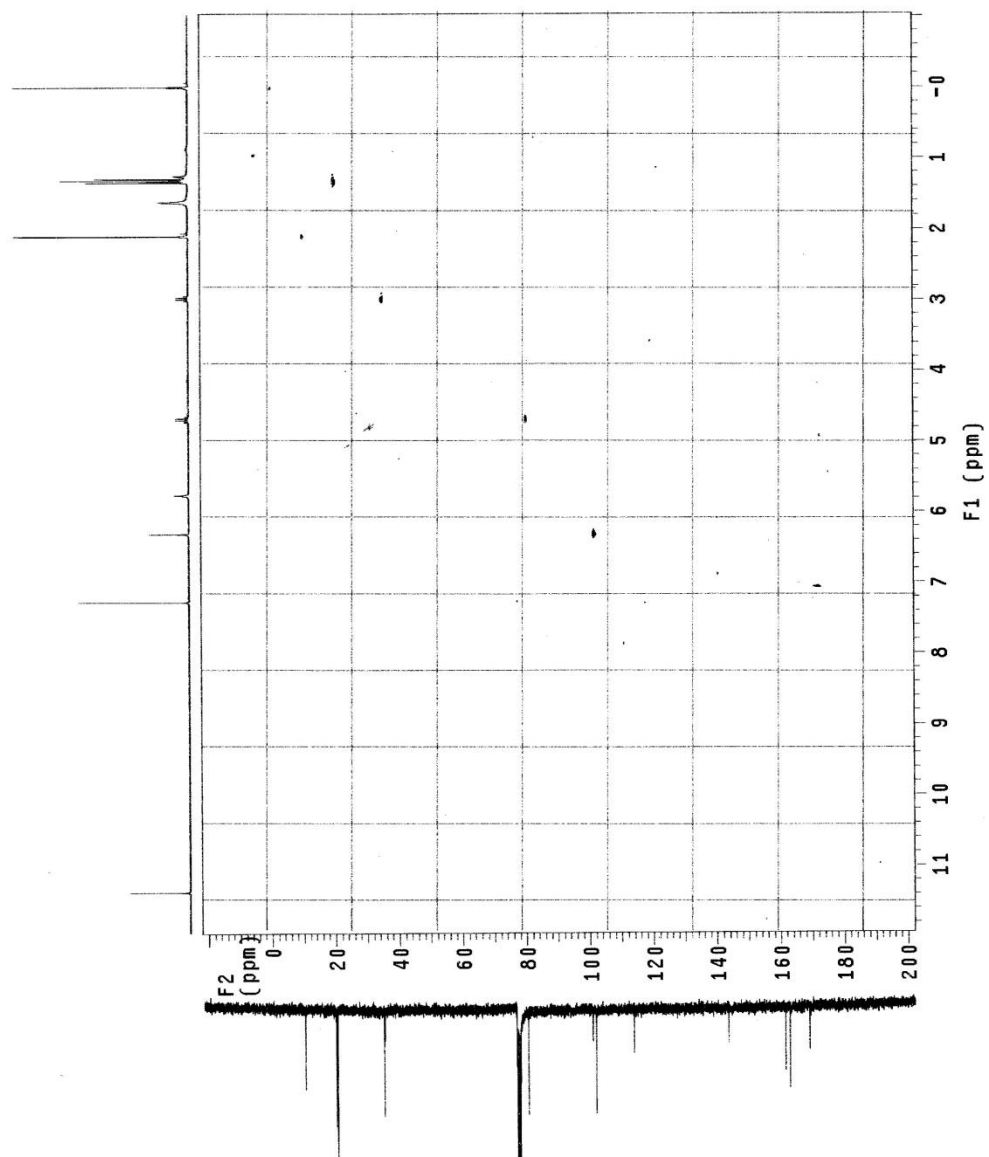
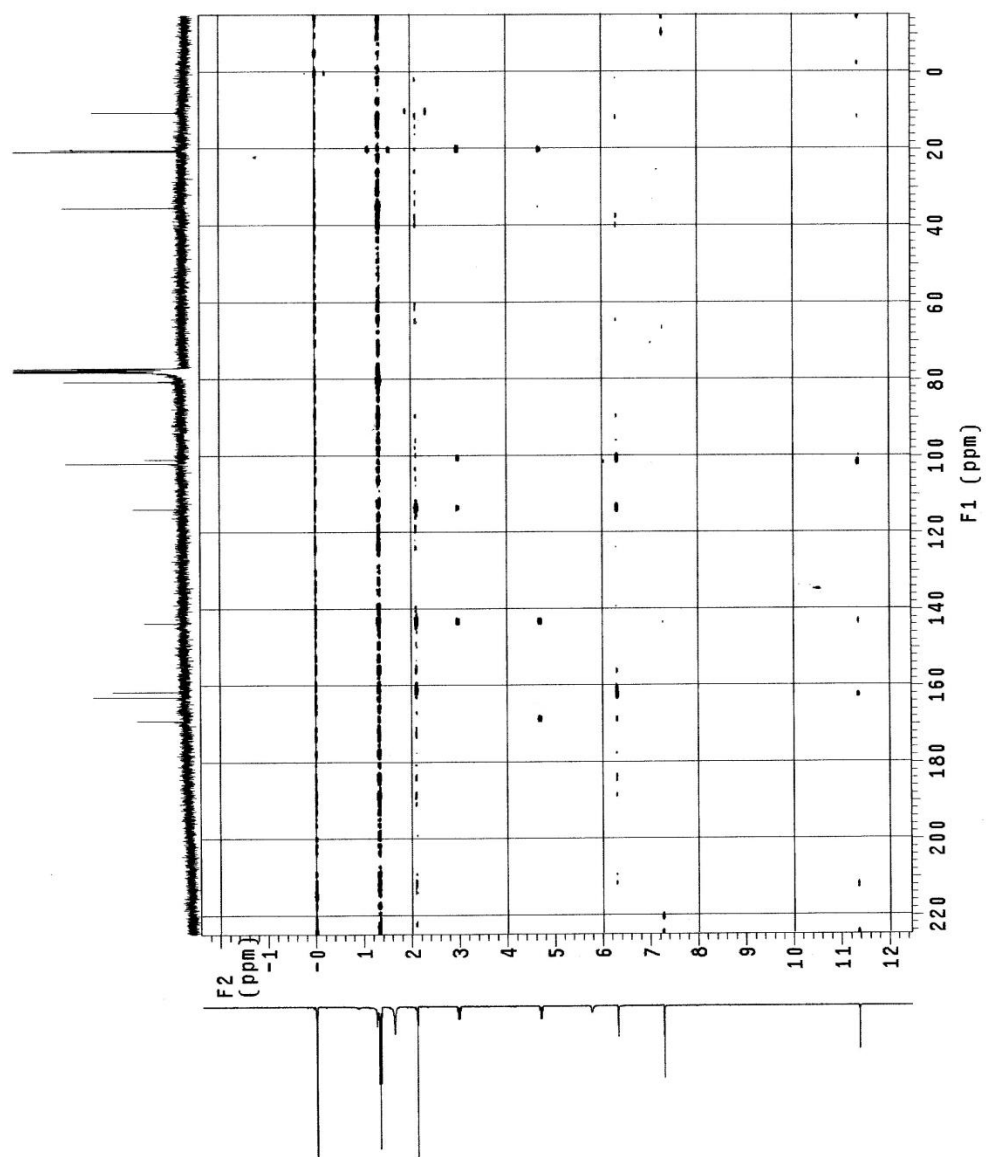
Figura 68: Espectro de HETCOR (CDCl_3) de **S7**

Figura 69: Espectro de HMBC (CDCl_3) de **S7**

5.7 REAÇÕES DE BIOTRANSFORMAÇÃO PROMOVIDA PELO FUNGO ENDOFÍTICO NB-1

5.7.1 Reação de biotransformação da chalcona **S8**

A reação de biotransformação utilizando-se como substrato a chalcona 3-(2,3,4-trimetoxifenil)-1-(4-metóxi)-2-propen-1-ona (**S8**) forneceu como produto a diidrochalcona 3-(2,3,4-trimetóxiifenil)-1-(4-metoxifenil)-fenilpropan-1-ona (**S9**). A reação de biorredução da dupla ligação da posição α em relação à carbonila (**Figura 70**) do substrato foi evidenciada pela análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 72**), do produto da reação, onde observa-se sinais de hidrogênios metilênicos H- α em $\delta_{\text{H}}=3,18$ (t, 2H, $J=8,5$ Hz) e H β em $\delta_{\text{H}}= 2,95$ (t, 2H, $J=8,5$). No espectro do substrato 3-(2,3,4-trimetoxifenil)-1-(4-metóxi)-2-propen-1-ona (**Figura 71**) observam-se sinais de hidrogênios metínicos de carbonos insaturados em $\delta_{\text{H}}=7,95$ e em $\delta_{\text{H}}=7,55$ das posições β e α , respectivamente, em relação à carbonila.

