



Universidade do Estado do Amazonas
Escola Normal Superior
Trabalho de Conclusão de Curso

**PROSPECÇÃO DE NAFTOQUINONAS EM CULTURAS DE *Quambalaria* sp. E SUA
AVALIAÇÃO COMO AGENTE CITOTÓXICO**

Manaus -AM

2021

Débora de Sena Raposo
Universidade do Estado do Amazonas
Escola Normal Superior

**PROSPECÇÃO DE NAFTOQUINONAS EM CULTURAS DE *Quambalaria* sp. E SUA
AVALIAÇÃO COMO AGENTE CITOTÓXICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
coordenação do curso Ciências Biológicas da
Universidade do Estado do Amazonas para
obtenção do título de Licenciatura em Ciências
Biológicas.

Orientador

Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen

Coorientador

Dr. Raimundo Sousa Lima Júnior

Manaus -AM

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

R219 Raposo, Débora de Sena
 Prospecção de naftoquinonas em culturas de
 Quambalaria sp. e sua avaliação como agente citotóxico /
 Débora de Sena Raposo. Manaus : [s.n], 2021.
 40 f.: color.; 30 cm.

 TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura
 - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.
 Inclui bibliografia
 Orientador: Hector Henrique Ferreira Koolen
 Coorientador: Raimundo Sousa Lima Júnior

 1. Quambalaria sp.. 2. naftoquinonas. 3.
 quambalarina B. 4. citotoxicidade. I. Hector Henrique
 Ferreira Koolen (Orient.). II. Raimundo Sousa Lima
 Júnior (Coorient.). III. Universidade do Estado do
 Amazonas. IV. Prospecção de naftoquinonas em culturas
 de Quambalaria sp. e sua avaliação como agente citotóxico

À minha mãe, à minha vó Enir e a minha
tia Nair que sempre estiveram ao meu
lado, me incentivando e acreditando no
meu potencial.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por possibilitar a minha jornada, me dá forças nos dias mais difíceis e não me deixar desistir.

Agradeço a minha mãe, que me criou, apoiou e dedicou grande parte de sua vida a mim, sendo minha maior incentivadora.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Hector Koolen, por me orientar da melhor maneira, acreditar no meu potencial e me motivar a conquistar as minhas metas.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Raimundo Júnior, por me orientar, acompanhar durante a jornada de trabalho e por todos os ensinamentos.

Agradeço ao grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas da Universidade do Estado do Amazonas e ao Grupo de Pesquisa em Imunofarmacologia da Escola Normal Superior pela parceria, pelos ensinamentos e por todo apoio durante a realização da pesquisa.

Agradeço a todos os professores do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Escola Normal Superior, os quais tiveram grande contribuição não só em minha formação profissional, mas também em minha formação como ser humano. Eles ensinaram-me a ver o mundo e as pessoas, ou seja, todas as formas de vida, de forma bonita e com admiração, e foram grandes motivadores durante meu percurso acadêmico. Obrigada, principalmente, a Dra. Larissa Kirsch, ao Dr. Leandro Barreto e ao Dr. Marcelo Rocha.

Agradeço a todos os meus amigos e familiares que me acompanharam e estiveram sempre ao meu lado.

E a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para minha conquista.

Muito obrigada.

“Não podemos esquecer que quando o [elemento] rádio foi descoberto, ninguém sabia que ele seria útil em hospitais [para tratar câncer]. Era um trabalho de ciência pura, e isso é prova de que um trabalho científico não deve ser avaliado do ponto de vista de sua utilidade direta. Ele precisa ser feito por si só, pela beleza da ciência. ”

Marie Curie (1867-1934)

RESUMO

A manipulação e a manutenção de fungos endofíticos em laboratório propicia o desenvolvimento de novas drogas de maneira viável, tanto em aspectos econômicos como ecológicos, uma vez que não há necessidade do uso de plântulas. O fungo endofítico isolado do fruto da palmeira conhecida, popularmente, como açai-da-amazônia (*Euterpe precatoria*), *Quambalaria* sp., é produtor de naftoquinonas com atividades biológicas, sendo elas quambalarina A, mompaína e quambalarina B, as quais, demonstram atividade antimicrobiana, e a última, além desta, apresenta atividade antitumoral. Visto o potencial biotecnológico, o objetivo do trabalho consiste em prospectar e caracterizar naftoquinonas, além de avaliar sua bioatividade como agente citotóxico. Sendo assim, o *Quambalaria* sp. foi submetido a técnica de OSMAC, a qual consistiu na utilização de diferentes meios de cultura. Os cultivos selecionados foram extraídos com solvente orgânico e analisados pela técnica de Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas. Após análise, as naftoquinonas foram caracterizadas e o extrato testado quanto a sua citotoxicidade frente a linhagem de células hepáticas Huh-7. O fungo teve melhor crescimento e produção de naftoquinonas em meio de cultura líquido BD controle, apresentando na sua composição a naftoquinona quambalarina B, sendo o extrato não citotóxico a células Huh-7 nas concentrações 50 µg/ml, 10 µg/ml e 1 µg/ml.

Palavras-chave: *Quambalaria* sp.; naftoquinonas; quambalarina B; citotoxicidade.

ABSTRACT

The manipulation and keeping of endophytic fungus in laboratory propitiates the development of new drugs in viable way, as aspects economics than ecological, once there is not necessity of seedlings use. The endophytic fungi isolated by palm tree fruit, popularly known as açai-da-amazônia (*Euterpe precatória*), denominated *Quambalaria* sp., is naphthoquinone producer with biologics activities, being them quambalarine A, mompain and quambalarine B, them demonstrated antimicrobial activity along with other anticancer activity. Seeing that biotechnology activity, this study aims to prospect and characterize naphthoquinones, further evaluate the cytotoxic activity. Therefore, the *Quambalaria* sp. submitted by OSMAC technique, wich consisted in the use of different mediums culture. The choose mediums culture were extracted with organic solvents and this analyzed by the HPLC/MS method. After analysis, naphthoquinones were characterize and tested extract in cells hepatics (Huh-7) cytotoxicity activity. The fungi had better growth and naphthoquinones production in culture medium control PD (Potato Dextrose), exhibited in extract non-cytotoxic for hepatics cells in the concentrations 50 µg/ml, 10 µg/ml and 1 µg/ml.

Keywords: *Quambalaria* sp., naphthoquinones; quambalarine B; cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura química da Lovastatina	14
Fluxograma 1 - Meios de cultura controle e teste	19
Gráfico 1 - Citotoxicidade do Extrato da <i>Quambalaria</i> sp.	30
Figura 2 - <i>Quambalaria</i> sp.	15
Figura 3 – Mompáina	15
Figura 4 - Quambalarina A	15
Figura 5 - Quambalarina B	15
Figura 6 - Estrutura química das Quinonas	16
Figura 7 - <i>Quambalaria</i> sp., cultivado respectivamente em Meio BD controle, Meio BD + 5-azacitidina, Meio BD + HBr e Meio BD + NaCl	22
Figura 8 - <i>Quambalaria</i> sp., cultivado respectivamente em Meio Sabouraud controle, Meio Sabouraud + 5- azacitidina, Meio Sabouraud + HBr e Meio Sabouraud + NaCl	23
Figura 9 - <i>Quambalaria</i> sp., cultivado respectivamente em Meio CZAPEK controle, Meio CZAPEK + 5 – azacitidina, Meio CZAPEK + HBr e Meio CZAPEK + NaCl	23
Figura 10 - <i>Quambalaria</i> sp., cultivado respectivamente em Meio ISP2 controle, Meio ISP2 + 5- azacitidina, Meio ISP2 + HBr e Meio ISP2 + NaCl	24
Figura 11 - <i>Quambalaria</i> sp., cultivado respectivamente em Meio extrato de carne controle, Meio extrato de carne + 5 – azacitidina, Meio extrato de carne + NaCl e Meio extrato de carne + sulfato de cobre	24
Figura 12 - <i>Quambalaria</i> sp., cultivado respectivamente em Meio sucrilhos controle, Meio sucrilhos + 5- azacitidina, Meio sucrilhos + HBr e Meio sucrilhos + NaCl	25
Figura 13 - Cromatogramas em meios de cultura Sabouraud controle e testes	27
Figura 14 – Cromatogramas em meios de cultura BD controle e testes	28
Figura 15 - Quambalarina B (<i>m/z</i> 319.0824; M-H)	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - pH inicial dos meios de cultura sem xenobióticos.....	26
Tabela 2 - Rendimentos dos extratos em meios Sabouraud e BD	27
Tabela 3 - Citotoxicidade celular do extrato do <i>Quambalaria</i> sp. em Huh-7 durante 48 h	31

LISTA DE ABREVIACOES

BDA - gar batata dextrose

DENV – Dengue vírus

DMSO – Dimetilsufoxido

DMEM – (do inglês Dulbecco`s modified Eagle`s médium)

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática ou Ensaio Imunoenzimático (do inglês: Enzyme-linked Immunossorbent Assay)

Huh-7 – Linhagem celular de hepatocarcinoma humano (do inglês: hepatocarcinoma cell line)

IL-8 – Interleucina-8

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

MIF - Fator Inibitório de migração de Macrófagos (do inglês: Factor Macrophage Migration Inhibitor).

