

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL- MG**

**ANDREA NATAN DE MENDONÇA**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS ASSOCIADOS À *Annona crassiflora***

Alfenas/MG

2014

**ANDREA NATAN DE MENDONÇA**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS ASSOCIADOS À *Annona crassiflora***

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Alfenas/ MG

2014

Mendonça, Andrea Natan de.

Isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos associados à *Annona crassiflora* / Andrea Natan de Mendonça, Alfenas, MG - 2014.

88f. -

Orientador: Masaharu Ikegaki

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Fungos - Biotecnologia. 2. Annonaceae. 3. Fermentação. 4. Compostos bioativos. 5. Bioensaios. I. Ikegaki, Masaharu. II. Título.

CDD: 615

ANDREA NATAN DE MENDONÇA

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE  
COMPOSTOS BIOATIVOS ASSOCIADOS À *ANNONA CRASSIFLORA***

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Federal de Minas Gerais. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 15/09/2014

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

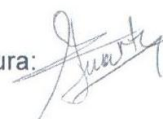
Assinatura:



Prof. Dr. Marta Cristina Teixeira Duarte

Instituição: Universidade Estadual de Campinas

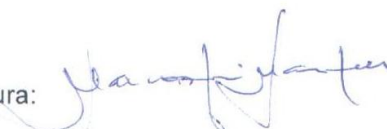
Assinatura:



Prof. Dr. Marcos José Marques

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Dedico este trabalho aos meus pais, Dilamar e Crispiniano,  
à minha irmã, Adriana e ao meu namorado Bruno,  
por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.  
Sem eles nada disso seria possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me amparar nos momentos difíceis, guiando meus caminhos e suprimindo minhas necessidades.

Ao professor Masaharu Ikegaki pela orientação neste trabalho, pela liberdade e autonomia durante os experimentos permitindo um crescimento profissional e pessoal.

Aos meus pais, Dilamar e Crispiniano, que apesar da distância me apoiaram em todas as decisões, sempre presentes em todos os momentos de minha vida dando força, incentivo, carinho e amor.

A Adriana minha irmã, amiga, confidente, meu porto seguro, que independente da situação estava ao meu lado.

Ao meu namorado Bruno, por sua compreensão, paciência e carinho durante todo este percurso.

Aos colegas de laboratório, principalmente a minha amiga Bárbara que desde o primeiro período de faculdade estamos juntas, incentivando, ouvindo problemas e reclamações, divertindo e concretizando nossos sonhos.

A Universidade Federal de Alfenas por permitir a realização deste trabalho.

Ao órgão financiador FAPEMIG pela concessão da bolsa e pelo apoio na realização desta pesquisa.

Ao professor Severino Matias Alencar que possibilitou a realização de experimentos na USP- Piracicaba.

A professora Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz pelos ensaios antiproliferativos realizados no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)- Campinas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

## RESUMO

Os fungos endofíticos merecem um destaque especial devido a sua diversidade, e consequentemente ao aumento da probabilidade de descoberta de metabólitos. Este trabalho teve por objetivo isolar fungos endofíticos das folhas da *Annona crassiflora*, selecionar os de melhor atividade e testá-los quanto à capacidade em produzir metabólitos bioativos com atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa. Foram isolados 192 fungos em diferentes períodos do ano, sendo a maior quantidade isolada a partir de folhas adultas. Após o isolamento foi preparado extrato de acetato de etila, e avaliada a atividade dos extratos. Para a análise da atividade antimicrobiana foram utilizados os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231, e foi obtida a atividade de 73,22% contra pelo menos um dos micro-organismos. Contra o *S. aureus* a atividade dos extratos foi de 45,54%, a *C. albicans* foi inibida por 31,25% dos extratos, e 54,46% dos extratos foram capazes de inibir a *E. coli*. A partir destes resultados foram selecionados os extratos fúngicos: A1F2F1, A4F14F1 e A5F18F7. A concentração inibitória mínima contra *S. aureus* foi de 250-500 µg/mL para o extrato A5F18F7, 500-1000 µg/mL para o extrato A4F14F1 e A1F2F1 não apresentou atividade nas concentrações testadas. O extrato A5F18F7 demonstrou capacidade bactericida na concentração de 1000 µg/mL. Nas análises de atividade antioxidantes o extrato A4F14F1 destacou frente aos demais em todos os testes e ainda obteve uma maior quantidade de compostos fenólicos totais. Os resultados de atividade antiproliferativa demonstraram resultados promissores para o extrato A4F14F1, sendo esta avaliada como potente contra linhagens de células tumorais e uma baixa atividade contra linhagens celulares não tumorais. Através da análise da composição química desses extratos não foi possível identificar compostos que pudessem ser responsáveis pelas atividades testadas, porém foi possível determinar a presença do ácido butanodióico que consiste em um composto de ampla utilização em diversas áreas. Portanto os resultados sugerem a potencialidade dos extratos, e destacam a importância do estudo dos fungos endofíticos, já eles podem ser uma fonte para várias novas substâncias com atividade de interesse farmacológico.

**Palavras-chave:** Fungos endofíticos. *Annona crassiflora*. Processos Fermentativos.  
Compostos bioativos. Ensaio Biológico.

## ABSTRACT

The endophytic fungi deserve a special mention because of its diversity, and consequently the increased probability of discovery metabolites. This study aimed to isolate endophytic fungi from the leaves of *Annona crassiflora*, select the best activity and test them for their ability to produce bioactive metabolites with antimicrobial activity, antioxidant and antiproliferative. Were isolated 192 fungi in different periods of the year, being the largest single amount from adult leaves. After isolation extract was prepared in ethyl acetate, and evaluated the activity of the extracts. For the analysis of the antimicrobial activity of micro-organisms *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 10231 were used, and the activity of 73.22% against at least one of the micro-organisms was obtained. Against *S. aureus* activity of the extracts was 45.54% *C. albicans* was inhibited by 31.25%, and 54.46% of the extract the extracts were able to inhibit *E. coli*. From these results we selected the fungal extracts: A1F2F1, A4F14F1 and A5F18F7. The minimum inhibitory concentration against *S. aureus* was 250-500 mg / mL for the extract A5F18F7, 500-1000 mg / mL for A4F14F1 and A1F2F1 extract was inactive at the tested concentrations. The A5F18F7 extract showed bactericidal activity at 1000 mg / mL. In the analyzes of antioxidant activity extract A4F14F1 emphasized compared to other all the tests and still got a larger amount of phenolic compounds. The results of the antiproliferative activity shown promising results for A4F14F1 sample, this being evaluated as potential against tumor cells and a low activity against non-cancer cell lines. By analyzing the chemical composition of these extracts was not possible to identify compounds that could be responsible for the activities tested, but it was possible to determine the presence of butanedioic acid consisting of a compound widely used in various fields. Therefore the results suggest the potential of the extracts, and highlight the importance of the study of endophytic fungi, since they can be a source for several new substances with pharmacological activity of interest.

**Keywords:** Endophytic fungi. *Annona crassiflora*. Fermentation process. Bioactive compounds. Biological Assays.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1-</b> Árvore do marolo também conhecida como araticunzeiro.-----	24
<b>Figura 2-</b> Fluxograma para obtenção de extratos fúngicos -----	29
<b>Figura 3-</b> Fungos selecionados por meio da triagem -----	41
<b>Figura 4-</b> Atividade da dexorubicina no ensaio antiproliferativo.-----	48
<b>Figura 5-</b> Atividade do extrato A1F2F1 no ensaio antiproliferativo.-----	49
<b>Figura 6-</b> Atividade do extrato A4F14F1 no ensaio antiproliferativo.-----	49
<b>Figura 7-</b> Atividade do extrato A5F18F7 no ensaio antiproliferativo.-----	50
<b>Figura 8-</b> Cromatogramas dos extratos de acetato de etila. -----	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Linhagens celulares empregadas na avaliação da atividade antiproliferativa. -----	34
<b>Tabela 2-</b> Atividade antimicrobiana dos extratos acetato de etila de isolados fúngicos da <i>Annona crassiflora</i> .-----	43
<b>Tabela 3-</b> Atividade antioxidante equivalente ao trolox pelo método ORAC.-----	45
<b>Tabela 4-</b> Atividade antioxidante equivalente ao trolox pelo método ABTS.-----	47
<b>Tabela 5-</b> Inibição parcial do crescimento celular (GI50), expressos em $\mu\text{g/mL}$ , de linhagens tumorais frente aos extratos fúngicos.-----	51
<b>Tabela 6-</b> Composição química do extrato acetato de etila do isolado A1F2F1.-----	55
<b>Tabela 7-</b> Composição química do extrato acetato de etila do isolado A4F14F1.---	57
<b>Tabela 8-</b> Composição química do extrato acetato de etila do isolado A5F18F7.---	59
<b>Tabela 9-</b> Teores de compostos fenólicos nos extratos fúngicos mais ativos -----	63