Figura 70: Reação de biorredução da chalcona **S8**

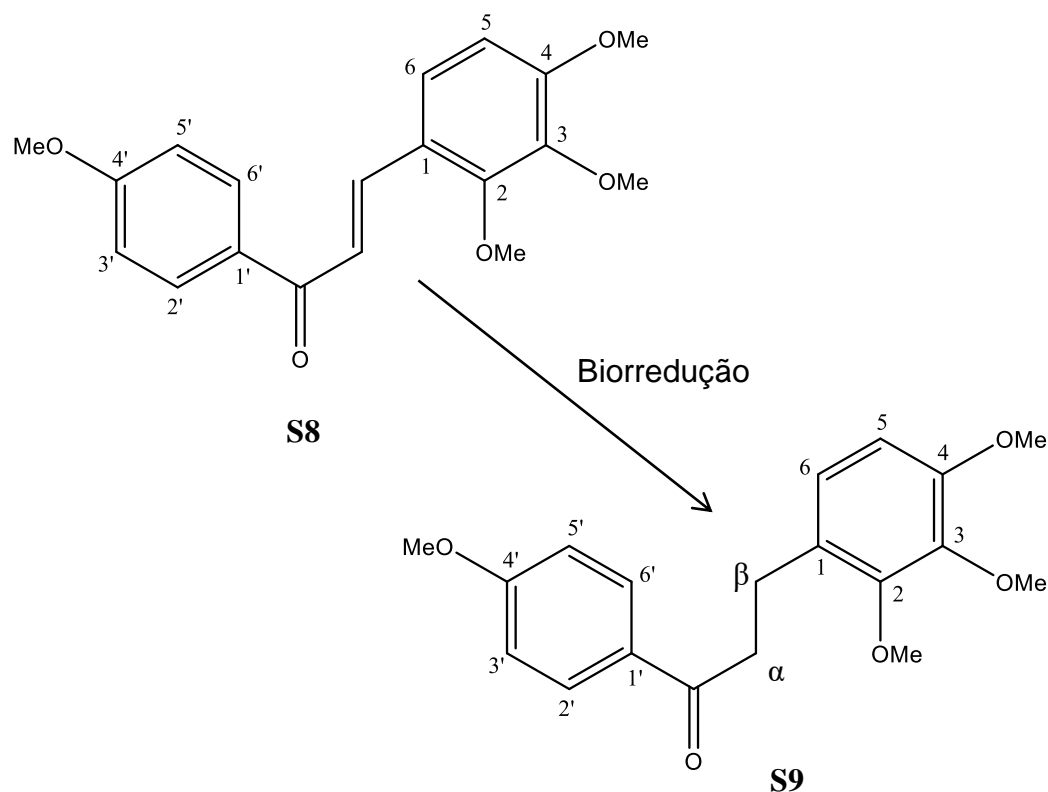


Figura 71: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) da Chalcona **S8**

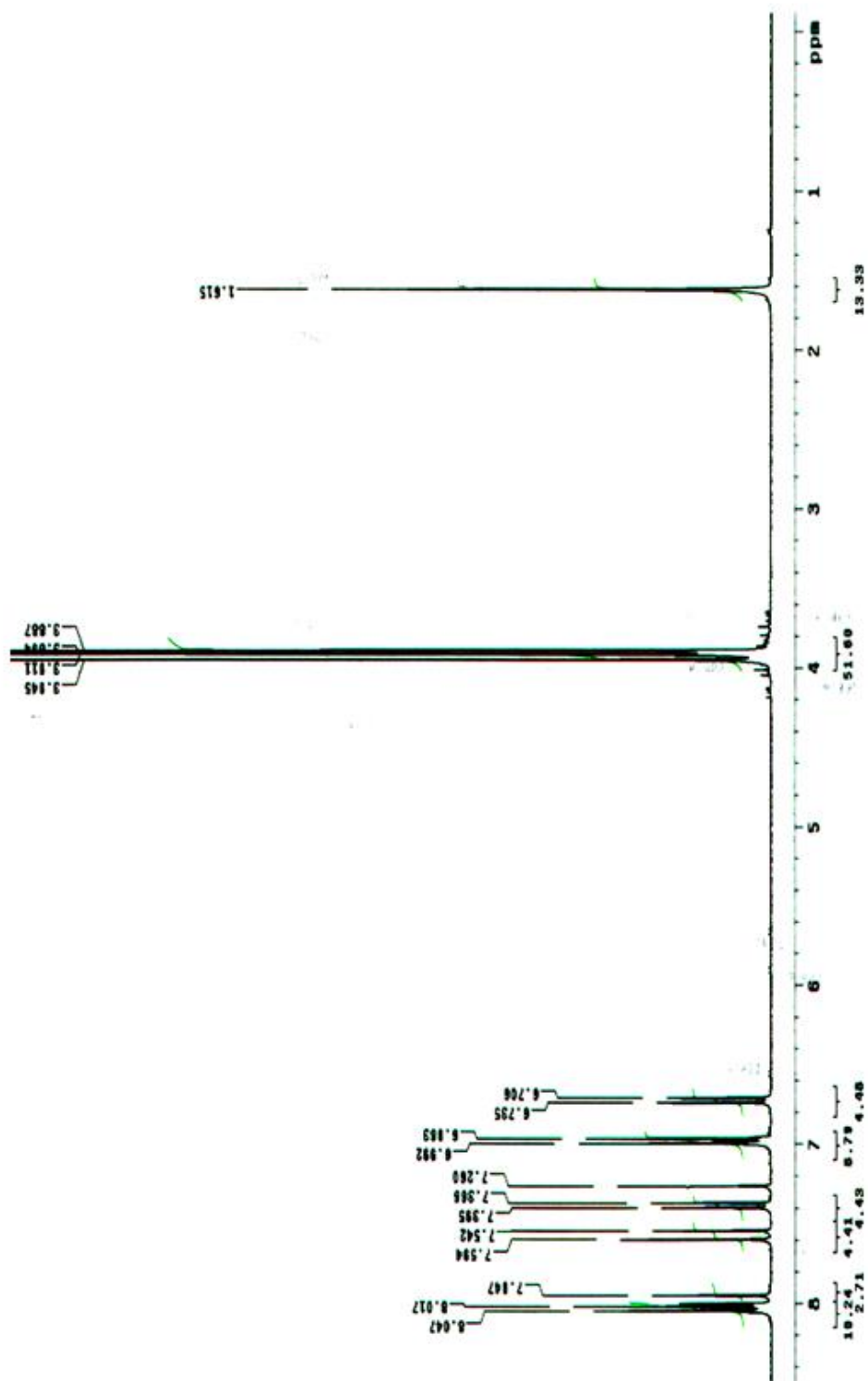
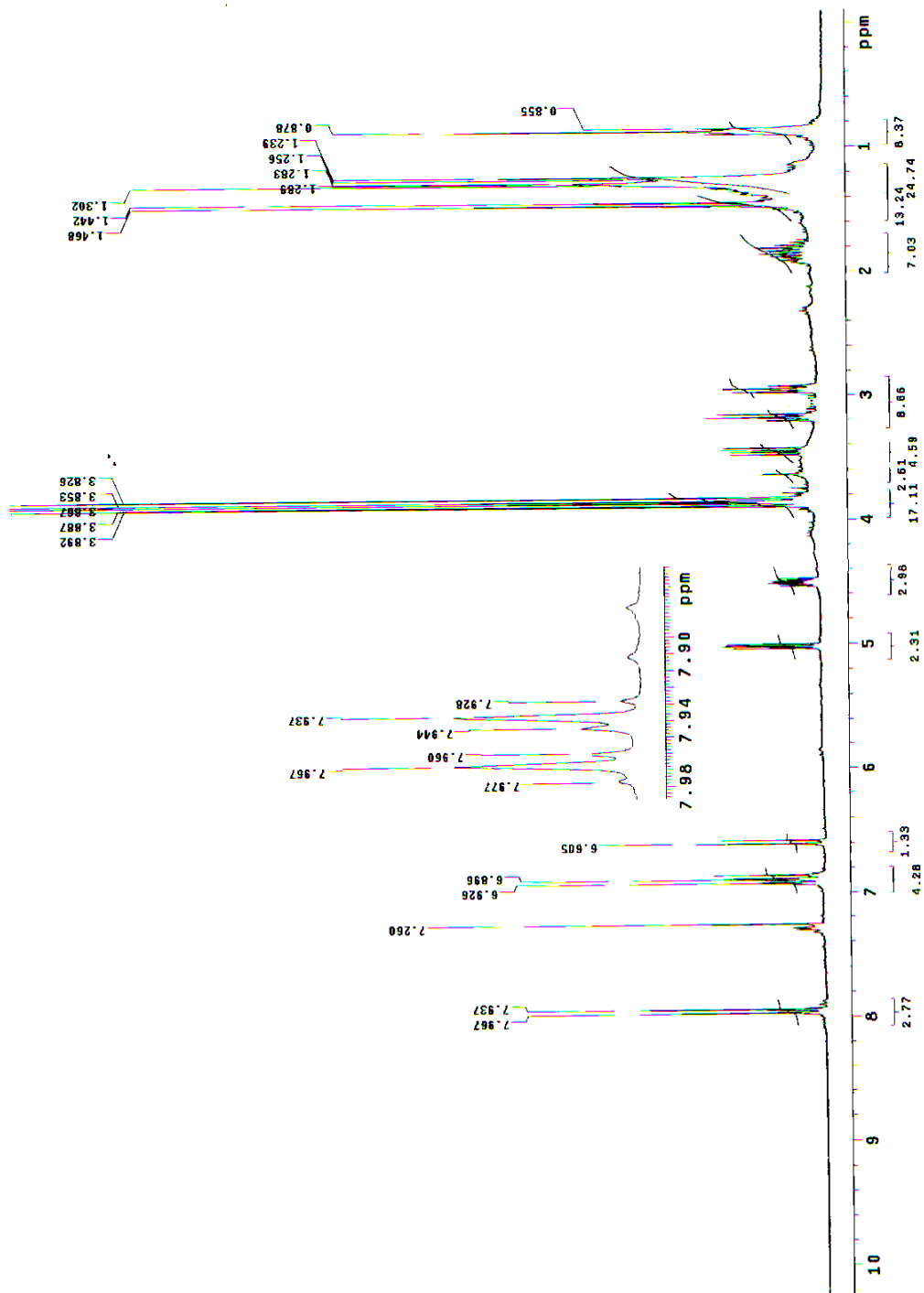


Figura 72: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **S9**.