MTT – (do inglês: 3-(4,5-dimethylthiazol-. 2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

OSMAC – (do inglês One strain many compounds)

PBS – (do inglês Phosphate- buffered saline)

SFB – Soro fetal bovino

SUMÁRIO

	Págs
1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Fungos endofíticos	12
1.2. Metabólitos secundários	13
1.3. Basidiomiceto <i>Quambalaria</i> sp.	14
1.4. Aplicação biotecnológica do grupo quinonas	16
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Geral	18
3.2. Específicos	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Reativação e cultivo da <i>Quambalaria</i> sp.	18
4.2. Obtenção de extrato da <i>Quambalaria</i> sp.	18
4.3. Análise por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas	20
4.4. Avaliação da viabilidade celular	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5.1. Análise da cepa da <i>Quambalaria</i> sp. a submetida a testes OSMAC (one strain-many compounds)	21
5.2. Análise dos extratos por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas	26
5.3. Caracterização das naftoquinonas provenientes do cultivo em meio líquido BD (Batata- Dextrose)	28
5.4. Atividade citotóxica do extrato bruto na linhagem de hepatócitos - Huh-7	30
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
8. APÊNDICE	39
9. ANEXO	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fungos endofíticos

O reino Fungi é composto por seres vivos eucarióticos, podendo ter integrantes uninucleados, como as leveduras, ou multinucleados, como os bolores e cogumelos (Takahashi *et al.*, 2017). Diversos fungos são caracterizados devido suas interações fundamentais à natureza, entre elas, a associação mutualista com raízes denominada micorrizas e a degradação de lignina, tendo este último um papel fundamental na reciclagem de nutrientes (Souza *et al.*, 2008). Microrganismos colonizam os mais diversos habitats, podendo ser encontrados em troncos de árvores, de forma macroscópica, como, por exemplo, o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* ou no interior de plantas, de forma microscópica, sem ao menos causar danos aparentes. Estes fungos encontrados no interior das plantas são denominados fungos endofíticos, podendo ser representados pelos gêneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, entre outros. (Peixoto-Neto *et al.*, 2003; Muvea *et al.*, 2014).

Os fungos endofíticos possuem diversos mecanismos de entrada na planta hospedeira, colonizando-as através de suas folhas, estômatos ou por suas raízes, onde a interação depende das condições bióticas específicas da hospedeira e do hóspede. Apesar de não apresentarem especificidade de hospedeiro, certas linhagens aparecem com maior frequência em famílias particulares, portanto, denotam a preferência a determinado hospedeiro (Cannon e Simmons, 2002; Arnold, 2007). Nas interações simbióticas podem induzir a produção de metabólitos secundários existentes na planta, de forma a auxiliar em seu crescimento com a produção de fitohormônios. Além disso, podem produzir especificamente, metabólitos secundários ativos atuantes na defesa da hospedeira contra patógenos e também herbivoria (De Araujo, 1996; Rodrigues e Dias Filho, 1996; Pereira, 1993).

Além de possuírem caráter de extrema importância em nível ecológico, fungos endofíticos estão diretamente relacionados aos seres humanos, atuando como biossintetizantes de moléculas bioativas com as mais diversas propriedades farmacológicas (Costa *et al.*, 2012; Specian *et al.*, 2014; Paul *et al.*, 2014). Como exemplos, o ascomiceto *Aspergillus terreus* de onde foi descoberto o fármaco lovastatina atuante na redução de colesterol (Singh e Pelaez, 2008), o ascomiceto *Fusarium oxysporum*, residente na hospedeira *Catharanthus roseus*, promissor produtor do fármaco antitumoral vincristina (Aly *et al.*, 2011), o fungo *Taxomyces andreanae* biossintetizador da molécula taxol, atuante como poderoso quimioterápico (Strobel e Daisy, 2003), o endofítico *Phomopsis* sp. atuante na produção da lactona policetídeo, fomol,

que tem potencial antiinflamatório, antifúngico e antibacteriano. Além destes exemplos, outros fungos são fontes de diversos fármacos, tais como os antibióticos da classe das penicilinas e cefalosporinas e também imunossupressores como a ciclosporina e rapamicina (Cragg e Newman, 2005).

1.2. Metabólitos secundários

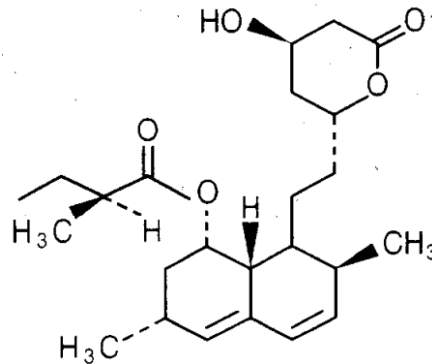
Metabólitos secundários não são necessários para a sobrevivência do indivíduo, porém participam ativamente nas adaptações das espécies em diferentes ambientes. Estes possuem baixo peso molecular e estrutura heterogênea, sendo capazes de serem sintetizados por diversos microrganismos, de forma altamente complexa, podendo atuar como responsáveis na defesa do indivíduo e proteger seu habitat inibindo predações e competições (Joel e Bhimba, 2013).

A produção dos metabólitos secundários é possibilitada devido à grande quantidade de cluster de genes, ou seja, agrupamento de genes. O cluster é caracterizado por possuir genes com porções de sequência de DNA idênticas, porém capazes de produzir proteínas distintas. Estas múltiplas proteínas produzidas respondem a estímulos ambientais, incluindo temperatura, pH e condições de hipóxia, fornecendo diferentes respostas de acordo com a espécie e as condições atribuídas a ela, portanto atuando ativamente na biossíntese desses metabólitos (Brakhage, 2013)

Estudos recentes com fungos endofíticos vêm empregando técnicas que permitem a indução de desvios no metabolismo secundário. Uma das vertentes é denominada método OSMAC, a qual consiste em cultivar uma determinada espécie de microrganismo variando-se algumas condições de incubação, portanto aumentando ou diminuindo a produção metabólica conforme a espécie em estudo. Entre os diversos parâmetros que podem ser utilizados estão a alteração da composição e aeração do meio de cultura, o período de cultivo, temperatura, pH, adição de xenobióticos, e o co-cultivo (Bode *et al.*, 2002).

Atualmente há grande utilização de metabólitos secundários na produção de fármacos. É comprovado que muitas das substâncias químicas produzidas têm potencial bioativo atuando contra diversas doenças infecciosas, como, por exemplo a substância com potencial antibiótico, denominada penicilina, biossintetizada pelo fungo *Penicillium chrysogenum* e a lovastatina (Figura 1.), substância com potencial redutor de colesterol LDL, isolada do fungo *Aspergillus terreus* (Brakhage, 2013).

Figura 1. Estrutura química da Lovastatina



Fonte: Alberts, 1988.

1.3. O basidiomiceto *Quambalaria* sp.

Taxonomicamente, o gênero *Quambalaria* está inserido na classe Ustilaginomycetes, ordem Microstromatales, pertencente ao Filo Basidiomycota (Hoog e Vries, 1973; Gomes e Pena, 2016). Os Ustilaginomycetes compreendem mais de 1300 espécies ao redor do mundo, majoritariamente dimórficas, produzindo fase de levedura ou células leveduriformes durante sua vida. O brotamento característico da fase de levedura classifica o gênero *Quambalaria* dentro da ordem Microstromatales, uma vez que esta não possui baliistoconídios e pseudomicélios (McLaughlin *et al.* 2001).

O gênero *Quambalaria* é classificado como anamorfo, onde somente sua reprodução assexuada é conhecida. Esta é caracterizada, enquanto fase hifal, por um grupo de conídios e conidióforos com septos visíveis e com posterior brotamento de conídios secundários (Amin *et al.*, 2010). Macroscopicamente o gênero é caracterizado pela produção de diferentes pigmentos, encontrando-se cinco espécies sendo elas, *Q. pitereka*, *Q. eucalypti*, *Q. coyrecup*, *Q. pusilla* e *Q. cyanescens* (Paap *et al.*, 2006).

As espécies foram descritas em uma gama de nichos ecológicos estando presentes no ar, em material vegetal, no solo e até mesmo em insetos (Hoog e Vries, 1973; Abdel-Sater *et al.*, 2016). Em sua maioria são patógenos de plantas, principalmente plantas pertencentes ao gênero *Eucalyptus*, (Tambini *et al.*, 1996), porém, podem ser encontrados como endofíticos (Padhi e Tayung, 2013), hábito raro quando se fala em basidiomicetos, devido a maioria dos fungos endofíticos serem representantes do filo Ascomycota (Arnold, 2007).

No Brasil, estudos com espécies de *Quambalaria* geralmente estão relacionados com a mancha foliar e anelamento de haste em plantas do gênero *Eucalyptus*. Como exemplo, estudos

realizados na região centro-oeste por Alfenas *et al.*, (2001), Andrade *et al.*, (2007) e na região norte por Gomes e Pena, 2016. Sendo assim, pouco se sabe em relação a interação endofítica com a planta hospedeira e a bioatividade de metabólitos secundários de representantes deste grupo. Pesquisas relacionadas ao metabolismo secundário da *Quambalaria* spp. são realizados, majoritariamente, por pesquisadores de outros lugares do mundo, como Amin *et al.*, (2010) que demonstrou atividade antimicrobiana proveniente de *Quambalaria* sp. endofítico da planta *Leptospermum junipae* presente na Austrália.

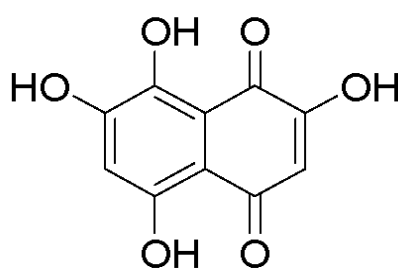
Recentemente, uma espécie foi isolada do fruto do açaí-da-amazônia, *Euterpe precatoria* (Raposo *et al.*, 2019). Através do extrato bruto obtido destas cepas endofíticas isoladas, metabólitos secundários foram detectados exibindo potente atividade antimicrobiana contra vários patógenos humanos e vegetais (Amin *et al.*, 2010; Padhi e Tayung, 2013). Os principais metabólitos secundários bioativos são classificados como naftoquinonas, denominados mompaína (Figura 2.), quambalarinas A e B (Figura 3; Figura 4.), onde destaca-se o potencial antifúngico das quambalarinas, além do potencial antitumoral da quambalarina B (Stodulková *et al.*, 2015).