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1	FUNGOS ENDOFÍTICOS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS	15
2.1.1	<b>Atividade antimicrobiana</b>	<b>17</b>
2.1.2	<b>atividade antioxidante</b>	<b>19</b>
2.1.3	<b>atividade antiproliferativa</b>	<b>20</b>
2.1.4	<b>A família Annonaceae e a espécie <i>Annona crassiflora</i></b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
3.1	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS A PARTIR DE PLANTAS DA ESPÉCIE <i>Annona crassiflora</i> .	27
3.2	OBTENÇÕES DOS EXTRATOS FÚNGICOS	28
3.3	PRÉ-SELEÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR HALO DE INIBIÇÃO	29
3.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	30
3.5	MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS E PREPARO DOS INÓCULOS	30
3.6	ATIVIDADES BIOLÓGICAS	30
3.6.1	<b>Avaliação da concentração inibitória mínima</b>	<b>30</b>
3.6.2	<b>Avaliação da concentração bactericida e fungicida mínima</b>	<b>31</b>
3.6.3	<b>Determinação da atividade antioxidante</b>	<b>31</b>
3.6.3.1	Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)	32
3.6.3.2	Método do radical ABTS	33
3.6.4	<b>Determinações da atividade antiproliferativa</b>	<b>34</b>
3.7	ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS	36
3.7.1	<b>Determinação da composição química dos extratos por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG-EM)</b>	<b>36</b>
3.7.2	<b>Compostos fenólicos totais</b>	<b>37</b>
3.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>

4.1	ISOLAMENTO E SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS ÀS PLANTAS DA ESPÉCIE <i>Annona crassiflora</i> . -----	39
4.2	PRÉ-SELEÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS -----	40
4.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS -----	42
4.3.1	<b>Avaliação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida e fungicida mínima -----</b>	<b>42</b>
4.3.2	<b>Determinação da atividade antioxidante -----</b>	<b>44</b>
4.3.2.1	Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) -----	44
4.3.2.2	Ação dos extratos sobre a descoloração do radical ABTS -----	46
4.3.3	<b>Determinação da atividade antiproliferativa -----</b>	<b>48</b>
4.4	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS -----	53
4.4.1	<b>Determinação da composição química dos extratos por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG-EM) -----</b>	<b>53</b>
4.4.2	<b>Compostos fenólicos totais -----</b>	<b>62</b>
5	<b>CONCLUSÕES -----</b>	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----</b>	<b>66</b>
	<b>ANEXOS -----</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com intuito medicinal é de conhecimento popular e passada oralmente de geração para geração. Os estudos para comprovação de suas propriedades estão sendo intensificados através da busca de compostos que possam ser utilizados pela indústria farmacêutica. Os produtos naturais constituem a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novos fármacos, comparando-se as principais fontes fornecedoras de compostos protótipos de novos fármacos (síntese orgânica, produtos naturais, química combinatória e bibliotecas virtuais). A mais ampla diversidade química encontrada está associada às substâncias de origem natural (BORGES, 2008).

Um aspecto crucial para a obtenção de novos fármacos derivados de produtos naturais é a seleção da fonte a ser estudada. De acordo com Guimarães et al. (2008), é importante considerar fontes pouco exploradas, pois estão frequentemente associadas a uma substância química inovadora.

Neste aspecto, os fungos endofíticos compreendem uma enorme diversidade em espécies com pouco estudo e com grande probabilidade de apresentar compostos de interesse para a indústria farmacêutica (BORGES, 2008; MENDES, 2008; LAWAL et al., 2010; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Os organismos endofíticos colonizam o interior dos tecidos das plantas por pelo menos um ciclo de vida, interagindo com outras espécies de micro-organismos, sem causar algum dano ou prejuízo ao seu hospedeiro, ou mesmo, às estruturas externas visíveis (MAKI, 2006). A penetração dos endófitos na planta hospedeira pode ocorrer ainda nas sementes, ou por meio da abertura de estômatos, ferimentos e regiões de emissão de raízes secundárias, e posteriormente se disseminam estando presentes em toda a planta (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

No geral, a razão para estudar micro-organismos endofíticos como fonte potencial de novos produtos medicinais está relacionada ao fato de que esta é uma área relativamente inexplorada da diversidade bioquímica.

Os fungos endofíticos podem estar presentes em todas as plantas e entre elas temos a *Annona crassiflora*, popularmente conhecida como maroleiro, que foi o foco de isolamento e seleção dos micro-organismos neste trabalho.

O maroleiro é uma planta que pode ser uma fonte promissora de fungos endofíticos capazes de produzir compostos bioativos, já que existem relatos comprovados sobre sua atividade antimicrobiana e utilização medicinal na cultura popular.

Verificando a necessidade da busca por novos compostos mais efetivos e menos tóxicos, este trabalho teve como objetivo investigar metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos com atividade antimicrobiana (em razão à crescente resistência aos fármacos existentes), antiproliferativa (para diminuir efeitos adversos causados por quimioterápicos) e antioxidante, enfatizando a importância da descoberta de insumos farmacêuticos.

Um aumento no número de pessoas no mundo que têm problemas de saúde causados por vários tipos de câncer, e por micro-organismos (bactérias, protozoários e fungos) resistentes a drogas disponíveis é um motivo de preocupação. Uma intensa busca por novos agentes e mais eficazes para lidar com esses problemas de doença já está em andamento e os endófitos são uma nova fonte de compostos potencialmente úteis (STROBEL; DAYSE, 2003). Um exemplo disso é o taxol, poderoso anticancerígeno que, anteriormente, era obtido apenas da exploração da planta *Taxus brevifolia*, mas, agora pode ser obtido pela fermentação do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* isolado desta planta. Avanços como este reforçam a grande potencialidade biotecnológica de tais micro-organismos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Sem dúvida a avaliação da atividade biológica de compostos naturais do mundo é essencial, pois esses consistem em fontes inovadoras de biodiversidade disponíveis a serem estudadas.

### 2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Os micro-organismos endofíticos são aqueles que vivem no interior das plantas e são capazes de produzir metabólitos, e em alguns casos podem promover o crescimento do vegetal por meio da produção ou indução da síntese de substâncias reguladoras do crescimento, que está relacionado com o seu processo evolutivo permitindo que estes se adaptem melhor ao hospedeiro (POLLI et al., 2012).

Os fungos endofíticos são considerados seres capazes de habitar qualquer parte dentro das plantas, não existindo plantas na natureza livres destes organismos (PARTIDA; HEIL, 2011), porém a maioria dos fungos endofíticos ainda não foram descobertos. Consiste em um grupo diversificado podendo ser encontrados em todo o território terrestre, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (JALGAONWALAN; MOHAITE; MAHAJAN, 2011). Normalmente, centenas de espécies de fungos endofíticos podem ser isolados de uma única planta, sendo que pelo menos um é específico ao hospedeiro (TAN; ZOU, 2001).

A primeira descrição dos fungos endofíticos foi em 1866, por Bary (PEIXOTO-NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002) e até a década de 70 acreditava-se que a interação endofítico-planta era neutra, ou seja, sem acarretar em benefício ou dano a esta. Porém, após anos de estudos foi observado que esta relação é benéfica para ambos: o fungo é capaz de sintetizar substâncias protetoras contra predadores e patógenos, e do vegetal provém os elementos para a nutrição do fungo (AZEVEDO, 1998; WANG et al., 2011)

Os fungos permanecem nos tecidos vegetais por pelo menos um ciclo de vida, apresentam um enorme potencial na produção de substâncias novas e bioativas de interesse em aplicações na biotecnologia tais como antimicrobianos, antivirais, e antitumorais dentre outras atividades biológicas (SOUZA et al., 2004).

Em muitos casos, os compostos isolados de fungos endofíticos são fungicidas ou herbicidas, suportando assim a ideia de que estes metabolitos desempenham um papel importante na defesa da planta hospedeira, (GIMENEZ et al. 2007; PRADO ; LY.; NY, 2011) como no caso do fungo *Beauveria bassiana*, encontrado em milho, protegendo o hospedeiro contra o ataque de insetos. Estudos pioneiros nos anos 80 mostraram que a presença de fungos endofíticos pode reduzir o ataque de insetos à planta hospedeira, sendo descrito, a partir deste período, inúmeras espécies com potencial para o controle biológico de pragas (MELO; AZEVEDO, 1998; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010). Posteriormente, descobriu-se que os endófitos produzem toxinas ou substâncias que diminuem a atratividade da planta aos insetos, aumentando a susceptibilidade do inseto a doenças (ARAÚJO et al., 2010).