5.7.2 Reação de biotransformação da 4-nitroacetofenona (S10)

A reação de biotransformação (**Figura 73**) utilizando-se como substrato a cetona aromática 4-nitroacetofenona (**S10**) forneceu como produto o 4-nitrofeniletan-1-ol (**S11**). Confirma-se o produto 4-nitrofeniletan-1-ol pelo análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 75**), onde observa-se a presença de um quarteto em $\delta_{\text{H}}=5,02$ (1H, $J=6,6$) referente ao hidrogênio H-7 e um duplete em $\delta_{\text{H}}=1,51$ (3H, $J=6,6$) referente a H-8. No espectro de RMN de ^1H (**Figura 74**) da 4-nitroacetofenona (**S10**) observa-se apenas sinais na região de aromáticos e um singlete em $\delta_{\text{H}}=2,663$ referente a H8, confirmando a reação de biorredução da dupla ligação da carbonila à álcool.

Figura 73: Reação de biorredução da 4-nitroacetofenona (**S10**)

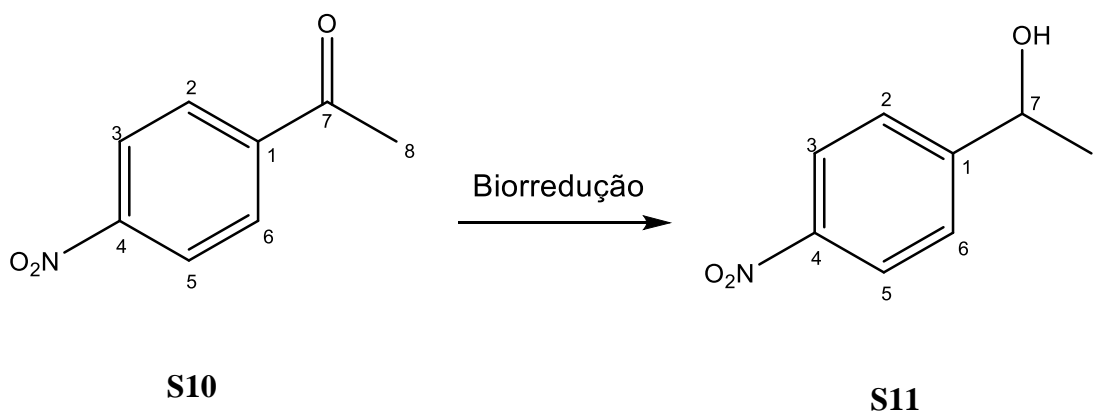


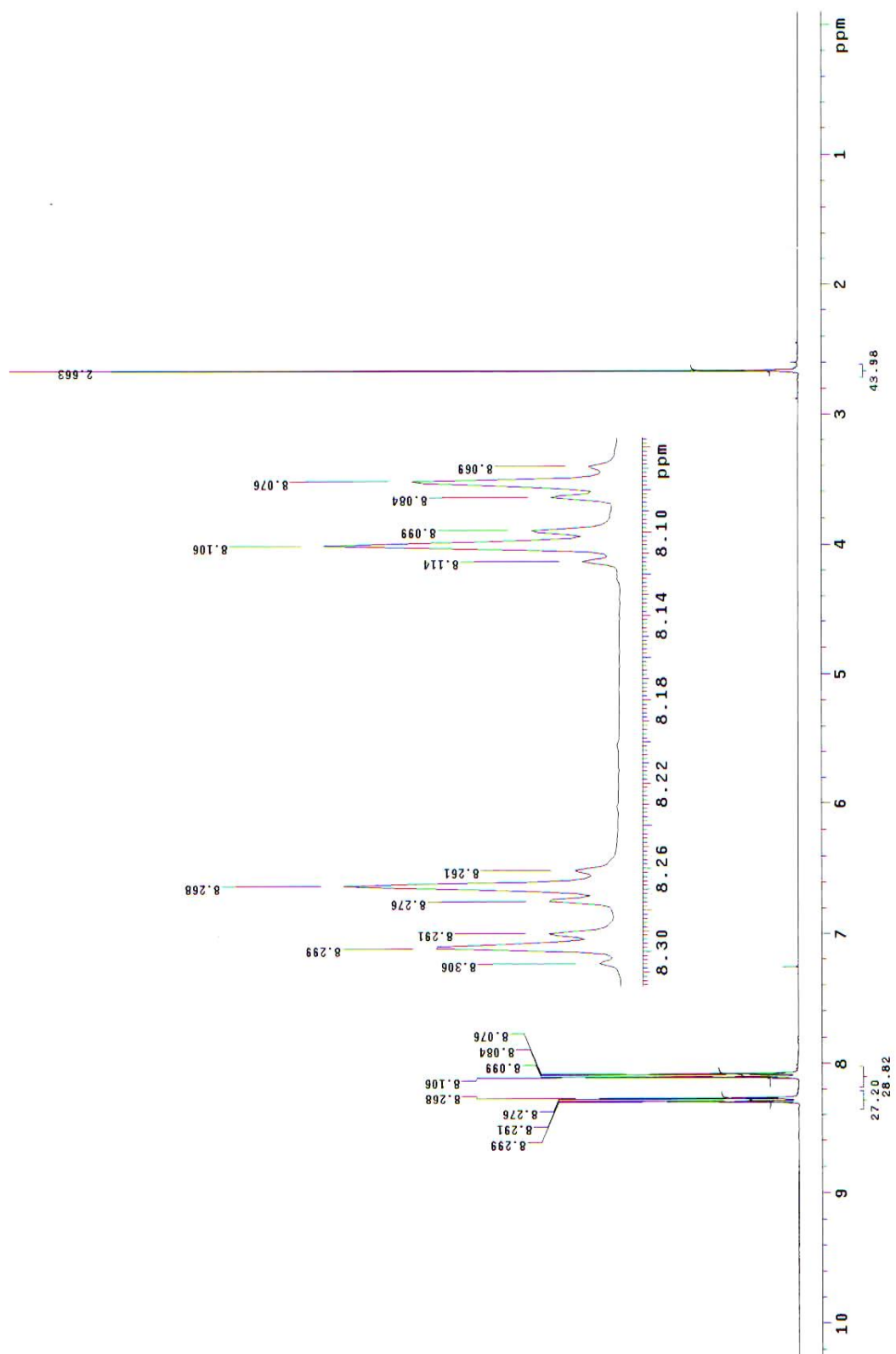
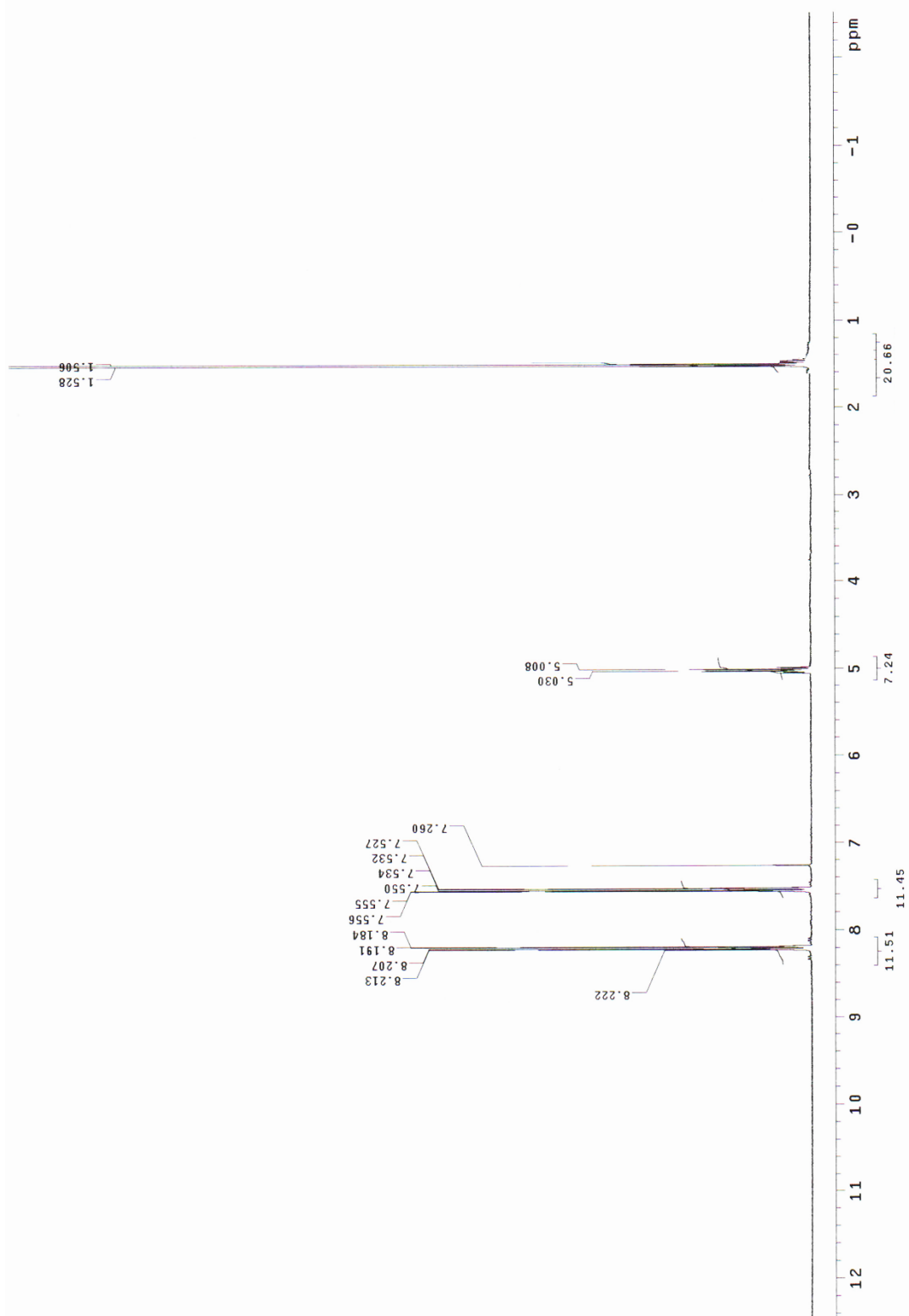
Figura 74: Espectro de RMN de ^1H da 4-nitroacetofenona (300 MHz, CDCl_3)(S10)