Figura 2. *Quambalaria* sp.



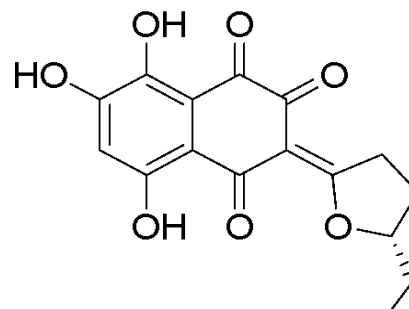
Fonte: Raposo, 2018.

Figura 3. Mompaína



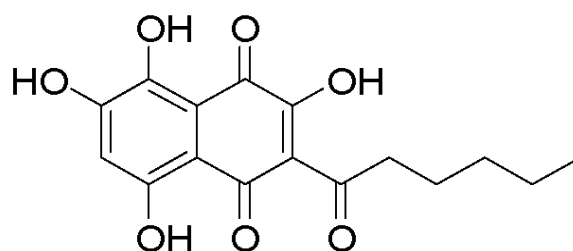
Fonte: Raposo, 2018.

Figura 4. Quambalarina A



Fonte: Raposo, 2018.

Figura 5. Quambalarina B



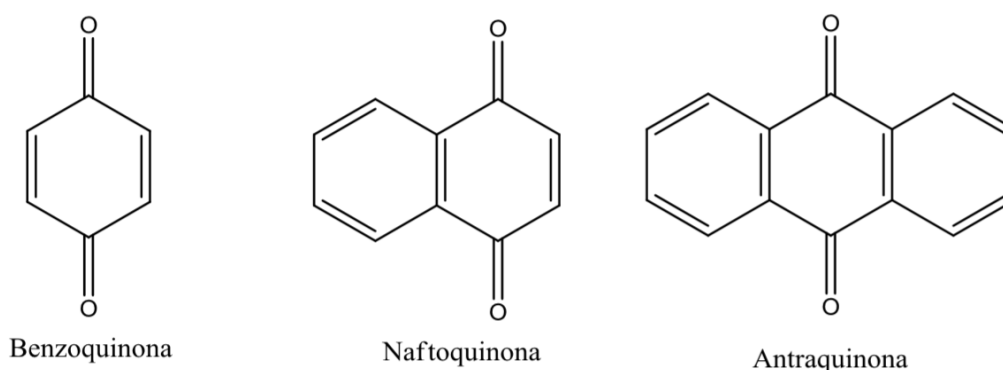
Fonte: Raposo, 2018.

1.4. Aplicabilidade biotecnológica do grupo das quinonas

As quinonas apresentam uma variada subclasse de poliketídeos com ampla distribuição natural. Estas são sintetizadas pelo metabolismo primário de diversos organismos vivos, como exemplos artrópodes, vegetais e algas, atuando em processos bioquímicos vitais, principalmente na fotossíntese e na cadeia respiratória, como também em metabolismo secundários, onde muitas substâncias geradas se destacam devido ao potencial bioativo (Harborne, 1998; Barreiro, 1996).

O grupo quinonas (Figura 6.) é caracterizado por um anel quinônico e subdivido de acordo com o tipo de sistema aromático que o sustenta. Portanto, o grupo é composto por benzoquinonas, quinonas que possuem um anel benzênico, naftoquinonas, quinonas que possuem um anel naftalênico e antraquinonas, quinonas que possuem um anel antracênico linear ou angular. Devido a decorrência de diversos arranjos quinonoídicos dentro dos subgrupos, ou seja, isomeria, o mesmo tipo de anel, dependendo da posição de suas carbonilas, pode gerar diferentes quinonas, onde não diferem somente em sua conformação, mas também em suas propriedades físicas, químicas e quanto à sua atuação biológica (Da Silva et al., 2003).

Figura 6. Estrutura química das Quinonas



Fonte: Severiano e Furtado, 2016.

Benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas caracterizam um grande número de metabólitos com aplicações práticas bastante reconhecidas, sendo grande maioria produzida por organismos vivos, entre elas a naftoquinona lausona, extraída das folhas de *Lawsonia inermis*, utilizada como corante natural para cabelo e corpo (Severiano e Furtado, 2016), as naftoquinonas alcanina e shiconina, utilizadas pela indústria farmacêutica, têxtil e cosmética

como corantes, sendo extraídas das raízes de *Arnebia densiflora* (Fournet *et al.*, 1993), a antraquinona antraciclina, produzida por actinobactérias do gênero *Streptomyces*, a qual possui atividade antimicrobiana (Da Silva *et al.*, 2003) e a molécula 6-hidroxi-astropaquinona B produzida pelo fungo endofítico da *Rhizophora mucronata*, *Fusarium napiforme*, a qual apresentou atividade antimicrobiana (Supratman *et al.*,2019).

Além dos diferentes arranjos quinonoídicos das moléculas pertencentes ao grupo, a sua biodinamicidade, ou seja, a reatividade em células de diferentes linhagens também é um importante fator responsável por diversos interesses farmacológicos atribuídos a estas. As quinonas são moléculas neutras que sofrem reações de protonação com dificuldade, apresentando-se, portanto, como oxidantes e eletrofílicas. Estas propriedades conferem, geralmente, potencial citotóxico para diversas linhagens celulares, devido permitir as moléculas a participarem de reações do ciclo redox e reações de Michael (Sousa *et al.*, 2016)

Tais reações são capazes de induzir, respectivamente, a formação de peróxido de hidrogênio e interações com grupos nucleofílicos em organismos vivos, onde ambos ocasionam apoptose celular (Sousa *et al.*, 2016). Como exemplo desses mecanismos, pode-se citar a naftoquinona β - lapachona, extraída de folhas de plantas do gênero *Handroanthus*, a qual possui atividade antitumoral, sobretudo em linhagens de células de tumores de próstata e de mama (Da Silva *et al.*, 2003), além da antraquinona aloe-emodina extraída de folhas de *Aloe vera* L., atuante em diversas linhagens de células tumorais (Pecere *et al.*, 2000).

2. JUSTIFICATIVA

Fungos endofíticos possuem um grande potencial biotecnológico, visto que muitos são fontes de substância antimicrobiana, antitumoral, antibióticas, entre outras. A produção de fármacos através de substâncias advindas de microrganismos evita a destruição de plântulas em busca de bioativos, auxiliando na manutenção florestal, além de ser uma nova e econômica alternativa, uma vez que há maiores possibilidades de manipulação genética e indução de desvio metabólico *in vitro*.

Quambalaria sp., isolada da *Euterpe precatória* (Arecaceae), é um exemplar fúngico produtor de naftoquinonas, entre elas a mompaína, quambalarinas A e B, sendo importantes bioativos, principalmente antitumorais, assim como outros representantes desta classe de compostos químicos. Portanto, é de extrema necessidade a prospecção e caracterização destas naftoquinonas, a fim de se avaliar as bioatividades frente à ensaio de citotoxicidade, para possíveis utilizações na indústria farmacêutica.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Caracterizar quimicamente e avaliar o caráter citotóxico das naftoquinonas provenientes da cepa de *Quambalaria* sp. isolada do fruto do açai-da-amazônia (*Euterpe precatoria*).

3.2. Específicos

- Realizar testes OSMAC com o cultivo de *Quambalaria* sp. em diferentes meios de cultura;
- Avaliar a influência de xenobióticos no crescimento fúngico e na produção de naftoquinonas;
- Caracterizar as naftoquinonas, dos cultivos modelos selecionados, através da técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas;
- Avaliar a citotoxicidade das naftoquinonas presentes no extrato do cultivo fúngico previamente selecionado.