Esses micro-organismos são fontes de metabólitos primários (STAMFORD et al.,1998) e secundários. Dentre os metabólitos secundários incluem-se pigmentos, toxinas, indutores de competição ecológica e simbiose, pesticidas, inibidores de enzimas, agentes moduladores de resposta imunológica, feromônios, promotores de crescimento, agentes antitumorais e antibióticos peptídicos (DEMAIN, 1992).

Segundo Hawksworth (2001), existe cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos distribuídos na natureza. Destes, somente 10% foram descritos em literatura e apenas 1% foi verificada a capacidade em produzir algum tipo de metabólito secundário. Apresentam mais de 20.000 substâncias descritas, sendo que destas 51%, têm estruturas inéditas e 80% apresenta atividade biológica (YANG; ZHANG; LUO, 2012).

A obtenção de substâncias de interesse econômico, como enzimas, antibióticos e outros fármacos a partir de micro-organismos, têm sido frequentemente relatados na literatura científica. Dentre os fármacos conhecidos alguns são derivados de fungos, como os antibióticos da classe das penicilinas e cefalosporinas, os redutores de colesterol como a mevastatina e lovastatina, imunossupressores como a ciclosporina e rapamicina, entre outros (CRAGG; NEWMAN, 2005; GREVE et.al., 2010).

As substâncias produzidas por estes organismos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, como, antimicrobiana, antiparasitária, neuroprotetiva, antioxidante, antidiabética, propriedades imunossupressoras, antiviral, anticolinesterásica, antineoplásicos e citotóxica. Os metabólitos podem ser agrupados em várias classes, incluindo alcaloides, esteroides, terpenos, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides, lignanas, ácidos fenólicos, entre outros (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Borges (2008) trabalhou com cinco fungos endofíticos isolados das folhas de *Tithonia diversifolia* e obtiveram substâncias inéditas na literatura: três (03) derivados antraquinônicos, um (01) derivado dicetopiperazínico, um (01) derivado iminoaçúcar, oito (08) derivados azafilônicos e o fungo *Diaphorte phaseolorum* catalisou uma reação de metilação inédita na literatura de biotransformação.

De acordo com os relatos literários é possível afirma que os fungos endofíticos são realmente fontes promissoras de compostos bioativos naturais.

### **2.1.1 Atividade antimicrobiana**

Sem dúvida a descoberta de novos compostos é essencial principalmente quando se trata de antibióticos, estes são muitas vezes utilizados de maneira errônea, causando resistência microbiana, representando na atualidade, um grave problema de Saúde Pública à nível mundial. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, (OMS, 2014) dados apontam para a proliferação descontrolada das resistências microbianas aos antibióticos convencionais, que perdem gradualmente eficácia clínica, complicando o tratamento de futuros doentes e exigindo a utilização de antibióticos de amplo espectro na terapêutica de infecções mais simples.

Os estudos publicados estabelecem uma relação direta e causal entre a exposição a fármacos antibacterianos e a emergência e variações na distribuição de cepas bacterianas resistentes, que se traduz em um incremento dos níveis de mortalidade, morbidade e custos associados à prestação de cuidados de saúde (GOOSSENS et al., 2005).

Os antibióticos são produtos de fermentação produzidos durante a fase estacionária do crescimento dos micro-organismos. São definidos como produtos

naturais, produzidos por certos micro-organismos e ativos contra outros em baixa concentração (ROBINSON; SINGH; NIGAM, 2001).

Fungos endofíticos já foram antes anunciados como sendo prolíficos produtores de compostos antimicrobianos. De acordo com Wiyakrutta et al. (2004) foram estudados extratos de 360 fungos endofíticos resultando em 25,6% de extratos ativos (concentração inibitória mínima 0.0625–200µg/mL) contra *Mycobacterium tuberculosis*, micro-organismo causador da tuberculose.

Uma única planta sadia pode abrigar uma diversidade de fungos endofíticos em seu interior. Esses fungos possuem diversas aplicações biotecnológicas, e podem ser capazes de produzir metabólitos secundários bioativos idênticos ou similares aos produzidos por vegetais. Esses metabólitos podem inibir uma ampla variedade de agentes causadores de doenças, tais como fungos, bactérias, vírus e protozoários que afetam animais, plantas e seres humanos (ORLANDELLI et al. 2011).

Os endófitos são de extrema importância biotecnológica, devido à ampla fonte de produtos, também podem ser utilizados como vetores para a introdução de genes de interesse nas plantas, como agentes inibidores de pragas e patógenos, além de apresentarem ampla aplicação como fármacos como é o caso dos antibióticos, que tem como principal fonte os produtos do metabolismo secundário de micro-organismos (LACAVA et al., 2010).

O *Penicillium janthinellum*, isolado como um fungo endofítico dos frutos de *Melia azedarach*, foi cultivado por 20 dias em milho branco triturado e autoclavado, onde os policetídeos (citrinina, emodina, 1,6,8-triidroxi-3-hidroximetilantraquinona e uma nova antraquinona modificada: a janthinona) foram produzidos. Essas substâncias foram ensaiadas contra diversas bactérias. Citrinina foi testada contra *Leishmania mexicana* (pela primeira vez) e inibiu 100% o crescimento das cepas depois de 48 horas (MARINHO et al., 2005).

O ácido coletótrico é um exemplo de antibiótico produzido pelo fungo endofítico *Colleotrichum gloeosporioides* isolado da planta *Artemisia annua* (STROBEL; DAISY, 2003; STROBEL et al., 2004; STROBEL; DAISY; CASTILHO, 2005; GUO et al., 2008). Essa substância é ativa contra diversos fungos e bactérias patogênicas para o homem (STROBEL; DAISY, 2003; GALLO et al., 2007).

### 2.1.2 Atividade antioxidante

Os radicais livres apresentam papel importante no processo evolutivo das formas de vida aeróbias (FANG; YANG; WU, 2002). Uma vez que a concentração de oxigênio ( $O_2$ ) na atmosfera terrestre primitiva era muito baixa, as primeiras formas de vida que surgiram foram organismos anaeróbios (HALLIWELL, 1996). A partir do aparecimento de seres fotossintéticos, esses níveis de  $O_2$  aumentaram e os organismos existentes precisaram desenvolver sistemas de defesa contra a toxicidade do  $O_2$  e, ao mesmo tempo, usá-lo como fonte de energia para transformações metabólicas (HALLIWELL, 1996). Os componentes que permitiram a utilização do  $O_2$  atmosférico pelas células foram as mitocôndrias, e como sistemas de defesa contra os metabólitos gerados, surgiram as substâncias antioxidantes, que impedem a formação desses radicais livres ou os convertem a radicais menos tóxicos ao organismo (FANG; YANG; WU, 2002).

Os radicais livres apresentam algumas funções importantes na manutenção da saúde do corpo humano, como por exemplo, na destruição de micro-organismos durante o processo de fagocitose e através da atuação como fatores de transcrição na sinalização intracelular, induzindo a apoptose (FINKEL; HOLBROOK, 2000; RUBIN et al., 2006).

De acordo com Huang et al. (2007) em um estudo realizado com 292 fungos endofíticos provenientes de 29 plantas medicinais chinesas tradicionais foi possível verificar que alguns deles foram capazes de produzir metabólitos com forte atividade antioxidante, indicando que esses fungos endofíticos cultivados podem ser uma potencial fonte de novos antioxidantes naturais.

Segundo Harper et al. (2003), foi extraído de um fungo endofítico, *Pestalotiopsis microspora* (um fungo nativo de florestas da Papua, Nova Guiné), um produto chamado pestacina (1,5,7-trisubstituído). De nome químico 1,3-dihidro isobenzofuran, tem moderadas propriedades antifúngicas e atividade antioxidante onze vezes maior que a vitamina E. Dados de raios-X demonstraram que a pestacina ocorre naturalmente como uma mistura racêmica, portanto um mecanismo para uma racemização biossintética é proposto neste trabalho. A pestacina e a isopestacina produzidos pela cultura de fungos *P. microspora* também têm atividade antioxidante (STROBEL, DAISY, 2003).

Um exopolissacarídeo (As1-1) produzido por *Aspergillus* sp. Y16 (endófito da *Ipomoea pes-caprae* L., vegetal do mangue da China) foi avaliado quanto à sua capacidade de eliminação de radicais DPPH e dos radicais super óxido e em ambos os casos, este composto teve atividade similar a do Butil-Hidroxi-Tolueno (BHT) utilizado como padrão do ensaio (CHEN et al., 2011).