Figura 75: Espectro de RMN de ^1H do 4-nitrofeniletan-1-ol (300 MHz, CDCl_3) (**S11**)

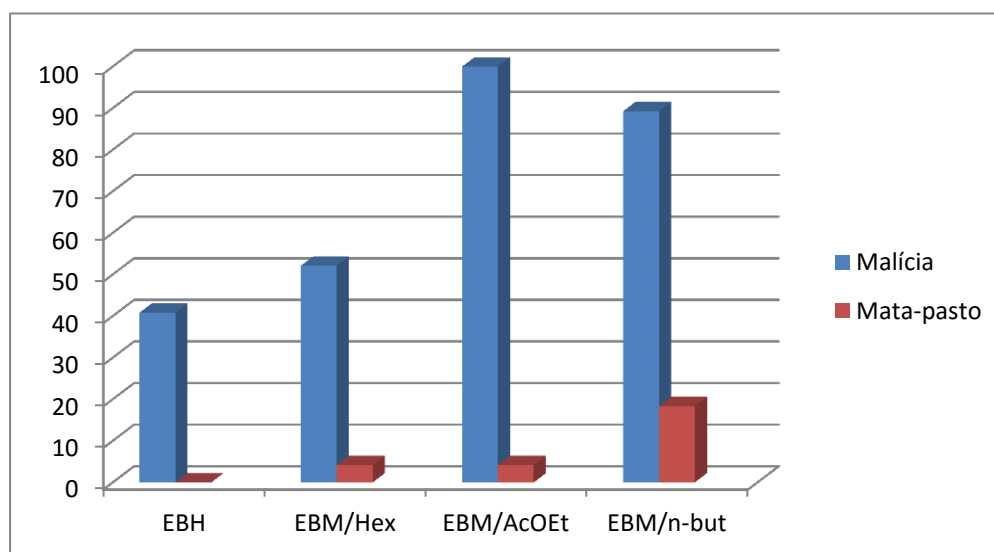
5.8 RESULTADOS DA ATIVIDADE FITOTÓXICA

5.8.1 Atividade fitotóxica dos extratos obtidos da biomassa produzida por *Nephrolepis brownii* frente à germinação das sementes de malícia e mata-pasto

Nos ensaios realizados foram utilizados os extratos EBH, EBM/Hexânico, EBM/AcOEt e EBM/n-But das partes aéreas de *Nephrolepis brownii*. Foram adicionados 3 mL em cada placa de Petri, na concentração de 50 ppm, em um esquema de triplicata. Depois de um período de 5 dias, as sementes as sementes germinadas foram contadas e através de médias foi estabelecido os percentuais de inibição.

Os extratos EBM/Hex, EBM/AcOEt e n-But apresentaram efeitos inibitórios mais intensos sobre a germinação das sementes de malícia, destacando o EBM/AcOEt que apresentou 100% de inibição, enquanto que no teste sobre a germinação de sementes de mata-pasto os resultados não foram satisfatórios, como ilustrado na **FIGURA 76**.

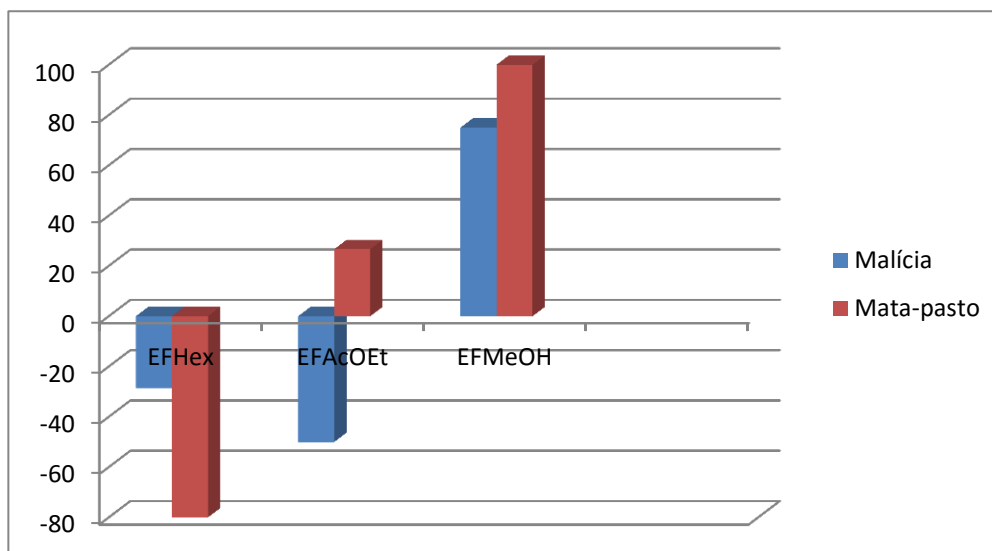
Figura 76: Efeito dos extratos EBH, EBM/Hex, EBM/AcOEt e EBM/n-But, na concentração de 50 ppm, sobre germinação das sementes de malícia e mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição em relação ao tratamento testemunha (água destilada)



5.8.2 Atividade fitotóxica dos extratos obtidos da biomassa produzida pelo fungo endofítico NB-1 frente à germinação das sementes de malícia e mata-pasto

Os extratos fúngicos obtidos em meio sólido (arroz), EFHex, EFAcOEt e EFMeOH, foram testados frente a germinação das sementes de malícia e mata-pasto (**Figura 77**). Apenas o EFMeOH apresentou efeito inibitório considerável sobre a germinação das sementes de malícia e mata-pasto, com potenciais de inibição elevados, 75% e 100%, respectivamente. O EFHex apresentou efeito estimulante sobre as sementes de malícia e mata-pasto, e o EFAcOEt também estimulou a germinação das sementes de malícia (**Figura 77**).