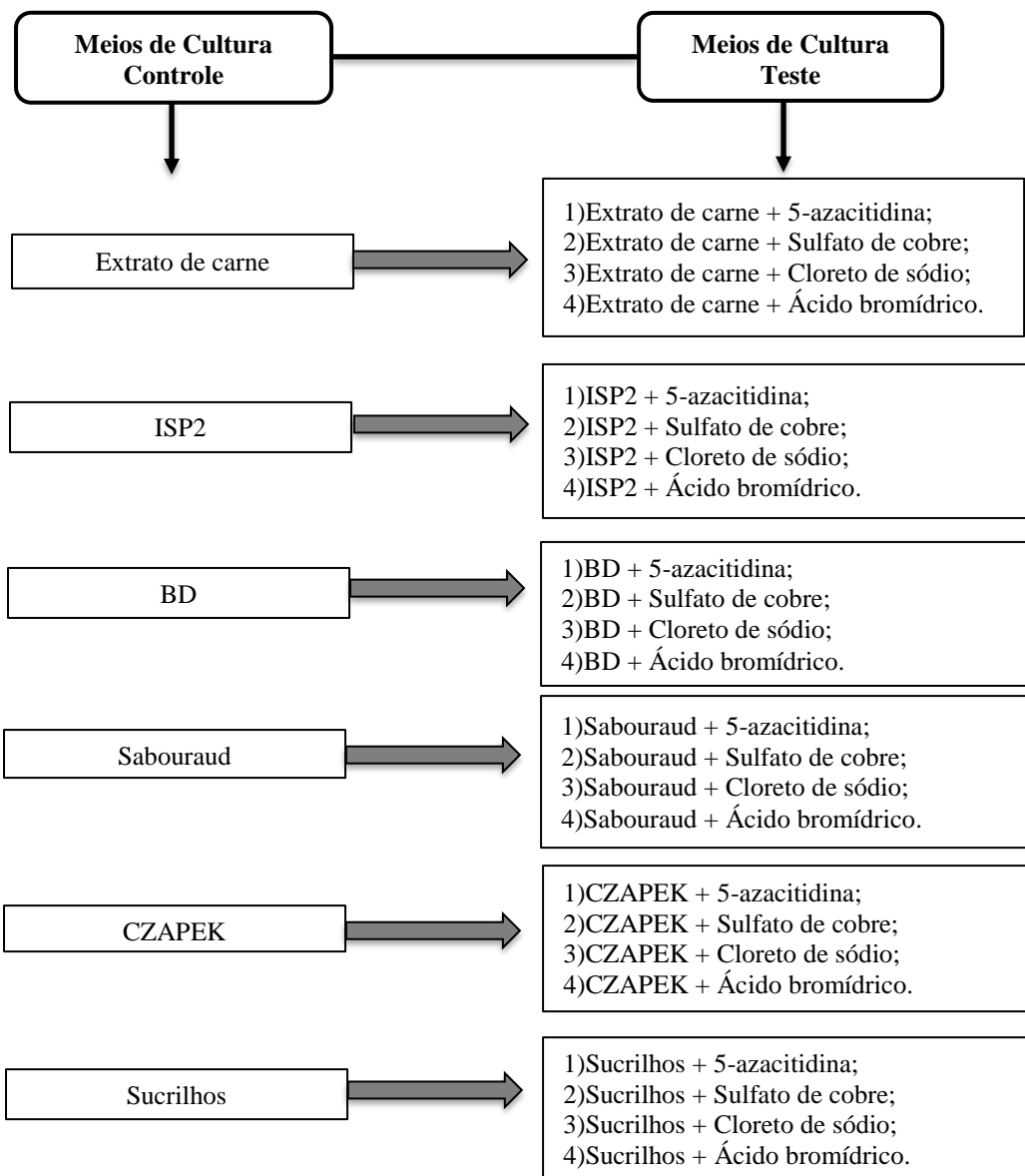
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reativação e cultivo da *Quambalaria* sp.

O fungo *Quambalaria* sp. preservado pela metodologia de Castellani (De Capriles *et al.*, 1989), proveniente da Coleção de microrganismos do Grupo de Pesquisa em Metabolômica e Espectrometria de Massas da Universidade do Estado do Amazonas, foi reativado em meio de cultura BDA, incubado por 21 dias a 28 °C, posteriormente inoculado, e sujeito a técnica de OSMAC.

A técnica de OSMAC consistiu em cultivar um fragmento de micélio em diferentes meios de cultura líquidos, sendo o total de seis meios controle e vinte quatro meios teste. Para cada um dos seis meios de cultura controle, quatro meios de cultura teste eram equivalentes, pois a variação consistiu apenas em adicionar diferentes xenobióticos: 5-azacitidina (Yu *et al.*, 2019); sulfato de cobre (Fill *et al.*, 2016); cloreto de sódio (Boonyapranai *et al.*, 2008); ácido bromídrico (De Medeiros *et al.*, 2015) (Fluxograma 1). O cultivo foi realizado em duplicata para cada um dos meios de cultura, controle e teste, em Erlenmeyer de 500 ml contendo 200 ml de meio.

Fluxograma 1. Meios de cultura controle e teste



Fonte: Raposo, 2019.

A fermentação foi realizada em incubadora sem agitação a temperatura de 28 °C por 21 dias, onde foram analisados o crescimento fúngico e os extrólitos excretados no meio de cultura.

4.2. Obtenção de extrato da *Quambalaria* sp.

Os cultivos em meios Sabouraud (controle e testes) e BD (controle e testes) foram filtrados em câmara asséptica e separados do micélio. O meio fermentado foi extraído com acetato de etila, por tempo máximo de 72h. Após este período, realizou-se partição líquido-

líquido e o solvente foi removido por meio de rotoevaporação sob vácuo, com rotação de 80 a 90 rpm e temperatura a 45 °C. Posteriormente, as amostras foram colocadas em dessecador, de modo a obter-se um extrato contendo os metabólitos de interesse. Ao final, os 8 extratos obtidos foram registrados e etiquetados de acordo com sua origem, meio de fermentação, solvente da extração, massa obtida e armazenados em congelador.

4.3. Análise por Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas

As análises químicas foram realizadas em um sistema de LC-MS/MS 6550 iFunnel da Agilent, constituído de um cromatógrafo de alta performance acoplado a um espectrômetro de massas com geometria do quadrupolo tempo de voo (Q-TOF). A técnica de ionização utilizada consistiu na eletrospray (ESI) no modo negativo e os parâmetros de ionização foram: voltagem do capilar, 4000 V; tensão do bocal, 0 V; fragmentador, 100 V; skimmer (capilar de transferência), 65 V; temperatura do gás, 275 °C; vazão de gás, 14 L/min; nebulizador, 45 psi. Manteve-se a temperatura do auto-amostrador à 20 °C e o volume de injeção foi de 10 µL (Kjer, 2010)

A separação dos compostos foi realizada em uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (Dimensões 50 mm x 4.6 mm, diâmetro da partícula 2.7 µm) utilizando uma fase binária (solvente A: água, solvente B: metanol) para as separações. A eluição em gradiente a 30 °C foi a seguinte: 0-2 min, 5% B; 2-15 min, 5-60% (v/v) B; 15-25 min, 60-70% (v/v) B; 25-35 min, 70-100% (v/v) B; 35-50 min, 100% de B a uma vazão de 0,4 mL/min. Realizou-se as identificações por meio da interpretação manual dos espectros de MS/MS em comparação com a literatura adequada. Os espectros obtidos foram processados utilizando-se o software MassHunter Qualitative Analysis versão B.07.00 (Kjer, 2010).

4.4. Avaliação de viabilidade celular

O extrato proveniente do cultivo da *Quambalaria* sp. que se mostrou com maior quantidade de extrólitos no meio de cultura, maior crescimento micelial em menor tempo e maior produção de naftoquinonas detectada através da técnica de LC- MS/MS, foi avaliado, no Laboratório de Imunofarmacologia da Escola Normal Superior, quanto à sua citotoxicidade em Huh-7 por meio do ensaio colorimétrico quantitativo MTT (Mosmann, 1983). Para tal, primeiramente, realizou-se a contagem das células em câmara de Neubauer, previamente cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB, mantida em incubadora a 37 °C e 5 % CO₂ até formação de monocamada.

Posteriormente, foi realizada a suspensão celular, onde estas foram distribuídas em 3 placas de 96 poços junto ao meio de cultura DMEM, mais 10% de SFB, 1% de antibiótico e antifúngico, numa concentração de 10^5 células por poço. As placas foram armazenadas em estufa (37 °C e 5% de CO₂) por 48h, período necessário para formação de monocamada.

Depois que a monocamada se formou, retirou-se o sobrenadante e as células foram lavadas cuidadosamente com solução PBS para a não remoção da monocamada celular. Posteriormente adicionou-se 200 µl de meio de cultura fresco com 2% de SFB em cada poço, onde as linhagens celulares foram tratadas com diferentes concentrações do extrato provenientes de diluição seriada da solução- mãe (21,5 mg de extrato, 100 µl de DMSO e 900 µl de meio DMEM), consistindo em 100 µg/ml, 50 µg/ml, 10 µg/ml e 1 µg/ml. Além do tratamento com o extrato, foram realizados tratamento somente com DMSO, com as concentrações equivalentes às diluições do extrato, para a verificação da influência do solvente nos resultados.

Após os períodos de tratamento, os possíveis efeitos citotóxicos das diferentes concentrações do *Quambalaria* sp. sobre a linhagem Huh-7, assim como os efeitos citotóxicos do solvente (DMSO), foram determinados utilizando o kit de MTT (Molecular Probes cat. # M-6494), onde as recomendações do fabricante foram seguidas. A leitura das densidades ópticas de cada placa realizou-se na leitora de ELISA, nos comprimentos de onda de 540-620 nm. As análises estatísticas e confecção de gráficos foram realizados com o software GraphPad Prism através da normatização dos valores.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise da cepa da *Quambalaria* sp. submetida a testes OSMAC (One strain-many compounds)

O fungo dimórfico *Quambalaria* sp. cresceu em sua forma hifal, apresentando micélio (Kolarik *et al.*, 2006), nos cultivos submetidos a testes OSMAC, exceto nos meios testes BD, Sabouraud, CZAPEK, ISP2 e Sucrilhos em que foram adicionado sulfato de cobre e no meio teste extrato de carne em que foi adicionado HBr, os quais não foram possíveis detectar o crescimento fúngico.

O crescimento micelial mostrou-se, de forma macroscópica, morfológicamente diversificado juntamente com a coloração de seus extrólitos. Pode-se observar a diferença da

coloração dos extrólitos, variando, de acordo com a composição dos diferentes meios de cultura. Comparando, meio controle aos meios testes (com xenobióticos), pode-se verificar mudança da intensidade da cor e quantidade de extrólitos excretados no meio, além disso, os micélios apresentaram diferenças em relação a densidade das hifas e produção destas.

Nos meios de cultura BD tanto controle como testes, ocorreu maior crescimento micelial e, concomitantemente, maior produção de extrólitos com coloração roxa em relação aos demais meios de cultura controle e testes. A variação morfológica do fungo em relação ao meio controle BD e aos meios BD testes apresentou-se somente no meio teste BD + NaCl, onde no micélio foi possível a verificação de hifas fracamente adensadas. Em relação a coloração dos extrólitos, os meios BD + HBr e BD + NaCl apresentaram coloração mais clara (Figura 7.).

Figura 7. *Quambalaria* sp., cultivado respectivamente em Meio BD controle, Meio BD + 5-azacitidina, Meio BD + HBr e Meio BD + NaCl.



Fonte: Raposo, 2020.