Confirmando a atividade antioxidante temos o relato na literatura onde indica que a potencialidade do extrato bruto de *Paraconiothyrium* sp P83F4 / 1 é destacada pela sua capacidade de sequestrar radicais livres e um crescimento de células capazes de inibir seletivamente queratinócitos humanos imortalizados (células HaCat). Estes poderão ser promissores na luta contra a psoríase, reduzindo radicais livres envolvidos nesta patologia (CARVALHO et al., 2012).

Nos últimos anos, uma grande atenção tem sido dada para descoberta de novas moléculas antioxidantes, devido às muitas condições patológicas associadas ao estresse oxidativo (RODRIGUES et al., 2005).

### **2.1.3 Atividade antiproliferativa**

Segundo a organização mundial de saúde (2014) o câncer destaca-se entre as principais causas de morte no mundo, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes em 2012. Câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Outros termos utilizados são tumores malignos e neoplasias. Uma característica marcante do câncer é a criação rápida de células anormais que crescem além de seus limites habituais, e que pode, em seguida, invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos. Este processo é denominado metástase. A metástase é a principal causa de morte pelo câncer.

O câncer representa atualmente a terceira causa de morte no mundo constituindo- se assim em questão fundamental de saúde pública (TABALIPA et al., 2011). As drogas para o seu tratamento são inespecíficas, tem muitos efeitos colaterais e ainda não são efetivas a várias linhagens de câncer. Há evidências que

compostos produzidos por fungos endofíticos podem ser uma fonte de pesquisa para novas substâncias (PIMENTEL, 2011).

A maior parte dos estudos sobre substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos com atividade antioxidante refere-se a fungos associados às plantas medicinais, principalmente plantas utilizadas na medicina tradicional chinesa para o tratamento e prevenção do câncer (JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Estas substâncias produzidas por fungos endofíticos são entidades químicas bioativas de diversas classes terapêuticas e estruturas químicas variadas, que são isoladas, classificadas, e testadas biologicamente, para serem introduzidas como medicamentos inclusive como antitumorais. Como exemplo, o taxol (nome comercial Paclitaxel), substância isolada de planta do gênero *Taxus* com atividade antineoplásica comprovada, também é produzida por espécies de fungos endofíticos como *Taxomyces andreana* e *Pestalotiopsis microspora*. O taxol e seus análogos, hoje já são produzidos pela indústria farmacêutica (JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

O mecanismo de ação do taxol se deve à sua interação com a proteína tubulina que está presente em vários processos de divisão celular. Ao se ligar com a tubulina polimerizada (microtúbulos), o taxol impede que esta se despolimerize. A divisão celular não ocorre, pois neste processo é necessário tubulina despolimerizada para concluir todas as etapas do ciclo celular. Com o processo comprometido, há inibição da mitose da célula tumoral (STROBEL; DAISY, 2003). O taxol, cujo princípio ativo é o paclitaxel, tem sido usado para curar muitos tumores malignos, como câncer de mama, câncer de ovário e de pulmão (PANDI; MANIKANDAN; MUTHUMARY, 2010).

Conforme Saikkonen et al. (1998), do ponto de vista evolucionário, alguns endofíticos realizam hibridização com suas plantas hospedeiras propiciando o aumento da diversidade genética e, conseqüentemente, a formação de novos compostos bioativos. Esse fato é observado no fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora* (STROBEL, 2002), essa é a espécie de fungo mais frequentemente encontrada em plantas de florestas chuvosas, e está relacionado com a produção de taxol, um composto antitumoral encontrado em árvores de lento crescimento. O gênero *Pestalotiopsis* apresenta enorme diversidade biológica e genética, e essa diversidade, segundo Strobel (2002), deve ter surgido por mutação, cruzamento genético ou como resultado de troca genética com seus hospedeiros, uma vez que,

somente esses fatos explicariam a capacidade desses micro-organismos de sintetizarem taxol assim como sua planta hospedeira.

O paclitaxel (taxol) e seus derivados representam o primeiro e maior grupo de agentes anticancerígenos produzidos por fungos endofíticos. Vários fungos como *Taxomyce andreanae* e *Taxus brevifolia* são capazes de produzi-los, entre outros fungos de variadas espécies de plantas (STROBEL, DAISY, 2003).

Outro importante anticancerígeno é a vincristina isolada da planta *Catharanthus roseus*, e recentemente isolada do fungo endofítico *Fusarium oxysporum* obtido da mesma planta (CAO et al. 2005). Podofilotoxina, também utilizada no tratamento de câncer, é encontrada em espécies vegetais do gênero *Podophylum* e também relatada nos endófitos *Trametes hirsuta* e *Phialocephala fortinii* (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2011).

A potencialidade dos fungos pode ser notada pelo trabalho realizado por Weber et al. (2007), que isolaram da planta *Fullugia paradoxa*, que se desenvolve no deserto de Sonoran, no estado do Arizona – EUA. Um fungo endófito identificado como *Aspergillus tubingensis* que produziu durante o processo de fermentação o composto Asperpirona D demonstrou forte atividade citotóxica contra diferentes células cancerígenas com atividades próximas a do produto comercial doxorrubicina.

Estudos realizados com 81 espécies de plantas medicinais coletadas na Tailândia permitiram o isolamento de 582 fungos endofíticos que foram testados quanto à atividade biológica (WIYAKRUTTA et al., 2004). Desses extratos, 92 inibiram *Mycobacterium tuberculosis*, 60 foram ativos contra carcinoma epidermóide oral humano, 48 contra câncer de mama e 74 destes isolados mostraram citotoxicidade para células Vero (WIYAKRUTTA et al., 2004).

Apesar da descoberta de diversos fármacos utilizados no tratamento do câncer, vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado, tendo ainda uma série de efeitos colaterais. Muitos dos casos de câncer ainda não dispõem de tratamento adequado e novos alvos terapêuticos precisam ser conhecidos e testados, evidenciando a necessidade de novas pesquisas para a prospecção de novas moléculas com potencial atividade antitumoral (COSTA- LOTUFO et al., 2010)

#### **2.1.4 A família Annonaceae e a espécie *Annona crassiflora***

O cerrado brasileiro constitui uma região de agregado valor econômico e contém alta diversidade biológica apresentando a maior diversidade de todas as regiões de cerrado do mundo. Contém um elevado número local e regional de espécies endêmicas e é considerado um dos pontos mais importantes da Terra quando tratamos de preservação da biodiversidade (MITTERMEYER; MYERS; MITTERMEYER, 1999).

Esta vegetação cobre quase 2 milhões de km<sup>2</sup> do Brasil, representando 22% do território brasileiro (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). No Estado de Minas Gerais, o Cerrado cobre uma área de 30,8 milhões de hectares, que é 53% do território estadual. O cerrado tem a variação de altitude em relação ao nível do mar em 1800 metros. Normalmente o clima é quente, com verões chuvosos e invernos secos de abril até setembro (RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997).

O cerrado é considerado um tipo peculiar de vegetação, embora seja a segunda maior formação vegetal brasileira em área (BARRETO; HIRUMA-LIMA, 2002) perdendo em tamanho somente para a Floresta Amazônica (ROESLER, 2009). Cerca de 80% do cerrado já foi modificado pelo homem e somente 19% corresponde a áreas-fragmento nas quais a vegetação original ainda se encontra em bom estado (PIRES, SANTOS, 2000).

Segundo Roesler (2009), o cerrado brasileiro é conhecido pela sua alta biodiversidade, porém suas espécies são pouco estudadas cientificamente, muitas delas são utilizadas na medicina popular e tem sido muito aceita como uma forma alternativa de cuidados com a saúde mesmo sem evidências em relação a sua eficácia. Por estes motivos estas plantas estão sendo foco de muitos estudos.

Segundo Barreto e Hiruma- Lima (2002), as plantas medicinais representam um forte componente social e cultural, especialmente em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos onde é uma importante alternativa para a solução de problemas de saúde por meio da produção, comercialização e utilização de fitoterápicos padronizados.

Nos países da América do Sul o uso de plantas na cura das mais diversas enfermidades é muito comum (MACIEL et al., 2002). Além do fato de que a utilização de plantas medicinais para fins terapêuticos pode ser de grande valia para

a economia no setor de saúde de países em desenvolvimento (YUNES; PEDROSA; CECHINEL- FILHO, 2001; FUNARI; FERRO, 2005).