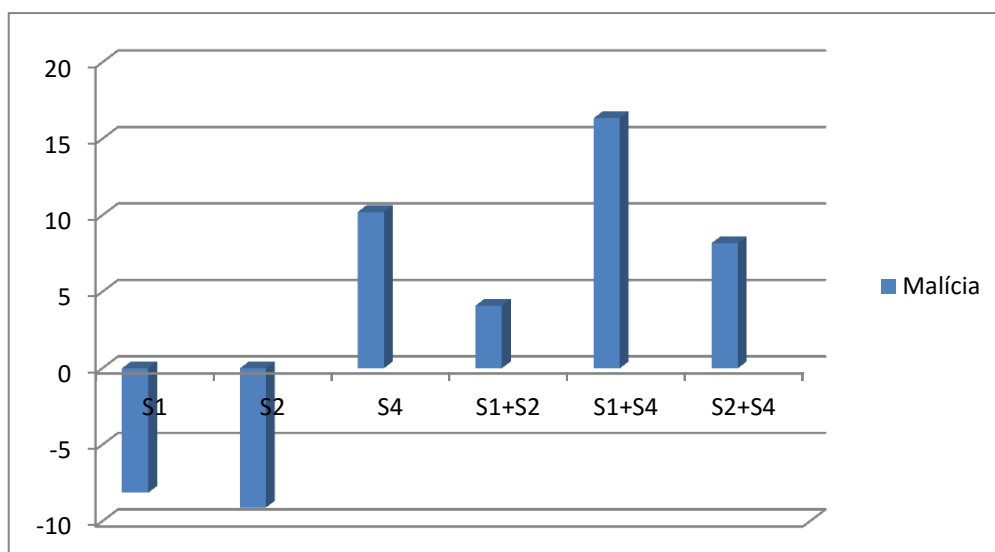
Figura 77: Efeito dos extratos EFHex, EFAcOEt e EFMeOH na concentração de 50 ppm, sobre germinação das sementes de malícia e mata-pasto. Dados expressos em percentual de inibição (valor positivo) e estímulo (valor negativo) em relação ao tratamento testemunha (água destilada)



5.8.3 Avaliação da atividade fitotóxica das substâncias, isoladamente e aos pares frente à germinação das sementes de malícia

Isoladamente, as substâncias **S1**, **S2** e **S4**, na concentração de 150 ppm, apresentaram baixo potencial inibitório da germinação das sementes da planta daninha malícia (*Mimosa pudica*) com valores máximos de inibição sempre inferiores a 35%. A substância **S4** foi aquela que apresentou efeito inibitório mais intenso sobre a germinação de sementes de malícia (10,22%), enquanto que **S1** e **S2** estimularam a germinação das sementes das plantas daninhas, como é possível observar nas **Figura 78**. A intensidade dos efeitos observados para as substâncias testadas aos pares, na proporção de 1:1, também não foi significativa, porém observa-se que houve um aumento no percentual de inibição em comparação às substâncias individualmente, estabelecendo uma relação de sinergismo entre as mesmas.

Figura 78: Efeitos das substâncias **S1**, **S2** e **S4**, na concentração de 150 ppm, (isoladas e em pares) sobre a germinação de sementes da planta daninha malícia (*Mimosa pudica*). Dados expressos em percentual de inibição (valor positivo) e estímulo (valor negativo) em relação ao tratamento testemunha



5.8.4 Avaliação da atividade fitotóxica das substâncias, isoladamente e aos pares frente ao alongamento da radícula e hipocótilo da planta daninha malícia

Os efeitos sobre o alongamento da radícula indicaram que somente **S2** promoveu inibição (25,67%), enquanto as demais substâncias isoladamente e aos pares estimularam o crescimento da radícula das sementes de malícia, havendo até antagonismo entre elas, com a mistura **S1+S2** apresentando forte potencial de estímulo (76,4 %) (**Figura 79**).

A atividade fitotóxica de um dado aleloquímico está relacionada diretamente à concentração e à especificidade entre o aleloquímico e a espécie receptora. Para a concentração utilizada neste trabalho, 150 mg L⁻¹, a inibição não foi satisfatória para o alongamento da radícula da planta daninha malícia, tanto para as substâncias testadas isoladamente quanto aos pares, o que indica menor sensibilidade à fitotoxicidade das substâncias, (REIGOSA; MALVIDO, 2007) (VILHENA et al. 2014) (SOUZA FILHO; MOURÃO, 2010).

O hipocótilo (**Figura 79**) foi o fator da planta que apresentou menor sensibilidade aos efeitos fitotóxicos das substâncias na planta daninha malícia, tanto quando aplicadas isoladamente, quanto aos pares. Nos experimentos com as substâncias isoladas ou em pares, ocorreram apenas estímulos, ou seja, houve crescimento do hipocótilo, com a substância **S4** apresentado maior potencial de estímulo (68,2 %).

Figura 79: Efeitos inibitórios das substâncias **S1**, **S2** e **S4**, na concentração de 150 ppm, sobre o alongamento da radícula da planta daninha malícia. Dados expressos em percentual de inibição, em relação ao tratamento testemunha.

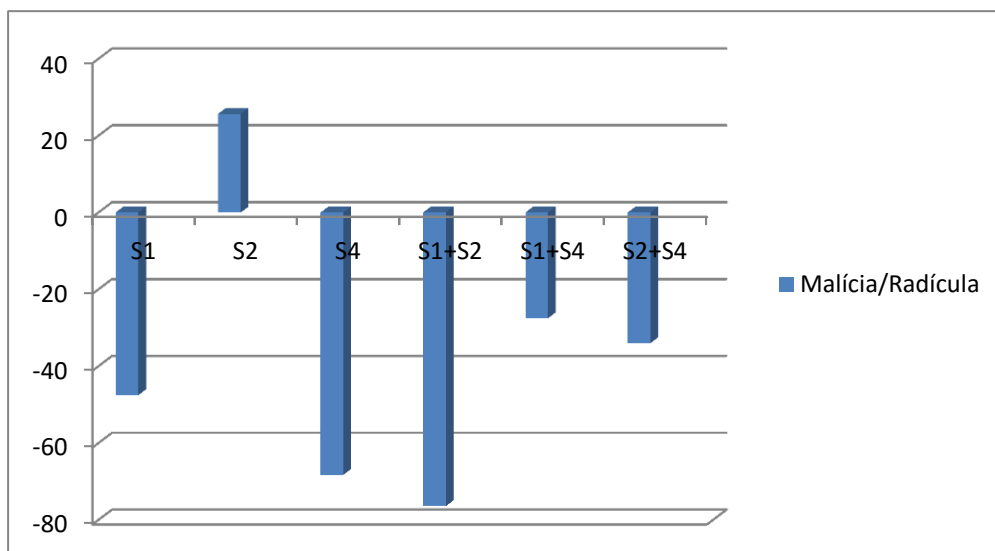
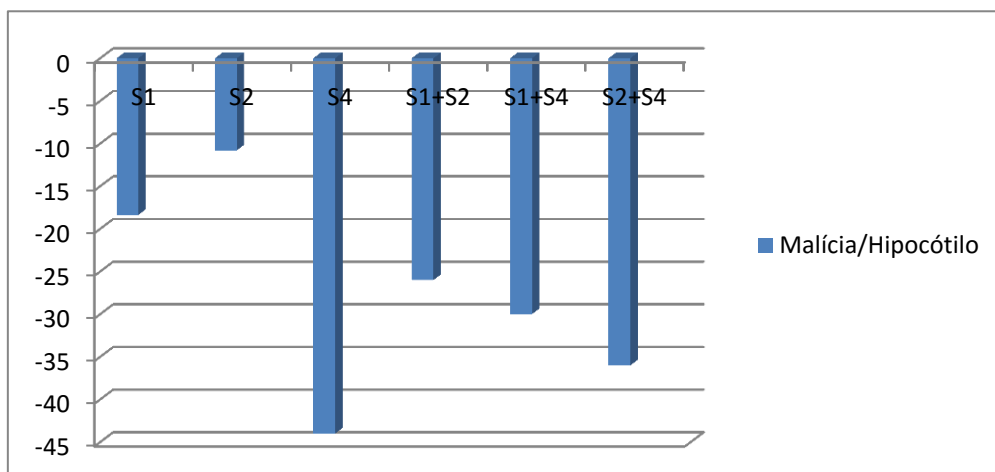


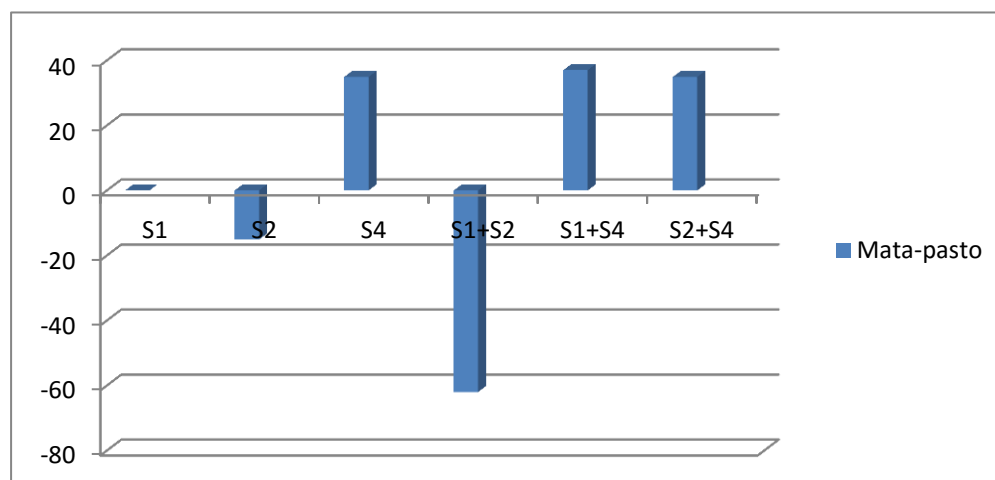
Figura 80: Efeitos inibitórios das substâncias **S1**, **S2** e **S4**, na concentração de 150 ppm, sobre o alongamento do hipocótilo da planta daninha malícia. Dados expressos em percentual de inibição, em relação ao tratamento testemunha.