Nos meios de cultura Sabouraud, tanto controle como testes, todos apresentaram extrólitos avermelhados, variando, assim como nos meios testes BD, somente na intensidade da cor. Em relação a característica morfológica, macroscópica, o micélio apresentou variedade, uma vez que em meio teste Sabouraud + HBr as hifas mostraram-se mais densas em relação aos demais micélios das outras culturas em Sabouraud. Pode-se afirmar que a produção de extrólitos não está ligado ao crescimento micelial, devido ao fato do meio teste Sabouraud + HBr ter menor produção de extrólitos e maior produção de micélio, diferentemente dos demais, onde o fato ocorre inversamente (Figura 8).

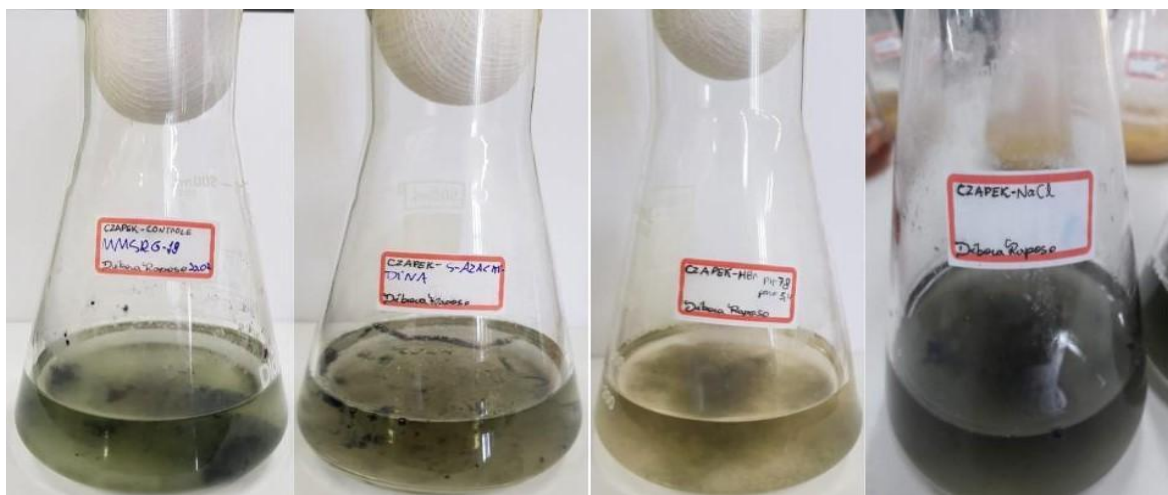
Figura 8. *Quambalaria* sp., cultivado respectivamente em Meio Sabouraud controle, Meio Sabouraud + 5-azacitidina, Meio Sabouraud + HBr e Meio Sabouraud + NaCl.



Fonte: Raposo, 2020.

Em relação aos demais meios de cultura controle e testes, o *Quambalaria* sp. obteve baixo crescimento micelial quando comparado aos meios cultura BD e Sabouraud (controle e teste), não ocorrendo a excreção de extrólitos nos meios de cultura (Figura 9; Figura 10; Figura 11). Portanto, subte-se que a não houve produção das naftoquinonas de interesse, uma vez que estas estão diretamente ligada a coloração dos extrólitos (Medentsev e Akimenko, 1998).

Figura 9. *Quambalaria* sp., cultivado respectivamente em Meio CZAPEK controle, Meio CZAPEK + 5-azacitidina, Meio CZAPEK + HBr e Meio CZAPEK + NaCl.



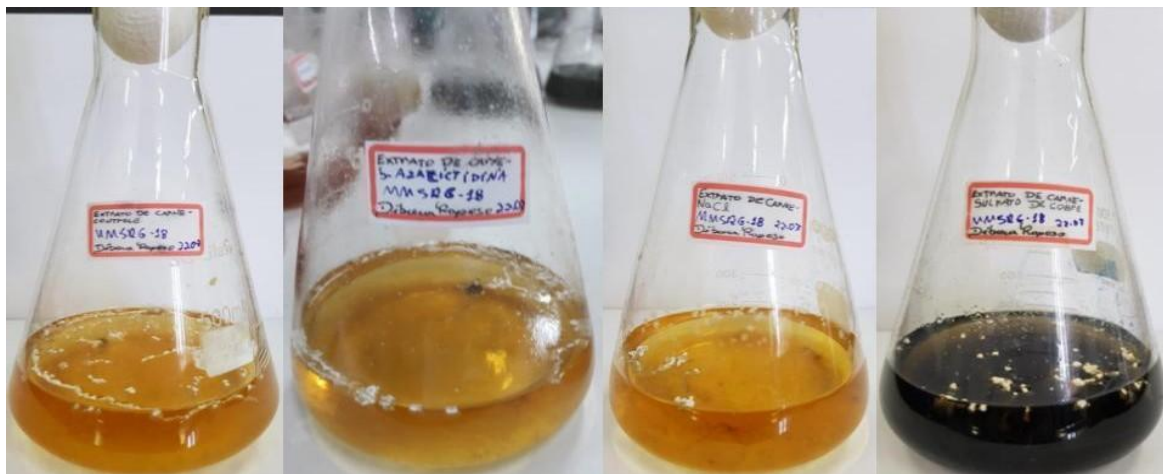
Fonte: Raposo, 2020

Figura 10. *Quambalaria* sp., cultivado respectivamente em Meio ISP2 controle, Meio ISP2 + 5- azacitidina, Meio ISP2 + HBr e Meio ISP2 + NaCl.



Fonte: Raposo, 2020

Figura 11. *Quambalaria* sp., cultivado respectivamente em Meio extrato de carne controle, Meio extrato de carne + 5 – azacitidina, Meio extrato de carne + NaCl e Meio extrato de carne + sulfato de cobre.



Fonte: Raposo, 2020

Figura 12. *Quambalaria* sp., cultivado respectivamente em Meio sucilhos controle, Meio sucilhos + 5-azacitidina, Meio sucilhos + HBr e Meio sucilhos + NaCl.



Fonte: Raposo, 2020

A biossíntese de naftoquinonas é regulada, inicialmente, pelas fontes de carbono e nitrogênio, com isto subentende-se que ocorreu maior produção inicial em cultivos contendo meio de cultura BD e meio de cultura Sabouraud, uma vez que estes possuem valor nutricional alto, apresentando, respectivamente, grande concentração de C e N em relação aos demais meios de cultura (Kurobane *et al.*, 1980; Demain, 1986). De acordo com Medentsev (1998) o excesso inicial de carbono e energia faz com que o crescimento fúngico seja estagnado ou inibido completamente, fornecendo melhores condições para formação do pigmento, o que ocorreu com a fermentação em meios de cultura BD (controle e teste), uma vez que apresentou maior produção de pigmento.

Em relação ao N, pode-se observar que este possui papel de influência no crescimento e na pigmentação fúngica, porém de menor valor em comparação ao C. Em concentrações moderadas, o nitrogênio orgânico proveniente da peptona e do extrato de levedura mostrou-se benéfico a produção de naftoquinonas, como ocorreu no meio de cultura Sabouraud. Porém, uma maior quantidade de nitrogênio no meio ISP2 pode ter prejudicado a produção de pigmentos.

Boonyapranai (2008) afirma que a maior produção de pigmentos juntamente com naftoquinonas pelo fungo *Fusarium verticillioides* ocorreu em meio BD, pois este, em comparação a outros meios testes, apresentou fonte de carbono e pH ideal para a produção. O mesmo afirma que a concentração de glicose interfere na produção do pigmento e esta precisa

ser adequada juntamente ao pH inicial, o qual deve ser próximo ao neutro, pois a faixa de produção ideal para naftoquinonas mostrou-se entre pH 5-9. Lebeau (2019) também demonstrou que o fungo, do mesmo gênero, *Fusarium oxysporum*, secreta naftoquinonas vermelhas em meio BD. O fungo *Quambalaria* sp. quando submetido a condições aproximadas ao cultivo de *Fusarium verticillioides* e *Fusarium oxysporum* obteve resultado semelhante. A tabela 1 abaixo mostra o pH inicial dos meios de cultura.

Tabela 1. pH inicial dos meios de cultura sem xenobióticos

Meios de cultura	pH inicial
BD	pH 6
Sabouraud	pH 6,8
ISP2	pH 6,4
Extrato de Carne	pH 6,7
CZAPEK	pH 7,3
Meio Sucrilhos	pH 6,7

Fonte: Raposo, 2020

Apesar da adição de xenobióticos ser causa de desvios da rota metabólica de diversos microrganismos, como ocorreu com fungo derivado do mangue, *Neosartorya udagawae*, ao adicionar 5-azacitidina ao meio de cultura em que foi cultivado (Yu *et al*, 2019) e com o fungo *Penicillium brasilianum* em que em adicionou-se sais em meio de cultura (Fill *et al*, 2016), os meios de cultura testes em que o *Quambalaria* sp foi cultivado não apresentaram variações quantitativas em relação a produção de seus extrólitos, mostrando-se semelhantes aos meios de cultura controle, portanto, não ocorrendo modificação em sua rota metabólica associada à produção de naftoquinonas.