Dentre as inúmeras espécies do cerrado temos a *A. crassiflora* pertencente à família da Annonaceae. A família Annonaceae apresenta cerca de 110 gêneros e 2.150 espécies. No Brasil, já foram registrados 29 gêneros, com cerca de 260 espécies (BARROSO, 1978). Segundo Ocampo e Ocampo (2006) esta família apresenta um produto secundário interessante como polifenóis, óleos essenciais, terpenos, compostos aromáticos, acetogeninas particularmente ativas, moléculas com amplo espectro de ação anticancerígeno, antiparasitário e inseticida.

A árvore de fruto marolo (Figura 1) também conhecido como araticum, ou cabeça-de-negro. Seus frutos apresentam cor verde antes do amadurecimento e marrom pálido quando maduro (LORENZI, 1998). A polpa é ligeiramente doce, com um aroma agradável e podem variar na cor do branco ao amarelo. (CARVALHO, 2002). A polpa pode ser consumida in natura ou também pode ser utilizada na preparação de doces, licores, sorvetes e bolos (RIBEIRO et al., 2000).

**Figura1-** Árvore do marolo também conhecida como araticunzeiro.



Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2013.

Muitas espécies são pouco estudadas, mas a *A. crassiflora* tem motivos específicos devido à dificuldade de sua propagação. Segundo Veloso et al. (1994) suas sementes, além de serem muito atacadas por insetos, apresentam germinação lenta e desuniforme. Isso porque o embrião precisa, primeiramente, constituir seus órgãos, para, em seguida, ocorrer à germinação. A existência de dormência embrionária ocasiona alta desuniformidade nos estandes de plantas sob cultivo, objetivando-se a produção de porta-enxertos, o que reduz a oferta de material apropriado para a propagação da espécie (RIZZINI, 1971). Isto faz com que a produção e manutenção de mudas da população sejam um processo muito caro e demorado (DA SILVA et al., 2004).

Segundo Santos (1996) um composto da semente da *A. crassiflora* denominado araticulin demonstrou citotoxicidade em células e carcinoma do pulmão e melanoma em humanos, enquanto que extratos obtidos a partir de folhas de *A. crassiflora* mostraram propriedades antifúngicas (SILVA et al., 2001).

De acordo com Souza et al. (2002) as plantas do cerrado brasileiro como a *A. crassiflora* apresentam atividade antimicrobiana quando analisado seus extratos *in vitro* inibindo o crescimento das espécies de *Candida* sp e *Cryptococcus neoformans*. Silva et al. (2001) realizaram experimentos com extratos da folha de *Annona crassiflora* investigando sua atividade frente a 52 cepas de *Candida albicans*, quatro (4) cepas de *C. tropicalis* e três (3) cepas de *C. krusei* isoladas de pacientes HIV positivos com candidose orofaríngea. O extrato das folhas de *A. crassiflora* foi ativo contra todos os micro-organismos e apresentou a maior atividade antifúngica com base nos valores do CIM (concentração inibitória mínima). Foi observado que 57 amostras (96%) foram inibidas pelo extrato de *A. crassiflora* com uma concentração de 64 mg/mL, enquanto que em 18 cepas (30%), ele exibiu valores de CIM ainda menores de 0,5 mg/mL em concentração de  $10^6$  UFC/mL de leveduras.

Trata-se de uma planta que apresenta valor ornamental e medicinal, sendo empregada popularmente como antidiarréica (sementes) e como antimicrobiana, por suas propriedades antifúngica e antibacteriana (ALMEIDA, 1998). De acordo com Fonseca e Muniz (1992) a *A. crassiflora* apresenta também ação em relação a afecções parasitárias do couro cabeludo.

Desde 1977, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado o estudo de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais, com o objetivo de

avaliar cientificamente os benefícios da utilização de medicamentos fitoterápicos e de conhecer, ao mesmo tempo, os riscos de seu uso indevido (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Sendo assim, estudos com esta abordagem são de extrema importância, para a indústria farmacêutica, uma vez que, possibilita a descoberta de novas substâncias bioativas. A utilização indiscriminada de antibióticos tem selecionado micro-organismos cada vez mais resistentes aos diversos medicamentos. Mudanças ambientais, estresses abióticos tem gerado novos patógenos, tornando imprescindível à descoberta de novas drogas a fim de controlar a disseminação desses organismos. Além das doenças infecciosas causadas por micro-organismos é cada vez mais frequente o surgimento de outras patologias associadas ao estilo de vida do homem moderno como, por exemplo, o câncer. Portanto essa espécie que apresenta poucos estudos relacionados com sua capacidade de produzir compostos de interesse na indústria farmacêutica é de extrema importância.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A parte experimental consiste no isolamento e seleção de fungos endofíticos, para a avaliação das atividades biológicas e composição química de seus extratos.

#### 3.1 ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS A PARTIR DE PLANTAS DA ESPÉCIE *A. crassiflora*.

Foram coletados ramos juntamente com a parte reprodutiva de *A. crassiflora* no distrito de Divino Espírito Santo (21°10'08,7" S e 46°05'57,9" W Gr), pertencente ao município de Alterosa- MG. As amostras foram identificadas e depositadas no herbário da Universidade Federal de Alfenas sob o número UALF 2412. As folhas coletadas foram selecionadas de acordo com suas características aparentemente saudáveis, acondicionadas em sacos de papel e enviadas ao Laboratório de Bioprocessos onde foram processadas em até 24 horas.

As folhas foram previamente lavadas sob água corrente e submetidas à desinfecção superficial por imersão em etanol 70% (v/v) por 1 min, hipoclorito de sódio 3% por 2 min, e etanol 98% (v/v) por 0,5 min, sendo posteriormente secadas em câmara de fluxo laminar. Discos de folhas de 25 mm de diâmetro foram retirados utilizando um perfurador tipo saca rolha esterilizado (PETRINI et al., 1992; SCHULZ et al., 1993; GAMBOA; LAUREANO; BAYMAN, 2003).

Discos de folhas foram transferidos, em número de 7 fragmentos em cada placa de Petri (90 mm diâmetro) contendo meio de cultura MA2 (extrato de malte 2%, ágar 2%) acrescido de sulfato de estreptomicina (50 mg/L) para suprimir crescimento de bactérias. As placas de Petri foram incubadas em estufa tipo BOD, a temperatura de 28°C. As placas foram avaliadas diariamente, por um período de aproximadamente 20 dias, para a verificação da ocorrência de crescimento de colônias fúngicas a partir do material vegetal inoculado. Todos os fungos detectados foram transferidos para placas de Petri de 60 mm contendo o meio MA2, sem antibióticos.

Os fungos foram isolados em diferentes épocas no intuito de verificar a variação de sua presença e intensidade, sendo realizada a primeira coleta em 08/11/12, a segunda 24/02/13 e a terceira coleta 13/04/13, que correspondem aos períodos de queda das folhas, folhas jovens e adultas, respectivamente. Estes foram armazenados em tubos de ensaio em geladeira a temperatura de 8 °C e repicados para a utilização.

### 3.2 OBTENÇÕES DOS EXTRATOS FÚNGICOS

Para a obtenção dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos, estes foram cultivados em pequena quantidade, em caldo Czapek. Os isolados foram repicados, primeiramente, em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) por sete dias a temperatura de 28 °C.

Em seguida, discos (5 mm) de micélio das culturas recentes em BDA foram cortados e inoculados em Erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de caldo Czapek (Glicose: 30,0 g; NaNO<sub>3</sub>: 2,0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,5 g; KCl: 0,5 g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,01 g; extrato de levedura: 1,0 g; água destilada: qsp 1000 mL) e incubados a 28 °C, por 14 dias, em condições estáticas e na ausência de luz.

Após o período de crescimento, o micélio foi separado do meio de cada cultura por filtração a vácuo em papel filtro. O filtrado obtido foi separado por partição líquido-líquido com o solvente acetato de etila na proporção 1:1 v/v. O extrato orgânico obtido foi concentrado em evaporador rotativo a vácuo a temperatura de 40 °C e pressão de 1,5 atm. e a massa do extrato bruto obtido foi mensurada.

Como controle negativo foi utilizado o extrato do caldo Czapek sem inoculação, obtido da mesma forma que os extratos contendo os inóculos.

Para a produção do extrato em grande quantidade foram inoculados fragmentos de culturas recentes e inoculados em frascos de Erlenmeyers com capacidade para 1.000 mL, contendo 250 mL de caldo Czapek, produzindo um total de 2.000 mL para cada fungo (Figura 2).

**Figura 2-** Fluxograma da obtenção dos extratos fúngicos



Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2013.