5.8.5 Avaliação da atividade fitotóxica das substâncias, isoladamente e aos pares frente à germinação das sementes de mata-pasto

Na avaliação dos efeitos fitotóxicos sobre a germinação das sementes de mata-pasto (*Senna obtusifolia*) observa-se na **Figura 81** que **S4** foi quem apresentou efeito inibitório mais intenso sobre a germinação das sementes (35%), enquanto que **S1** não inibiu e **S2** estimulou a germinação das sementes de mata-pasto. Quando combinadas **S1+S4** e **S2+S4** apresentaram uma relação de sinergismo, porém com valores baixos. A mistura **S1+S2** estimulou a germinação das sementes.

Figura 81: Efeitos inibitórios das substâncias **S1**, **S2** e **S4** (isoladas e em pares), nas concentrações de 150 ppm, sobre a germinação de sementes da planta daninha mata-pasto (*Senna obtusifolia*). Dados expressos em percentual de inibição (positivo) e estímulo (negativo) em relação ao tratamento testemunha

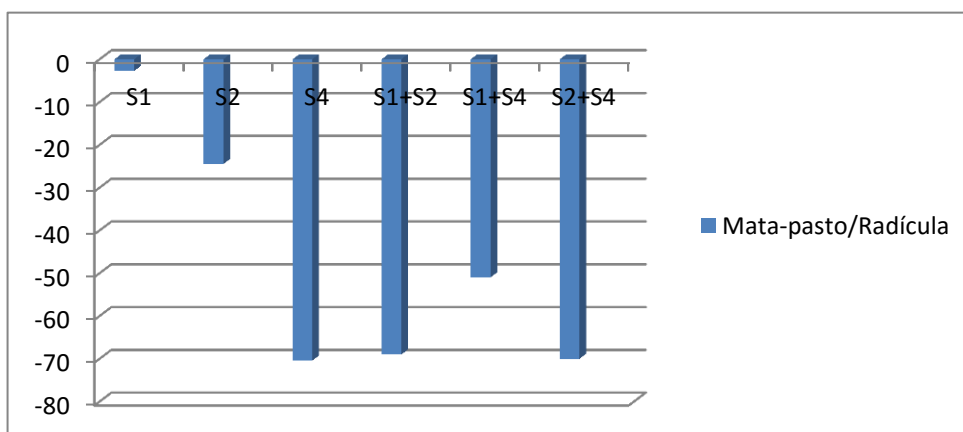


5.8.6 Avaliação da atividade fitotóxica das substâncias, isoladamente e aos pares frente ao alongamento da radícula e hipocótilo da planta daninha mata pasto

Na avaliação do desenvolvimento da radícula e hipocótilo das sementes de mata-pasto não houve inibição, apenas estímulo quando as substâncias foram utilizadas isoladamente ou aos pares.

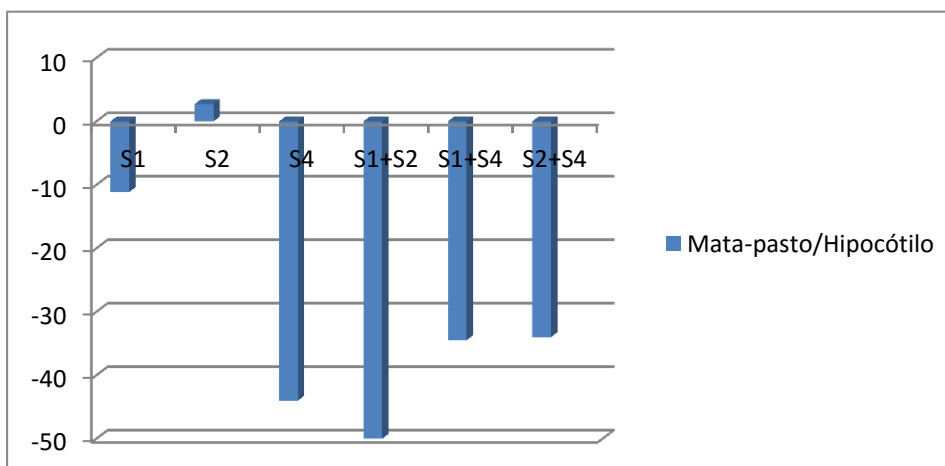
A substância **S4** estimulou o crescimento da radícula da planta daninha mata-pasto (70,4 %), e as combinações das substâncias **S1+S2** e **S2+S4** estimularam o crescimento em 69 % e 70 %, respectivamente.

Figura 82: Efeitos das substâncias **S1**, **S2** e **S4** (isoladas e em pares), na concentração de 150 ppm, sobre o alongamento da radícula da planta daninha mata-pasto (*Senna obtusifolia*). Dados expressos em percentual de estímulo, em relação ao tratamento testemunha



No ensaio sobre o alongamento do hipocótilo da planta daninha mata-pasto, não houve resultado significativo de inibição. A substância **S4** e a mistura **S1+S2** estimularam o alongamento do hipocótilo em 44% e 50%, respectivamente.

Figura 83: Efeitos das substâncias **S1**, **S2** e **S4** (isoladas e em pares), na concentração de 150 ppm, sobre o alongamento da radícula da planta daninha mata-pasto (*Senna obtusifolia*). Dados expressos em percentual de estímulo, em relação ao tratamento testemunha



5.9 ATIVIDADES ANTIPROMASTIGOTA

A atividade antipromastigota das substâncias obtidas das folhas de *Nephrolepis brownii* e do fungo endofítico associado a mesma foi testada contra a forma promastigota de *L. amazonensis* na fase logarítmica de crescimento usado no ensaio o MTT.

A concentração inibitória de 50% (CI_{50}) é a concentração que causa a redução de 50% das células em crescimento (viáveis) e foi determinada pelo programa GraphPadPrism versão 5.04 (**Tabela 11**). Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado a leitura visual e para a CI_{50} a leitura de placas de ELISA, adotando-se os determinados critérios adaptados (MOTA, 2015).

Tabela 11: Interpretação dos resultados baseado na faixa do CIM e CI_{50} .

CIM/ CI_{50} μ L	Resultados
Menor ou igual a 100	Ativo
Entre 101-200	Moderadamente ativo
Acima de 200	Inativo

As substâncias testadas (**S1**, **S2**, **S3** e **S5**) mostraram valores de CIM/ CI_{50} acima de 200 (**Tabela 12**), portanto não foram ativas para a espécie *L. amazonensis*. A falta de atividade em promastigota não significa ausência de atividade em amastigota, sabe-se que algumas substâncias podem ser atividades em apenas uma das formas de *Leishmania*.

Tabela 12: CI_{50} das substâncias testadas em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Amostras	<i>L. amazonenses</i> / CI_{50} (μ g/mL)
S1	>200
S2	>200
S3	>200
S5	>200
Anfotericina B	<0,1699 \pm 0,0004

Legenda: CI_{50} – Concentração Inibitória 50%

6 CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das partes aéreas de *Nephrolepis brownii* levou ao isolamento do triterpeno ferneno (**S1**), muito comum em espécies desse gênero, além do pinitol (**S2**) também encontrado no gênero *Nephrolepis*.

Foram realizados ensaios para analisar a fitotoxicidade dos extratos e das substâncias isoladas de *Nephrolepis brownii*, sendo que os extratos EBM/Hex, EBM/AcOEt e EBM/n-But apresentaram elevados percentuais na inibição frente a germinação das sementes de malícia, chegando a inibir até 100%, como foi o caso de EBM/AcOEt. Quando testadas isoladamente, as substâncias não apresentaram resultados satisfatórios.

No estudo do óleo essencial de *N. brownii* foram identificadas 80 substâncias, a maioria pertencentes às funções aldeído (26,62%), álcool (25,11%) e cetona (17,15%), dentre esses Z-2-(3,3-dimetilciclohexilidene)-Etanol (8,65%), Safrol (8,81%), undecan-2-ona (8,89%), teaspirano (8,99%), n-tridecano (9,05%), n-undecanal (9,20%), o-metil-orsinol (9,32%) e deca-(2E,4E)-dienal (9,41%) foram majoritários.

Das partes aéreas de *N. brownii* foi isolado somente um fungo endofítico (NB-1) associado à planta. O cultivo do fungo em meios sólido e líquido, levou ao isolamento e identificação de três compostos fenólicos: *p*-hidróxibenzaldeído (**S3**), ácido *p*-hidroxifenilacético (**S4**) e ácido 4-hidroxibenzóico (**S5**); o peróxido de ergosterol (**S6**) e a isocumarina stoloniferol B (**S7**). Outro composto, também fenólico, foi isolado do EBM/AcOEt da planta e do EFMeOH do fungo endofítico, porém ainda encontra-se em fase de identificação.