5.2. Análise dos extratos por Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrometria de Massas

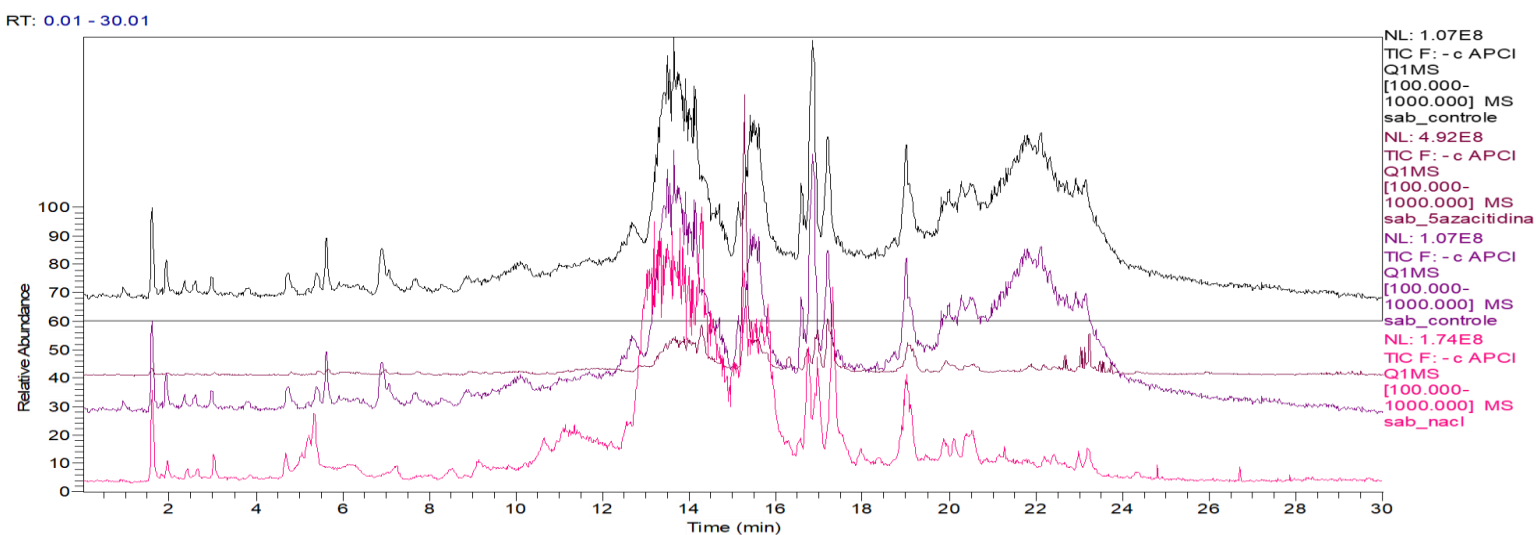
Os extratos analisados foram os provenientes do meio BD (controle e testes) e Sabouraud (controle e testes), os quais apresentaram maior pigmentação e rendimento em relação aos demais meios em que o *Quambalaria* sp. foi cultivado (Tabela 2.). Os cromatogramas mostraram-se semelhantes em relação aos principais picos presentes nos mesmos tempos de retenção, portanto não variando significativamente a produção metabólica (Figura 13; Figura 14.)

Tabela 2. Rendimentos dos extratos em meios Sabouraud e BD

Meios de cultura - 400 ml	Rendimento do extrato
Sabouraud controle	55,2 mg
Sabouraud + 5- azacitidina	43,0 mg
Sabouraud + HBr	39,6 mg
Sabouraud + NaCl	37,1 mg
BD controle	40,0 mg
BD + 5- azacitidina	40,6 mg
BD + HBr	9,0 mg
BD + NaCl	30,0 mg

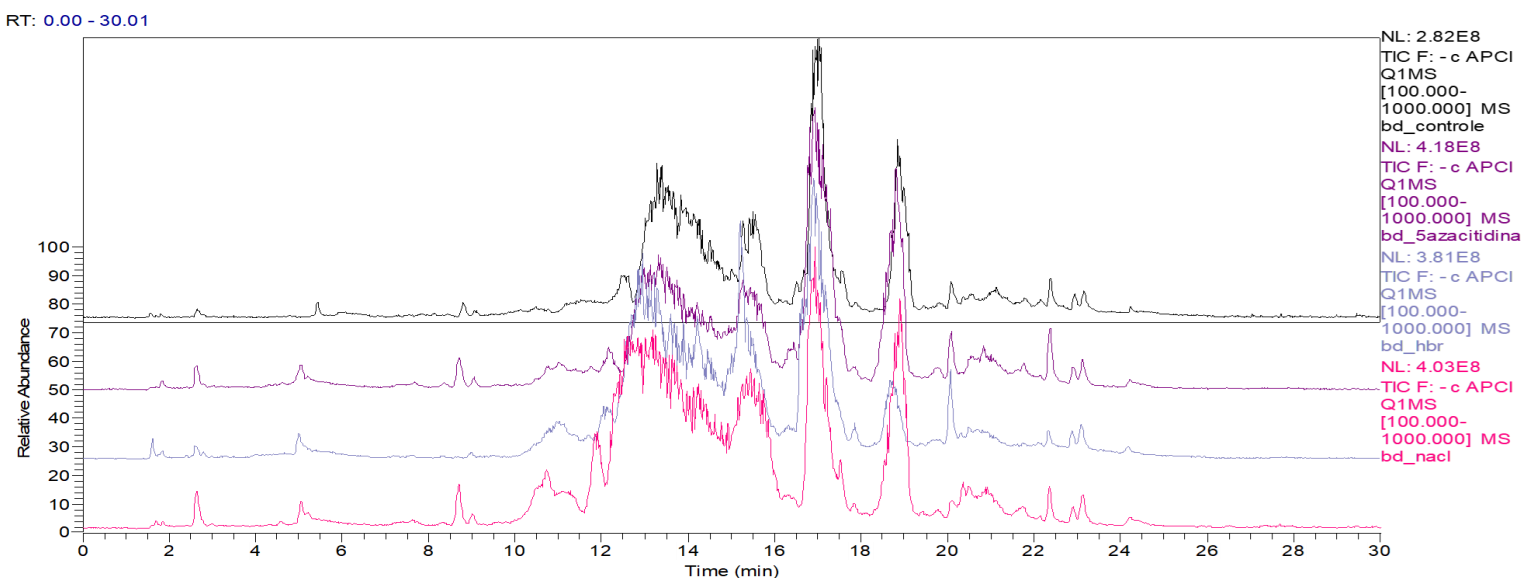
Fonte: Raposo, 2020.

Figura 13. Cromatogramas em meios de cultura Sabouraud controle e testes



Fonte: Raposo, 2020.

Figura 14. Cromatogramas em meios de cultura BD controle e testes



Fonte: Raposo, 2020.

Já que os picos se mostraram semelhantes, o meio líquido BD controle, o qual apresentou melhor custo benefício juntamente ao extrólito com coloração de maior intensidade e rendimento considerável, foi analisado enquanto os picos apresentados, e suas naftoquinonas caracterizadas.

5.3. Caracterização das naftoquinonas provenientes do cultivo em meio líquido BD (Batata-Dextrose)

Foi identificada uma molécula de naftoquinona no extrato do cultivo de *Quambalaria* sp. cultivado em meio líquido BD, sendo esta a quambalarina B, C₁₆H₁₆O₇ (Figura 15.). A massa monoisotópica da molécula desprotonada é igual a 319.08178, onde, para confirmar se esta condiz com a massa achada, a qual consiste em 319.0824, realizou-se o cálculo de exatidão:

$$Er = \frac{Xi - Xv}{Xv} \times 10^6$$

onde *Er* = erro relativo

Xi = valor medido

Xv = valor verdadeiro ou mais provável

Sendo,

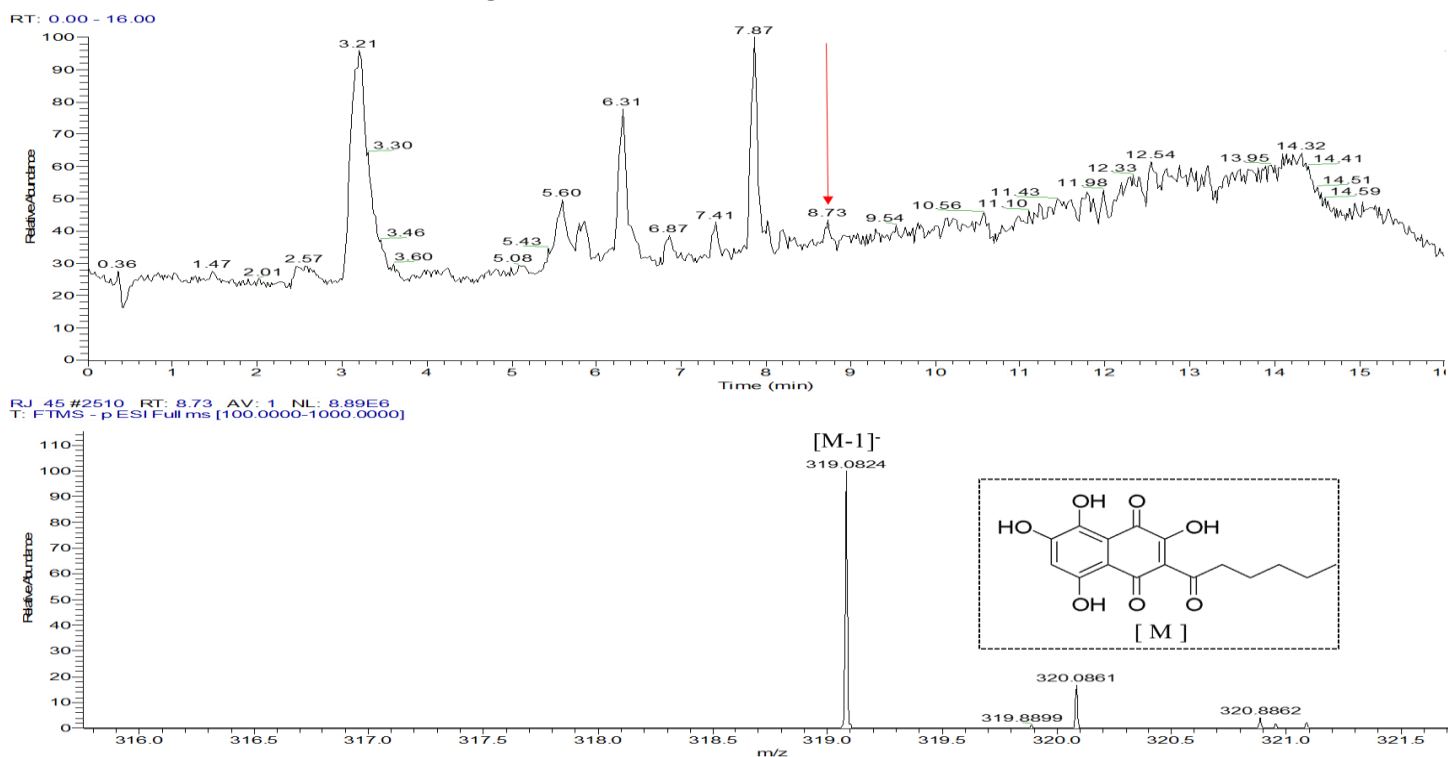
$$Er = \frac{319.0824 - 319.08178}{319.08178} \times 10^6$$

$$Er = 1,9431 \text{ ppm}$$

O resultado do cálculo de exatidão foi igual a 1.9431 partes por milhão. Pode-se concluir que quanto menor o erro relativo, maior a exatidão, sendo assim comprovada a naftoquinona achada como quambalarina B.