### 3.3 PRÉ-SELEÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS ATRAVÉS DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR HALO DE INIBIÇÃO

Um volume determinado das suspensões microbianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram-positiva), *Escherichia coli* 25922 (Gram-negativa) e *Candida albicans* ATCC 10231 foram padronizadas de forma a obter um crescimento no ágar de  $3 \times 10^8$  UFC/mL, foi inoculado em meio ágar nutriente através do método Pour Plate para as bactérias e ágar Sabouraud para fungos, sendo a mistura homogeneizada delicadamente. Após a homogeneização, 25 mL do meio, inoculado com os micro-organismos foram imediatamente vertidos em placas de petri previamente esterilizadas. Após a solidificação, foram feitos poços de 8 mm de diâmetro no meio de cultura das placas onde foi colocada uma alíquota de 25  $\mu$ L do extrato da fermentação. As placas foram então incubadas por 24 horas a temperatura de 37°C.

A análise dos resultados permitiu selecionar os micro-organismos produtores de substâncias com atividade antimicrobiana, pois nestes houve a formação do halo de inibição ao redor dos poços.

### 3.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A metodologia utilizada foi a microdiluição em caldo, utilizando microplacas de 96 orifícios de acordo com as instruções do Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* com modificações (CLSI, 2005).

### 3.5 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS E PREPARO DOS INÓCULOS

Para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) os micro-organismos utilizados foram *S. aureus* ATCC 6538 (Gram-positiva), *E. coli* 25922 (Gram-negativa) e *C. albicans* ATCC 10231 (Levedura), gentilmente cedido pelo Laboratório de Saúde Coletiva e Microbiologia de Alimentos da UNIFAL-MG. Os micro-organismos foram previamente cultivados (durante 24 h) e preparadas suspensões em solução salina (NaCl 0,9%) estéril a 75% de transmitância em 660 nm, de modo a fornecer  $3 \times 10^8$  UFC/ mL.

### 3.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Dentre as atividades biológicas foram avaliadas as atividades antimicrobianas, antioxidante e antiproliferativa dos extratos fúngicos.

#### **3.6.1 Avaliação da concentração inibitória mínima**

Em microplacas de 96 poços estéreis, com tampa, foram depositados 100 µL da mistura final: caldo Mueller-Hinton para bactérias, solução do extrato fúngico mais 100 µL da suspensão do micro-organismo. Para os fungos foi utilizado caldo Mueller-Hinton acrescido de 2% de extrato de levedura segundo as normas da CLSI

com modificações. Inicialmente foram utilizadas concentrações de 1,95 a 1000 µg/mL de substância por mL da mistura final.

Em triplicata foram utilizados poços como controle do crescimento bacteriano, adicionando a ele 100 µL dos meios de cultura mais 100 µL da suspensão de micro-organismos. Outros poços foram utilizados para o controle de esterilidade dos meios de cultura utilizados e em outros três poços foram feitos os controles negativos dos solventes utilizados na solubilização dos extratos (etanol e dimetilsulfoxido). Em um quarto poço foi realizado o teste de controle positivo utilizando antibióticos padrões (cloranfenicol para bactérias e cetoconazol para fungos).

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente acrescentado 50 µL do revelador rezasurina, sendo então incubadas por 2 h e realizada a leitura. A permanência da cor azul indica a inibição de crescimento dos micro-organismos, e a sua mudança para o tom rosa significa que houve crescimento microbiano, sendo o teste realizado em triplicata.

### **3.6.2 Avaliação da concentração bactericida e fungicida mínima**

Para a realização deste ensaio foram utilizados como inóculo as concentrações que não apresentaram crescimento microbiano do teste de concentração inibitória mínima. Foram retirados 50 µL de cada poço e inoculada em placas contendo ágar Mueller-Hinton e posteriormente incubadas a 37 °C, por 24 h para bactérias e fungos.

A concentração bactericida ou fungicida mínima foi aquela em que não houve crescimento no ágar inoculado, ou seja, 99,9% de morte microbiana.

### **3.6.3 Determinação da atividade antioxidante**

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pela capacidade de absorção do radical oxigênio e pela descoloração do radical ABTS.

### 3.6.3.1 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

O método ORAC utilizado aqui foi uma adaptação daquele descrito por Chisté et al (2011).

Utilizaram-se microplacas opacas com 96 poços. A solução-teste foi constituída de 30 µL de amostra/padrão, 60 µL de fluoresceína (na concentração de 4,066 mM, preparada em tampão-fosfato pH 7,4) e 110 µL de AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) na concentração de 76 nM, preparada em tampão-fosfato pH 7,4). O branco do teste foi apenas 200 µL de tampão de fosfato. Um controle foi feito com 30 µL de tampão fosfato, 60 µL de fluoresceína e 110 µL de AAPH. As leituras foram feitas em leitor de microplacas (SpectraMax-M3, dispositivos moleculares), em condições específicas de temperatura (37 °C), tempo (2 h de incubação) e fluorescência (excitação 485 nm, emissão 528 nm).

As amostras foram testadas na concentração de 100 µg/mL. Estas constituíram diluições feitas em tampão fosfato pH 7,4 a partir de soluções etanólicas preparadas com os extratos fúngicos.

O Trolox foi o padrão do teste e uma curva analítica ( $y = 35721x + 896887$ ,  $R^2 = 0,9918$ ) foi feita nas concentrações de 12,50 µM, 25,00 µM, 50,00 µM, 100,00 µM, 200,00 µM e 400,00 µM. A proteção fornecida pelos extratos (ou padrão) foi calculada usando a diferença entre a área sob a curva de decaimento de fluorescência na presença do extrato (AUC extrato) e na sua ausência (AUC branco). Por meio de equações de regressão e cálculos fornecidos pelo software, os resultados finais foram lançados na reta obtida pela curva analítica e os resultados de atividade antioxidante foram, então, expressos em equivalente Trolox (µmol de Trolox/g de extrato).

Equação de regressão:

$$AUC = 1 + \left( \frac{f_1 + f_2 + f_3 + \dots + f_i}{f_0} \right)$$

Onde:

AUC - é a área abaixo da curva

$f_0$  - é a fluorescência relativa ao tempo 0

$f_i$  - a fluorescência relativa ao tempo  $i$

A AUCnet é calculada pela subtração da AUC do controle (AUCct) do valor da AUC do extrato ou padrão (AUCam ou AUCpd), de acordo com a Equação 2:

$$\text{AUCnet} = \text{AUCam ou pd} - \text{AUC ct} \quad (\text{equação 2})$$

Os valores de AUCnet (x), obtidos na Equação 2, são plotados com os valores das concentrações (y) do trolox e, com o ajuste da curva, os resultados foram expressos em equivalentes ao trolox.

### 3.6.3.2 Método do radical ABTS

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Al-Duais et al. (2009), com algumas modificações. Os testes foram realizados em microplacas incolores de 96 poços.

O radical ABTS•+ foi produzido pela reação da solução aquosa de ABTS a 7 mM com persulfato de potássio a 140 mM. Esta mistura foi armazenada por 12 a 16 h antes da sua utilização, no escuro e à temperatura ambiente. No momento da realização do ensaio, esta solução foi diluída até se obter uma absorbância de 0,7 a 730 nm. A solução-teste, nas microplacas, foi constituída por 220  $\mu\text{L}$  desta solução e 20  $\mu\text{L}$  da solução do extrato (soluções etanólicas dos extratos fúngicos) ou do padrão. Após 6 minutos do preparo desta mistura, a leitura foi feita a 730 nm em leitor de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices). O branco do teste foi a solução tampão fosfato.

Como padrão, utilizou-se o Trolox construindo curva analítica ( $y = -669,18x + 288,98$ ,  $R^2 = 0,9965$ ) com as concentrações de 12,50  $\mu\text{M}$ , 25,00  $\mu\text{M}$ , 50,00  $\mu\text{M}$ , 100,00  $\mu\text{M}$ , 150,00  $\mu\text{M}$  e 200,00  $\mu\text{M}$ . Desta forma, os resultados de atividade antioxidante pelo método ABTS foram expressos como equivalente Trolox ( $\mu\text{M}$  de Trolox/g de extrato).

### 3.6.4 Determinações da atividade antiproliferativa

O ensaio da sulforodamina B (SRB) foi utilizado para a avaliação da atividade citotóxica dos extratos de acordo com MONKS et al. (1991). Este ensaio será realizado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA- Unicamp- Campinas/SP).

Oito linhagens de células tumorais humanas e uma não tumoral (tabela 1), gentilmente cedidas pelo *National Cancer Institute* (NCI- EUA), foram utilizadas e mantidas em 5 mL de meio RPMI suplementados com 5% de soro fetal bovino e incubadas a temperatura de 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 1-** Linhagens celulares empregadas na avaliação da atividade antiproliferativa.