Os extratos fúngicos foram testados frente a germinação das sementes de malícia e mata-pasto, onde o EFMeOH apresentou melhor resultado, 75% e 100%, respectivamente. Quando testadas isoladamente, as substâncias não apresentaram resultados satisfatórios.

O fungo foi submetido à reações de biotransformação, onde mostrou ter potencial na biorredução das duplas ligações da chalcona 3-(2,3,4-trimetoxifenil)-1-(4-metóxi)-2-propen-1-ona e da cetona aromática 4-nitroacetofenona, formando como produto a diidrochalcona 3-(2,3,4-trimetóxifenil)-1-(4-metoxifenil)-fenilpropan-1-ona e o 4-nitrofeniletan-1-ol, respectivamente. Isso demonstra a eficiência do

fungo como biocatalisador em reações de biotransformação, podendo ser utilizado na produção de substâncias com propriedades bioativas.

Foram selecionadas as substâncias **S1**, **S2**, **S3** e **S5** para avaliação da atividade biológica frente a *L. amazonensis* em sua forma promastigota. Como resultados foram obtidos valores CI_{50} acima de 200, indicando que essas substâncias são inativas frente a este parasita, porém não significa que são inativas para a forma amastigota.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. Plant Pathology. 3^a ed. **New York, Academic Press**, 1988.
- AHMAD, V.U.; RAHMAN, A.U. Pentacyclic Triterpenoids, volume 2. **Handbook of Natural Products Data**, 1994.
- ALEXANDER, J.; RUSSEL, D. G. Parasite antigens, their role protection, diagnosis and escape: the Leishmaniasis. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.20, p.43-63, 1985.
- ANDERSON, A. B.; MACDONALD, D. L; FISCHER, H. O. L. The Structure of Pinitol. **Journal of American Chemical Society**, v. 74 (6), p. 1479-1480, 1952.
- ANDRIOLI, W. J. **Otimização das condições de cultivo de *Humicola grisea* var. *thermoidea*, visando produção e isolamento de metabólitos secundários biologicamente ativos**. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto, 2008.
- AZEVEDO, J.L.; MELO, I.S. Microorganismos Endofíticos. Ed. Ecologia Microbiana. **Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente**, p. 117-137, 1998.
- BANERJEE, J.; DATTA, G.; DUITA, C.P.; SOM, U.K. Chemical constituentes de *Nephrolepis tuberosa*. **Journal of the Indian Chemical Society**, v. 65, p. 2-881, 1988.
- BENAGLI, C.; ROSSI, V.; DOLINA, M.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. **PLoS One**, v. 6(1), p. 16424, 2011.
- BERG, M. E. Plantas medicinais da Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2^a ed. Belém: PR/MCT/CNPq – **Museu Paraense Emílio Goeldi**, 1993.
- BLANCO, N.; FLORES, Y.; ALMANZA, G. R. Secondary metabolites from *Senna versicolor*. **Revista Boliviana de Química**, v. 25, nº 1, 2008.
- BOTTARI, F.; MARSILI, A.; MORELLI, I.; PACCHIANI, M. Aliphatic and triterpenoid hydrocarbons from ferns. **Phytochemistry**, v. 11, p. 2519-2523, 1972.
- CARMO, F. M. S.; BORGES, E. E. L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Sociedade Botânica do Brasil**, v. 21(3), p. 697-705, 2007.
- CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, p. 421-437, 2013.

CHEN, C. Y.; CHIU, F.Y.; LIN, Y.; HUANG, W. J.; HSIEH, P. S.; HSU, F. L. Chemical constituents analysis and antidiabetic activity validation of four fern species from Taiwan. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 2497-2516, 2015.

CHO, J. Y.; MOON, J. H.; SEONG, K. Y.; PARK, K. H. Antimicrobial Activity of 4-Hydroxybenzoic acid and trans 4-Hydroxycinnamic acid Isolated and Identified from *Rice Hull*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62(11), p. 6-2273, 2014.

CORRÊA, M. J. C. ***Paspalum maritimum* Trin.: Estudo Químico, Isolamento de Endofíticos, Biotransformações, Sínteses e Atividade Alelopática**. Tese (Doutorado em Química)-UFPA, 2010.

DANTAS, E. P. M. **Prospecção de biocida em plantas amazônicas e exóticas, visando seu uso racional**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-UFPA/UFRA, Belém, 2009.

DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; IZZO, A.; NAPOLI, F.; PURCARO, R.; ZARRELLI, A. Phytotoxicity of Secondary Metabolites from *Aptenia cordifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 4 (2), p. 28- 118, 2007.

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

DUARTE, I. R. M.; ARRUDA, C. C. P; ANDRADE, A. R. O; NUNES, V. L. B; SOUZA, A. I.; DOURADO, D. M; COSTA, S. C. G. Comportamento biológico de *Leishmania (l.) amazonensis* isolada de um gato doméstico (*Felis catus*) de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 39 (1), p. 33-40, 2010.

DUTRA, S.; SOUZA FILHO, A.P.S; MASCARENHAS, R. E. B. Controle integrado das espécies invasoras Assa-peixe e Casadinha em pastagens cultivadas de Paragominas, Nordeste paraense. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1676-5265, 2003.

ECCLES, S. A; ALEXANDER, P. Macrophage content of tumors in relation to metastatic spread and host immune reaction. **Nature**, v. 250 (5468), p. 667-669, 1979.

EL-TANTAWY, M. E.; SHAMS, M. M; AFIFI, M. S. Chemical Composition and Biological Evaluation of the Volatile Constituents from the Aerial Parts of *Nephrolepis exaltata* (L.) and *Nephrolepis cordifolia* (L.) C. Presl Grown in Egypt. **Natural Product Research**, v. 30(10), p. 201-1197, 2016.

ERIDANI, S.; PESSINA, A.; BRAMBILLA, P.; CATTORETTI, G.; MAROCCHI, A.; MOCARELLI, P. Effect of tumor - related factors on the in vivo and in vitro colony-forming ability of normal mouse marrow cells. **Neoplasma**, v. 28, p.541-548, 1981.

FERSTH, A. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. **W. H. Freeman and Company**, p. 381, 1998.

GOLAN, K.; KATARZYNA, R.; DRABIK, E. G. Physiological and biochemical responses of fern *Nephrolepis biserrata* (sw.) schott. to *Coccus hesperidum* I. infestation. **Acta Biologica Cracoviensia**. Series Botanica, v. 55(1), p. 93–98, 2013.

GUBIANI, J. R. **Prospecção química e biológica do fungo endofítico *Camarops sp.* isolado de *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae)**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, 2011.

GUSMAN, G. S.; BITTENCOURT, A. H.; VESTENA, S. Alelopatia de *Baccharis dracunculifolia* DC. sobre a germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas desenvolvimento de espécies cultivadas. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30(2), p. 119-125, 2008.

HANSON, J. R. An introduction to biotransformations in organic chemistry, **Biochemical & Medicinal Chemistry Series**, p. 1-89, 1995.

HOVENKAMP, P. H; MIYAMOTO, F. A. Conspectus of the native and naturalized species of *Nephrolepis* (Nephrolepidaceae) in the world. **BLUMEA**, v. 50, p. 279–322, 2005.

HUANG, S.; LUO, J.; MENG, C.; LI, R. The Total Flavanone of *Nephrolepis cordifolia*(L.) Presl Extraction and the Identification by Ultrasonic Wave. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**, v. 18(1), p. 154-155, 2007.

IBGE. Disponível em: <http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2015>.

KHAN, J.A.; SHARMA R. Assessment of antibacterial properties of the fern *Nephrolepis tuberosa*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 1(10), p. 1524-1529, 2012.

KONGSAEREE, P.; PRABPAI, S.; SRIUBOLMAS, N.; VONGVEIN, C.; WIYAKRUTTA, S. Antimalarial dihydroisocoumarins produced by *Geotricum sp.*, an endophytic fungus of *Crassocephalum crepioides*. **Jornal Products**, v. 66, p. 709-711, 2003.

KOZLOSKI G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Editora UFSM, 140p, 2002.

LABAUNE, J. P.; MOREAU, J. P.; BYRNE, R. Comparative physiological disposition of two nitrofurant antimicrobial agents. **Biopharmaceutics and Drug Disposition**, v. 7 (5), p. 431-441, 1986.

LARSON, R. A. Naturally Occurring Antioxidants. **Lewis Publishers: New York**, p.1, 1997.

LEE, J. S.; JUNG, I. D.; JEONG, Y. I. D-Pinitol inhibits Th1 Polarization via the suppression of dendritic cells. **International Immunopharmacology**, v.7, p. 791-804, 2007.

LÉON, R.; FERNADES, P.; PINHEIRO, H. M.; CABRAL, J. M. S.; **Enzyme Microb. Technol**, v. 23, p. 483, 1998.

LIANG, Z.; YANG, X.; ZHU, H.; HAO, X. Chemical constituents of *Nephrolepis cordifolia*. **Guangxi Zhiwu**, v. 28, p. 420-421, 2008.

LIEBLER, G. D. The sugar Contained in the Bulbs of *Nephrolepis hirsutula* **Presl. Ber. Bot Ges.**, v. 29, p. 375-80, 1911.