A quambalarina B já tinha sido descrita em uma levedura inespecífica e no fungo *Quambalaria cyanesceus*. (Flegel et al., 1984; Stodulkova et al., 2015). Estudos com esta molécula, demonstraram que além de atividade antifúngica contra *Geosmithia* sp., ela possui atividade antitumoral, desacelerando a divisão celular das células tumorais HeLa e atuando no desaparecimento do complexo mitocondrial, além de inibir a expressão da oncoproteína C-MYC e atenuar a sinalização da proteína mTOR em várias linhagens de células leucêmicas. Esta molécula também pode ser considerada uma potencial droga antidiabética, devido sua atuação no fluxo glicolítico (Stodulkova et al., 2015; Valis et al., 2017).

Figura 15. Quambalarina B (m/z 319.0824; [M-H]⁻)



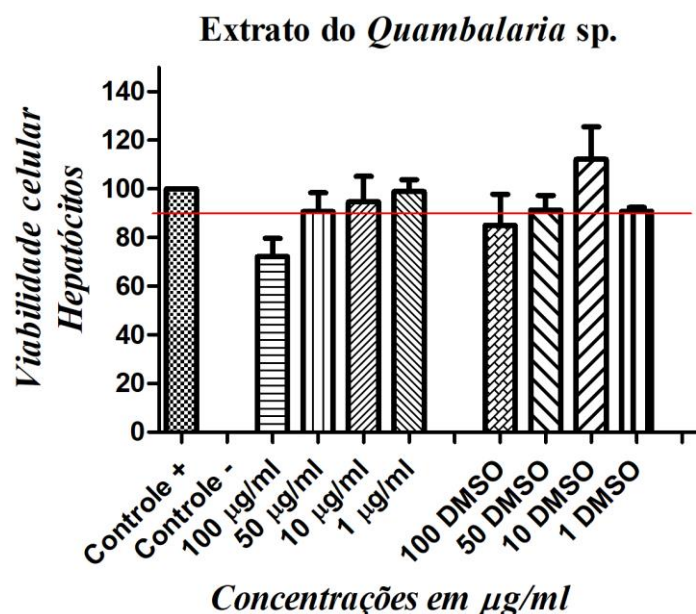
Fonte: Raposo, 2021.

5.4. Atividade citotóxica do extrato bruto na linhagem de hepatócitos- Huh-7

Para descobertas de compostos ativos, em geral, inicialmente é realizada a análise citotóxica destes compostos em diversos modelos celulares. O ensaio colorimétrico quantitativo MTT, consiste na reação biológica do sal de tetrazólio com as mitocôndrias das células, submetidas a tratamento com diferentes concentrações de extrato, a qual demonstra atividade do metabolismo celular através da redução do sal a cristal de formazan (Mosmann, 1983).

As concentrações, 50 µg/ml, 10 µg/ml e 1 µg/ml do extrato do *Quambalaria* sp., proveniente do cultivo em meio BD líquido, apresentaram quantidade significativa de cristal de formazan, demonstrado no gráfico 1 através da linha vermelha a qual indica redução > 10% da formação de cristal e ressaltado na tabela 3 a qual mostra valores referentes a viabilidade celular < 90%, sendo assim concentrações não citotóxicas (REIS et al., 2008; LIMA-JÚNIOR et al., 2013; MELLO et al., 2017). Os controles em DMSO mostraram que o solvente não influenciou nos resultados (Gráfico 1.).

Gráfico 1. Citotoxicidade do Extrato da *Quambalaria* sp.



Fonte: Raposo, 2021.

Nota: A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio de MTT, durante 48h, usando diferentes concentrações do extrato da *Quambalaria* sp. Os dados foram normalizados utilizando-se como referência o controle positivo de células

sem o tratamento (100% viabilidade celular) e o controle negativo (poços que não continham células). O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes em quintuplicata.

Tabela 3. Citotoxicidade celular do extrato do *Quambalaria* sp. em Huh-7 durante 48 h.

	Controle +	Controle -	100 µg/ml	50 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
48 h (%)	100	0	72,2298	90.668	94.7026	98.9924

Nota: Nesta tabela estão os valores das percentagens dos ensaios de MTT mostrados nos gráficos acima. Foram consideradas citotóxicas as concentrações que reduziram em mais de 10% a produção do formazan, comparado com o controle positivo.

Fonte: Raposo, 2021.

Sabe-se que grande parte das naftoquinonas possuem potencial citotóxico alto, porém, acredita-se que devido à baixa quantidade das moléculas de naftoquinona no extrato, demonstrada através do cromatograma, este apresentou-se, em três concentrações, não tóxico às células (Sousa *et al.*, 2016). De acordo com Athayde (2011), embora exista a tendência em se preconizar o uso de princípios ativos oriundos de compostos naturais, muitos exemplos mostram que o uso do composto pode ser igualmente ou mais efetivo quando usado *in natura* ou através de extratos de preparação simples, além desta afirmação, o autor enfatiza que grupos farmacológicos distintos, dentro de um composto, são responsáveis pelas diversas atividades farmacológicas verificadas em uma só espécie fúngica ou vegetal, portanto, pode-se dizer que a bioatividade do extrato e a bioatividade de uma molécula pura atuam de formas distintas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quambalaria sp., basidiomiceto endofítico isolado do fruto do açaí (*Euterpe precatória*), apresentou maior produção de extrólitos e pigmentação da cor roxa no cultivo em meio BD controle, onde em seu extrato a naftoquina quambalarina B foi identificada através da técnica de Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas. Ressalta-se que a quambalarina B possui atividade antifúngica e antitumoral, podendo ser uma possível nova droga para tratamento de câncer.

Pode-se observar que devida a baixa quantidade desta naftoquinona no extrato bruto, nas concentrações 50 µg/ml, 10 µg/ml e 1 µg/ml este não demonstrou citotoxicidade em células Huh-7. Portanto, vale destacar a necessidade de estudos posteriores sobre possíveis atividades

do extrato bruto juntamente a análise do seu perfil químico, visto que a molécula pura e o extrato possuem diferentes biodinamicidades.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SATER, M. A.; MOUBASHER, A. H.; SOLIMAN, Z. S. M. Diversity of filamentous and yeast fungi in soil of citrus and grapevine plantations in the Assiut region, Egypt. **Czech Mycology**, v. 68, p. 183- 214, 2016.

ALBERTS, A. W. Discovery, biochemistry and biology of lovastatin. **The American Journal of Cardiology**, v. 62, n. 15, p. J10-J15, 1988.

ALFENAS, A. C. *et al.* *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 221-221, 2001.

ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829-1845, 2011.

ANDRADE, G. C. G. *et al.* Características culturais e severidade da mancha foliar de *Quambalaria eucalypti* sob diferentes regimes de temperatura, luz e período de molhamento foliar. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 329-334, 2007.

AMIN, R. M. *et al.* Biologically active endophytic *Quambalaria* sp. from *Leptospermum junipae* in Australia. **Mycology**, v. 1, n. 1, p. 67-74, 2010.

ATHAYDE, Maria Margarida Sousa. Citotoxicidade e atividade antimicrobiana de extratos de duas cepas do fungo *Pycnoporus sanguineus* oriundas da Amazônia. 2011. 40 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, SP. Disponível em : <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/288927>. Acesso em: 08 jul. 2021.

BOONYAPRANAI, K. *et al.* Optimization of submerged culture for the production of naphthoquinones pigment by *Fusarium verticillioides*. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 35, n. 3, p. 457-466, 2008.

DE ARAUJO, Welington Luiz. Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros. 1996. 119 f. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11137/tde-20191218-170129/en.php>. Acesso em: 10 jul. 2021.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.

BARREIRO, R. J.; SILVA, J. F. M.; FRAGA, C. A. M. Noções básicas do metabolismo de fármacos. **Revista Química Nova**, v. 19, p. 441-451, 1996.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21-32, 2013.

BODE, C. J. *et al.* Epothilone and paclitaxel: unexpected differences in promoting the assembly and stabilization of yeast microtubules. **Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 3870-3874, 2002.

CANNON, P. F.; SIMMONS, C. M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycologia**, v. 94, n. 2, p. 210-220, 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72-79, 2005.

COSTA, I. P. M.; MAIA, L. C.; CAVALCANTI, M. A. Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1165-1173, 2012.

DE CAPRILES, C. H.; MATA, S; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, v.106, n.1, p. 73-79, 1989.