<b>Linhagem</b>	<b>Órgão/Doença</b>
U251	SNC- Glioma
MCF- 7	Mama- Adenocarcinoma
NCI-ADR/RES	Ovário- Adenocarcinoma
786-0	Rim- Adenocarcinoma
NCI- H460	Pulmão- Adenocarcinoma
PC- 3	Prótata- Adenocarcinoma
OVCAR- 03	Ovário- Adenocarcinoma
HT29	Colon- Adenocarcinoma
HaCat	Queratinócito Humano- Linhagem não tumoral

Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

Foram inoculados 100 µL/compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc<sup>®</sup>), de uma suspensão com densidade de inoculação entre 3x10<sup>4</sup> e 6,5x10<sup>4</sup> cel/mL em meio RPMI/SFB acrescido de 50 µg/mL de gentamicina (Schering Plus<sup>®</sup>). Após 24 h de incubação a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, foi adicionado 100 µL/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 25 µg/mL e 250 µg/mL).

Para preparação das amostras, uma alíquota de 10 mg do extrato foi dissolvida em 100  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  dessa solução-mãe foi dispersa em 950  $\mu\text{L}$  de meio RPMI/ 5% SFB, para preparação da solução de trabalho. Esta foi diluída sucessivamente, em meio de cultura, para preparação das concentrações finais de 0,25; 2,50; 25,00 e 250,00  $\mu\text{g/mL}$ . A concentração final de DMSO não interfere no crescimento celular.

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico Doxorrubicina, nas concentrações de 0,02; 0,25; 2,50 e 25,00  $\mu\text{g/mL}$ . Neste momento, procedeu-se a fixação com ácido tricloroacético (TCA) a 50% da placa controle chamada  $T_0$ , que permitir determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48 h de incubação, as células foram fixadas com 50  $\mu\text{L}$ /compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1h a 4  $^{\circ}\text{C}$ ; a seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as placas foram coradas com 50  $\mu\text{L}$ /compartimento de SRB 0,4 % (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 60 minutos a 4  $^{\circ}\text{C}$ ; em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma<sup>®</sup>), 10  $\mu\text{M}$  e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizado em 540 nm em leitor de microplacas.

Com os valores médios de absorbância para cada concentração do extrato, a porcentagem de crescimento (%C) foi calculada de acordo com as seguintes fórmulas:

- Se  $T > T_1 \rightarrow$  estímulo de crescimento celular;
- Se  $T_1 > T \geq T_0 \rightarrow$  atividade citostática:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/(T_1-T_0)]$ ;
- Se  $T < T_0 \rightarrow$  atividade citocida:  $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$ ;

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula;

$T_1$  = absorbância do branco de células;

$T_0$  = absorbância do controle de células na placa  $T_0$ .

Gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração do extrato foram gerados para cada uma das linhagens testadas. Três concentrações efetivas denominadas: GI<sub>50</sub> (do inglês *growth inhibition*), concentração necessária para interromper em 50 % do crescimento celular e TGI (do inglês *total growth inhibition*), concentração necessária para que ocorra 0 % de crescimento celular) foram calculadas por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 7.5.

### 3.7 ANÁLISE QUÍMICA DOS EXTRATOS

A determinação da composição química foi feita por meio da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa e através da quantificação de compostos fenólicos totais.

#### **3.7.1 Determinação da composição química dos extratos por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG-EM)**

A derivatização das amostras foi realizada de acordo com o método descrito por Fernández et al. (2008), com algumas modificações. O ensaio foi conduzido no Departamento de Agro-Indústria, Alimentos e Nutrição da Esalq-USP-Piracicaba/SP.

Aproximadamente 15 mg das amostras (extratos fúngico e caldo czapek) foram colocadas em vials juntamente com 100 µL do reagente derivatizante MSTFA (N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida). A reação ocorreu na temperatura de 60 °C, durante 15 min. Após esse tempo, o reagente derivatizante foi removido sob fluxo de nitrogênio e o produto da reação foi rediluído em hexano (600 µL).

As análises em CG-EM foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC 2010, acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu, modelo QP 2010 Plus. A separação ocorreu em coluna capilar (RTX5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). A temperatura inicial da coluna foi de 80 °C, durante 1 min até atingir 320 °C, a uma taxa de 20 °C/min e permaneceu nessa temperatura por 20

min, totalizando 69 min de análise. Gás hélio foi utilizado como gás de arraste (vazão na coluna de 1 mL/min). A temperatura do injetor foi de 280 °C e o volume de injeção foi de 0,4 µL em modo “split” numa razão de 1:20. A integração foi feita utilizando-se o software LabSolutions-GCMS solution, e a identificação dos compostos detectados foi realizada por comparação com os dados dos espectros de massas da biblioteca Wiley8.

### **3.7.2 Determinação de compostos fenólicos totais**

A análise de compostos fenólicos totais dos extratos foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu por Singleton et al. (1999), utilizando ácido gálico como padrão.

O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. Em uma microplaca (300 µL transparente) foram adicionados 20 µL das amostras nas seguintes concentrações: 1/1000, 1/800, 1/600, 1/400, 1/200, 1/100, 1/10, e a elas foram adicionados 100 µL reagente Folin-Ciocalteu. Após 5 minutos adicionou-se o carbonato de potássio 7,5% (75 µL) à amostra deixando agir durante 40 min e em seguida a absorbância foi medida à 740 nm. Uma amostra em branco (20 µL de água destilada) foi conduzida nas mesmas condições e os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de ácido gálico, sendo o teste realizado em triplicata.

### 3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados de atividades antioxidantes (ABTS e ORAC) e quantificação total de compostos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Estes foram avaliados por análise de variância simples (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste Tukey ( $p < 0,01$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos conforme as metodologias propostas estão descritos nos itens posteriores juntamente com a discussão.

### 4.1 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS ÀS PLANTAS DA ESPÉCIE *ANNONA CRASSIFLORA*.

Conforme o item 3.1 foram isolados e caracterizados 192 fungos (anexo A) extraídos das folhas de 5 árvores de *A. crassiflora* em diferentes épocas do ano. Em todas as coletas foram utilizados um total de 20 folhas por árvore. Fungos endofíticos extraídos de folhas em período de senescência representam 15,62% (30 fungos), os fungos extraídos a partir de folhas jovens contabilizaram 11,98% (23 fungos) e das folhas adultas 72,39 % (139 fungos). Os extratos fúngicos que apresentaram melhores resultados na triagem foram de folhas adultas (A4F14F1 E A5F18F7) e jovens (A1F2F1).

O número de organismos endofíticos isolados pode variar devido a diversos fatores, sendo a idade das folhas um fator que pode interferir nos resultados e também o ambiente. Nos estudos de Pimentel (2006) foram isolados um total de 4.406 colônias dos fragmentos de folhas de erva mate, com um maior número de colônias em folhas adultas e em erval nativo, e as diferenças foram significativas entre os fatores origem e idade. Essa diferença de intensidade luminosa e período de exposição pode repercutir diretamente na população de fungos endofíticos, organismos sensíveis à radiação solar (PETRINI, 1986).

Outro fator que pode afetar diretamente os fungos endofíticos é a umidade do ambiente. Sob a mata, existe um ambiente mais úmido, mais propício à sua sobrevivência, enquanto que, a pleno sol, a umidade tende a ser menor, ocorrendo o ressecamento da folha, alterando a presença destes fungos já que ele apresenta baixa tolerância à radiação (PIMENTEL et al., 2006)

O isolamento dos fungos endofíticos para a análise dos seus metabólitos envolve cuidados especiais dentre eles a exclusão dos micro-organismos epifíticos,

portanto um dos processos mais comuns de isolamento vem a ser a lavagem das partes vegetais (FISHER; PETRINI, LAPPIN- SCOTT, 1992; PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993; QUADT-HALLMANN; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W, 1997). Este tratamento evidencia a importância de determinar com precisão o tempo e concentração de compostos que foram utilizados durante o tratamento de lavagem, verificando a textura do material vegetal utilizado, no intuito de eliminar apenas os micro-organismos da superfície vegetal sem destruir os endofíticos (PEREIRA; AZEVEDO; PETRINI, 1993; SCHULTZ et al., 1993; FISHER et al., 1995).

O isolamento destes organismos pode ser prejudicado em decorrência da dificuldade de crescimento ou até mesmo por não crescerem *in vitro*. Nos últimos anos foram descritas várias técnicas que facilitam o crescimento dos micro-organismos mais exigentes, fornecendo condições de cultivo semelhantes ao seu habitat natural, no intuito de que estes mantenham a produção dos seus metabolitos da mesma maneira que produziam no interior do tecido vegetal. No trabalho de Tejesvi et al. (2011), os autores utilizaram a temperatura de 4 °C, à qual é considerada baixa para o crescimento fúngico, no intuito de reproduzir o ambiente natural da *Rhododendron tomentosum*, planta cultivada na Finlândia.