LORENZI, H.; SOUZA, M. S. Plantas Ornamentais en Brasil: arbustivas, herbáceas, trepadoras. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 1088, 2001.

MACIEL, S. *Nephrolepis* (Lomariopsidaceae - Polypodiopsida) in the Brazilian Amazon. **Rodriguésia**, v. 67(1), 2016.

MACIEL, S.; PIETROBOM, M. R. *Dryopteridaceae* and *Lomariopsidaceae* (Polypodiopsida) from Embrapa's Eastern Amazonia Field Station, Moju, Pará, Brazil. **Rodriguésia**, v. 61(3), p. 405-414, 2010.

MARINHO, A. M. R.; MARINHO, P. S. B.; RODRIGUES FILHO, E. Constituintes Químicos de *Penicillium sp.*, um Fungo Endofítico isolado de *Murraya paniculata* (Rutaceae). **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 9(2), p. 189-199, 2007.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmaniose Tegumentar no Brasil. In: Grandes Endemias Brasileiras, **Editora Universidade de Brasília**, 1989.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. F. B. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 10, p. 359-375, 1994.

MOTA, E.F.; ROSARIO, D.M.; VEIGA, A.S.S.; BRASIL, D.S.; SILVEIRA, F.T.; DOLABELA, M.F. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzch. **Pharmacognosy Magazine**, v. 43, p. 601-606, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.

NGURE, P.K.; TONU, W.K.; INGONGA, J.; MUTAI, C.; KIGONDU, E.; NG'ANG'A, Z.; RUKUNGA, G.; KIMUTAI, A. In vitro antileishmanial activity of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae), a Kenyan medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.3, n.2, p.61-66, 2009.

PAULA, M. A.; REIS, V. M.; DOBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infections of sweet potato (*Ipomea batata*), sugar cane (*Sccharum spp.*) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, v.11, p. 111-115, 1991.

PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniasis in Biology and Medicine, **Academic Press Inc.**, London, v.1, 1987.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v. 1, p. 185-196, 1992.

PEUNGVICHA, P.; TEMSIRIRIRKKUL, R.; PRASAIN, J.K.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S.; THIRAWARAPAN, S. S.; WATANABE H. 4-Hydroxybenzoic acid: a hypoglycemic constituent of aqueous extract of *Pandanus odoratus* root. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, p. 79-84, 1998.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

REIGOS, M. J.; MALVIDO, E. P. Phytotoxic effects of 21 plant secondary metabolites on *Arabidopsis thaliana* germination and root growth. **Journal Chemical Ecology**, v.33, p.1456-1466, 2007.

RICE, E. L., Allelopathy. **Academic Press**, 2nd ed., New York 1984.

MOLISCH, H. Der Einfluss einer Pflanze auf die Andere, Allelopathie. *Nature*, v.141, p. 493, 1938.

RICHARDSON, P. M. C-Glycosylxanthones in the fern genera *Davallia*, *Humata* and *Nephrolepis*. **Phytochemistry**, v. 22, p. 309-311, 1983.

SAMPAIO, A. J. Eufilicíneas do Rio Cuminá. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 32, p. 8-60, 1930.

SANTOS, V. S. Protozoários. Brasil Escola. Disponível em <http://brasilecola.uol.com.br/biologia/protozoarios.htm>. Acesso em 22 de agosto de 2016.

SEHNEM, A. *Davaliáceas*. In: Reitz, R. (ed.). Flora Ilustrada Catarinense. **Herbário Barbosa Rodrigues**, Itajaí. p. 20, 1979.

SHAH, M. D.; YONG, Y. S.; IQBAL, M. Phytochemical investigation and free radical scavenging activities of essential oil, metanol extract and metanol fractions of *Nephrolepis biserrata*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v.6(9), p. 269, 2014.

SIEMS, K.; WEIGT, F.; WOLLENWEBER, E. Drimanes from the epicuticular wax of the fern *Nephrolepis biserrata*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1119-1121, 1996.

SILVA, E. A. S.; LOBO, L. T.; SILVA, G. A.; SOUZA FILHO, A. P. S.; SILVA, M. N.; ARRUDA, A. C.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, L. S.; ARRUDA, M. S. P. Flavonoids from of *Derris urucu*: assessment of potential effects on seed germination and development of weeds. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 85(3), p.881-889, 2013.

SILVA, E. O. **Otimização das condições de cultivo e investigação das atividades citotóxica e antimicrobiana de metabólitos secundários do fungo endofítico *Drechslera ravenelli***. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2010.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. C.; CONCEIÇÃO, S. R.; KUSTER, R. M.; OLIVEIRA FILHO, A. M. Produtos Naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de Terpenóides e Fenilpropanóides, **Química Nova**, v. 27(1), p. 46-49, 2004.

SMITH, A. R.; PRYER, K. M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H.; WOLF, P. G. A classification for extant ferns. **Taxon**. v. 55(3), p. 705-731, 2006.

SINGH, R. K.; PANDEY, B. L.; TRIPATHI, M.; PANDEY, V. B. Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. **Fitoterapia**, v. 72, p. 70-168, 2001.

SOCOLSKY, C.; SALVATORE, A.; ASKAWA, Y.; BARDÓN A. Bioactive new bitter-tasting *p*-hydroxystyrene glycoside and other constituents from the fern *Elaphoglossum spathulatum*. **Arkivoc**, p. 347-355, 2003.

SOUZA, M. V. N. Novos Produtos Naturais capazes de atuar na estabilização de Microtúbulos, um importante alvo no combate ao Câncer. **Química Nova**, v. 27(2), p. 308-312, 2004.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, A. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazonica**, v. 34(2), p. 185-195, 2004.

SOUZA FILHO, A. P. S.; BORGES, F. C.; SANTOS, L. S. Análise comparativa dos efeitos alelopáticos das substâncias químicas tironina e tironina acetilada, **Planta Daninha**, v. 24(2), p. 209-210, 2006.

SOUZA FILHO, A. P. S.; MOURÃO JÚNIOR, M. Padrão de resposta de *Mimosa pudica* e *Senna obtusifolia* à atividade potencialmente alelopática de espécies de Poaceae. **Planta Daninha**, v. 28, p. 927-936, 2010.

SUKANTHA T. A.; SHUBASHINI K. S. Isolation and characterization of secondary metabolites from original article *Pithecellobium dulce* benth fruit peel. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7(11), 2015.

SUKUMARAN, K.; KUTTAN, R. Screening of 11 ferns for cytotoxic and antitumor potential with special reference to *Pityrogramma calomelanos*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, p. 93-96, 1991.

SUN, M.; WANG, T. Traditional Chinese herbal extracts containing sequoyitol for preventing and complications. **Faming Zhuanli Shenqing**, p. 22, 2007.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

TIEH, J.; CHANG, T. The chemical constituents of *Nephrolepis auriculata* (L.) trimen. **Journal of the Chinese Chemical Society** (Taipei, Taiwan), v. 27, p. 17-113, 1980.

VEIGA, A.S.S. **Atividade antileishmania de plantas Amazônicas**. 2013. 150 f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas na área de fármacos e medicamentos) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

VELLOSA, J. C. R.; BARBOSA, V. F.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Pesquisa de Produtos Naturais: Plantas e Radicais Livres. **Revista Eletrônica de Farmácia** - ISSN 1808-0804, v. 4(2), p. 119-130, 2007.

VEZINA, C. Biotransformation. In: Basic Biotechnology. Bu'lock, J. and Kristiansen, B. (eds). **Academic Press**, p. 463-482, 1987.

VIEGAS J. R. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29(2), p. 326-337, 2006.

VIEGAS J. R. C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Produtos Naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27(4), p. 655-660, 2004.

VILHENA, K.S.S.; GUILHON, G.M.S.P.; ZOGBI, M.G.B.; SANTOS, L.S.; SOUZA FILHO, A.P.S. Chemical investigation of *Cyperus distans* L. and inhibition activity of scabequinone in seed germination and seedling growth bioassays. **Natural Product Research**, v. 28(23), p. 2128-2133, 2014.

XAVIER, S. R. S.; BARROS, I. C. L. Pteridoflora e seus aspectos ecológicos ocorrentes no Parque Ecológico João Vasconcelos Sobrinho, Caruaru, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasil**, v.19, nº 4, p. 775-781, 2005.

XIN, Z. H.; TIAN, L.; ZHU, T. J.; WANG, W. L.; FANG, L. D. Y. C.; GU, Q. Q.; ZHU, W. M. Isocoumarin Derivatives from the Sea Squirt-derived Fungus *Penicillium stoloniferum* QY2-10 and the Halotolerant Fungus *Penicillium notatum* B-52. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30(7), p. 816-819, 2007.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da Indústria de Fitoterápicos e Fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24(1), p. 147-152, 2001.

ZIKMUNDOVA, M.; DRANDAROV, K.; BIGLER, L.; HESSE, M.; WERNER, C. Biotransformation of 2-benzoxazoline and 2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-one by fungi isolated from *Aphelandra tetragona*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4863-4870, 2002.