MCLAUGHLIN, D. J.; MCLAUGHLIN, E. G. The Mycota: A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. **Systematics and Evolution**. Springer, 2001.

FLEGEL, T. W.; MEEVOOTISOM V.; THEBTARANONTH Y.; QITAI Z.; CLARDY J. A new naphthoquinone antibiotics from a new species of yeast. **Journal of Antibiotics**, v. 37, p. 325-329, 1984.

FOURNET, A. *et al.* 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 4, p. 859-863, 1993.

GOMES, E. M. C.; PENA, R. C. M. Isolamento, caracterização morfológica e avaliação do crescimento micelial e esporulação em diferentes meios de cultura de cepas do fungo *Quambalaria* sp. **Biota Amazônia**, v. 6, n. 4, p. 59-63, 2016.

DEMAIN, A. L. Regulation of secondary metabolism in fungi. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 219-226, 1986.

DE HOOG, G. S.; DE VRIES, G. A. Two new species of *Sporothrix* and their relation to *Blastobotrys nivea*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 39, n. 1, p. 515-520, 1973.

DE MEDEIROS, L. S. *et al.* Dichlorinated and brominated rugulovasines, ergot alkaloids produced by *Talaromyces wortmannii*. **Molecules**, v. 20, n. 9, p. 17627-17644, 2015

FILL, T. P. *et al.* Copper and manganese cations alter secondary metabolism in the fungus *Penicillium brasilianum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 8, p. 1444-1451, 2016.

JOEL, E. L.; BHIMBA, B. V. Evaluation of secondary metabolites from mangrove associated fungi *Meyerozyma guilliermondii*. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 49, n. 3, p. 189-194, 2013.

KOLARIK, M.; SLAVIKOVA, E.; PAZOUTOVÁ, S. The taxonomic and ecological characterisation of the clinically important heterobasidiomycete *Fugomyces cyanescens* and its association with bark beetles. **Czech Mycology**, v. 58, n. 1/2, p. 81, 2006.

KJER, Julia. New natural products from endophytic fungi from mangrove plants—structure elucidation and biological screening. 2010. 214 f. Tese (doutorado) - Faculdade de Matemática e Ciências Naturais, Dusseldorf, ALEMANHA. Disponível em : <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=16832> . Acesso em 10 jul. 2021.

KUROBANE, I. *et al.* Metabolites of *Fusarium solani* related to dihydrofusarubin. **The Journal of Antibiotics**, v. 33, n. 11, p. 1376-1379, 1980.

FALKENBERG, L. B. Grupos de metabólitos vegetais: Quinona. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL E.P.; GOSMANN, G.; MELLO J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org). Farmacognosia da planta ao medicamento. **Editora da UFSC**, p.675, 2007.

LEBEAU, Juliana et al. Isolation of two novel purple naphthoquinone pigments concomitant with the bioactive red bikaverin and derivatives thereof produced by *Fusarium oxysporum*. **Biotechnology progress**, v. 35, n. 1, p. e2738, 2019.

LIMA-JUNIOR, R. S. *et al.* *Uncaria tomentosa* alkaloidal fraction reduces paracellular permeability, IL-8 and NS1 production on human microvascular endothelial cells infected with dengue virus. **Natural product communications**, v. 8, n. 11, p. 1547-1550, 2013.

MEDENTSEV, A. G.; AKIMENKO, V. K. Naphthoquinone metabolites of the fungi. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 935-959, 1998.

MOURA, Hélia Maria Marques de. Avaliação in vitro da atividade antitumoral e antiviral frente ao Zika vírus de naftoquinonas sintéticas. 2017. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MUVEA, A. M. *et al.* Colonization of onions by endophytic fungi and their impacts on the biology of *Thrips tabaci*. **PloS one**, v. 9, n. 9, 2014.

MELLO, C. S. *et al.* Decrease in Dengue virus-2 infection and reduction of cytokine/chemokine production by *Uncaria guianensis* in human hepatocyte cell line Huh-7. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 458-468, 2017.

NATORI, S.; KUMADA, Y.; NISHIKAWA, H. The structure of mompain, a naphthoquinone from *Helicobasidium mompa* Tanaka, and its relation to spinochrome A (M). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 13, n. 5, p. 633-635, 1965.

PAAP, Trudy. The incidence, severity and possible causes of canker disease of *Corymbia calophylla* (marri) in the southwest of Western Australia. 2006. 198 f. Tese (doutorado) - Murdoch University, AUSTRÁLIA. Disponível em: <https://researchrepository.murdoch.edu.au/id/eprint/241/>. Acesso em: 10 jul. 2021

PAUL, N. C. *et al.* First record of endophytic *Paraconiothyrium brasiliense* isolated from Chinese maple leaves in Korea. **The Korean Journal of Mycology**, v. 42, n. 4, p. 349-352, 2014.

PADHI, S.; TAYUNG, K. Antimicrobial activity and molecular characterization of an endophytic fungus, *Quambalaria* sp. isolated from *Ipomoea carnea*. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 793-800, 2013.

PEIXOTO NETO, P. A. S. Química e Atividade Biológica de Tecidos in vivo e in vitro de *Pithecolobium avaremotemo* Mart.–Maceió, UFAL. 2003. 60p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Alagoas.

PECERE, T. *et al.* Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. **Cancer Research**, v. 60, n. 11, p. 2800-2804, 2000.

PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. **Mycologia**, v. 85, n. 3, p. 362-364, 1993.

AMIN, R. M. *et al.* Biologically active endophytic *Quambalaria* sp. from *Leptospermum junipae* in Australia. **Mycology**, v. 1, n. 1, p. 67-74, 2010.

RAPOSO, D. de S. *et al.* Otimização das condições para a produção de metabólitos no co-cultivo de *Quambalaria cyanescens* e *Paecilomyces* sp. **Embrapa Amazônia Ocidental- Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2019.

REIS, S. R. I. N. *et al.* Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 3, p. 468-476, 2008.

RODRIGUES, K. F.; DIAS-FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. *marandu* and *B. humidicola*. **Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 1996.

SUPRATMAN, U. *et al.* New naphthoquinone derivatives from *Fusarium napiforme* of a mangrove plant. **Natural Product Research**, p. 1-7, 2019.

SEVERIANO, Marcela Etchebehere. Biotransformação de naftoquinonas por fungos filamentosos e bactérias do trato gastrointestinal e avaliação da atividade citotóxica dos derivados obtidos. 2016. 214 f. Tese (doutorado)- Universidade de São Paulo.

DA SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. Um Panorama Atual da Química e da Farmacologia de Naftoquinonas, com Ênfase na beta-Lapachona e Derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 116-124, 2008.

SOUSA, E. T.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. de. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**, v. 39, n. 4, p. 486-495, 2016

SPECIAN, V. *et al.* Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 4, 2014.

SINGH, S. B.; PELAEZ, F. Biodiversity, chemical diversity and drug discovery. In: Natural compounds as drugs volume I. **Birkhäuser Journal**, p. 141-174, 2008.

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

STODULKOVÁ, E. *et al.* Biologically active metabolites produced by the basidiomycete *Quambalaria cyanescens*. **PLoS One**, v. 10, n. 2, 2015.

TAMBINI, R. *et al.* Possible pathogenic role for *Sporothrix cyanescens* isolated from a lung lesion in a heart transplant patient. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 34, n. 3, p. 195-198, 1996.

TAKAHASHI, J. A. *et al.* Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2351-2382, 2017.

VALIŠ, K. *et al.* Reprogramming of leukemic cell metabolism through the naphthoquinonic compound Quambalarine B. **Oncotarget**, v. 8, n. 61, p. 103137, 2017.

HARBORNE, J. B. Naturally Occurring Quinones. IV. Recent Advances. **Phytochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1835, 1998.

YU, G. *et al.* Methylsulfonylated polyketides produced by *Neosartorya udagawae* HDN13-313 via exogenous addition of small molecules. **Journal of Natural Products**, v. 82, n. 4, p. 998-1001, 2019

APÊNDICE

APÊNDICE I – COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA SUCRILHOS

Para 1 litro de meio de cultura sucrlhos:

Sucrilhos-----100g
Dextrose-----8g
Extrato de levedura----2g
Extrato de malte-----2g
Cloreto de sódio-----2g
Sulfato ferroso-----0,01g
Fosfato de potássio----0,5g
Nitrato de Sódio-----1g

APÊNDICE II – QUANTIDADE DE XENOBIÓTICOS ADICIONADOS NOS MEIOS DE CULTURA TESTE

5 – azacitidina: 832 µl de solução (29,3 mg de 5-azacitidina para 10 ml de dimetilsulfóxido).

Sulfato de cobre: 0,5 g/l.

Cloreto de sódio: 0,2 g/l.

Ácido bromídrico: pH do meio resultante 5,4.

ANEXO

ANEXO I – COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Meio de cultura BD

Para cada 1 litro de meio de cultura BD:

Batata portuguesa ----- 200 g

Dextrose ----- 20 mg

Meio de cultura Sabouraud

Para cada 1 litro de meio de cultura Sabouraud:

Dextrose----- 40g

Peptona----- 10g

Meio de cultura ISP2

Para cada 1 litro de meio de cultura ISP2:

Dextrose----- 10g

Peptona----- 5g

Extrato de levedura----- 3g

Extrato de malte----- 3g

Meio de cultura extrato de carne

Para cada 1 litro de meio de cultura extrato de carne:

Extrato de carne-----25g

Meio de cultura CZAPEK

Para cada 1 litro de meio de cultura CZAPEK:

Sucrose-----30g

Nitrato de sódio-----3g

Fosfato de potássio-----1g

Sulfato de magnésio----0,5g

Cloreto de potássio-----0,5g

Sulfato ferroso-----0,01g