Dentre os fungos isolados e os extratos produzidos foram selecionados três extratos fúngicos (A1F2F1, A4F14F1, A5F18F7) de acordo com seu desempenho na triagem antimicrobiana, cujos halos de inibição foram maiores do que 20 mm para mais de um micro-organismo e submetidos a testes para verificação de suas atividades.

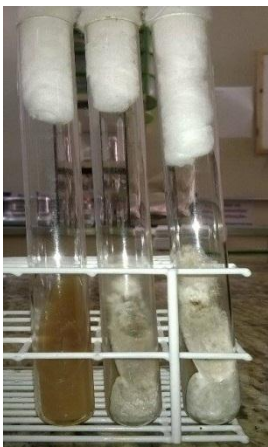
## 4.2 PRÉ-SELEÇÃO DAS LINHAGENS FÚNGICAS

Para a seleção dos fungos foram medidos os halos (diâmetro em mm) formados pelos extratos fúngicos observados no ensaio da difusão em ágar e foram selecionados micro-organismos cujos extratos apresentaram diâmetros maiores que 20 mm em pelo menos dois dos micro-organismos testados (anexo B). Estes foram submetidos a uma repetição para confirmação dos resultados.

Dos 192 fungos isolados neste trabalho, 112 foram avaliados frente a patógenos. Dentre os 112 extratos fúngicos testados 73,22% (82 extratos) apresentaram inibição contra algum dos micro-organismos. Ao analisar

isoladamente as atividades verificou-se que o *S. aureus* foi inibido por 45,54% (51 extratos) dos extratos testados, já a *E. coli* foi inibida por 54,46% (61 extratos) e a *C. albicans* foi inibida por 31,25% (35 extratos) dos extratos. Com base nestes resultados foram selecionados os extratos fúngicos A1F2F1, A4F14F1 e A5F18F7 (Figura 3), que apresentaram halos maiores que 20 mm para dois ou mais microorganismos.

**Figura 3-** Fungos selecionados por meio da triagem: A1F2F1, A4F14F1 e A5F18F7.



Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

Da mesma maneira, os extratos fúngicos da *A. crassiflora* apresentaram um resultado satisfatório demonstrando sua capacidade de inibição contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Segundo Souza et al. (2002), as plantas do cerrado brasileiro como a *A. crassiflora* apresentam atividade antimicrobiana quando analisado seus extratos *in vitro* inibindo o crescimento das espécies de *Candida* sp e *Cryptococcus neoformans*. Silva et al. (2001) realizaram experimentos com extratos da folha de *Annona crassiflora* investigando contra 52 cepas de *C. albicans*, quatro cepas de *C. tropicalis* e três cepas de *C. krusei* isoladas de pacientes HIV positivos com candidose orofaríngea. O extrato das folhas de *A. crassiflora* foi ativo contra todos os microrganismos e apresentou a maior atividade antifúngica com base nos valores do CIM (concentração inibitória mínima).

Segundo Silva (2014) extratos da casca do fruto de *A. crassiflora* apresentaram resultados superiores ao padrão (clorexidina) na triagem para a verificação da atividade antibacteriana por meio da difusão em ágar.

De acordo com Guimarães et al. (2008) foram isolados 39 fungos endofíticos da *Viguiera arenaria* e *Tithonia diversifolia*, e verificaram que 64,1% dos extratos acetato de etila obtidos por meio da fermentação em caldo Czapeck, exibiram atividade contra *C. albicans* ATCC 10231, evidenciando que estes endófitos também são capazes de produzir compostos antifúngicos.

A análise da atividade antimicrobiana dos extratos da fermentação fúngica da *A. crassiflora* que foram testados revelou que os metabólitos produzidos são capazes de inibir micro-organismos tanto Gram-negativos quanto os Gram-positivos, evidenciando sua importância como fonte alternativa para a produção de novos agentes antimicrobianos.

As bactérias Gram-negativas apresentam uma natureza mais complexa da parede celular demonstrando uma maior resistência à ação dos antibióticos, já que é necessário que este seja capaz de atravessar efetivamente a barreira lipídica, constatando a relevância do estudo dos metabolitos produzidos pelos fungos endofíticos, sendo eles capazes de atravessar essa barreira e inibir o crescimento das bactérias.

### 4.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Dentre as atividades biológicas foram avaliadas as atividades antimicrobianas, antioxidante e antiproliferativa dos extratos fúngicos.

#### **4.3.1 Avaliação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida e fungicida mínima**

Na Tabela 2 estão descritos os resultados de atividade antimicrobiana para os extratos de acetato de etila dos extratos A1F2F1, A4F14F1, A5F18F7, contra a

cepa de *S. aureus*. Os extratos foram testados também contra *C. albicans* e *E.coli*, porém não apresentaram atividade dentro das concentrações testadas.

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana dos extratos acetato de etila de isolados fúngicos da *Annona crassiflora*

<i>S. aureus</i>			
Extrato	Halo de inibição (mm)	CIM (a) (µg/mL)	CBM (b) (µg/mL)
A1F2F1	36	N.A.	N.A.
A4F14F1	35	500-1000	N.A.
A5F18F7	25	250-500	1000

a) CIM: concentração inibitória mínima; b) CBM: concentração bactericida mínima;

NA: não ativo para concentrações testadas (0,97-1000 µg.mL<sup>-1</sup>).

Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

De acordo com a Tabela 2, o extrato A1F2F1 não foi capaz de inibir o crescimento do micro-organismo *S. aureus* nas concentrações testadas. Observa-se que o extrato A4F14F1 apresentou CIM para a concentração de 500- 1000 µg contra *Staphylococcus aureus*, e não apresentou atividade bactericida, sendo então considerado bacteriostático nesta concentração. Já o extrato A5F18F7 apresentou resultados superiores quando comparado aos demais, sendo capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* dentro da faixa de concentração de 250-500 µg/mL, e ainda exibiu características bactericidas na concentração de 1000 µg/mL.

A avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada considerando a variação das concentrações de 1000 a 0,97 µg/mL. Essas concentrações foram definidas até este valor máximo, pois um valor superior não seria viável para utilização futura, porque de acordo com Rios e Recio (2005), na busca produtos naturais, os extratos que apresentam concentrações antimicrobianas maiores que 1000µg/mL devem ser evitados.

O extrato fúngico A5F18F7 apresentou maior CIM e apresentou menor halo no teste pour plate, este resultado pode ser explicado devido a fatores que podem afetar a suscetibilidade do método, no qual a composição do meio utilizado pode

interferir no tamanho do halo formado. Segundo Barry e Thornsberry (1991) há substâncias no meio de cultura que influenciam a susceptibilidade do teste, a timidina antagoniza a atividade de sulfonamidas e trimetroprinas, conduzindo a um resultado falso de resistência a tais agentes, apesar do meio Muller-Hinton apresentar baixa concentração de timina, esta pode ter sido a causa do extrato que apresentou menor halo contra *S. aureus* demonstrar um maior CIM quando comparado com os outros extratos testados.

A atividade de fungos endofíticos foi comprovada também por Fernandes et al. (2009), que estudaram um total de 22 fungos endofíticos isolados de café (*Coffea arabica* L.), foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*, para os quais as CIM variaram entre 50-100 µg/mL para *S. aureus* e 400-800 µg/mL para *E. coli*.

#### **4.3.2 Determinação da atividade antioxidante**

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos fúngicos foram utilizados o método ORAC (capacidade de absorção de radical oxigênio e a descoloração do radical ABTS).

##### **4.3.2.1 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)**

O método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio) é um ensaio que mede a força antioxidante de alimentos e de compostos químicos (DUXBURY, 2005).

**Tabela 3**– Atividade antioxidante equivalente ao trolox pelo método ORAC

<b>Extrato fúngico</b>	<b>Média (mmol eq trolox.<sup>-1</sup> g extrato ± desvio padrão)</b>
A1F2F1	21,42 ± 0,31 <sup>b</sup>
A4F14F1	246,35 ± 15,91 <sup>a</sup>
A5F18F7	22,16 ± 0,97 <sup>b</sup>

Nota: médias seguidas da mesma letra não se diferem estatisticamente pelo método Tukey (0,001)

Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

De acordo com a Tabela 3, os resultados obtidos pelo teste de absorção do radical oxigênio mostrou que os extratos A5F18F7 e A1F2F1 demonstraram resultados semelhantes estatisticamente, já o A4F14F1 se destacou frente aos demais, com resultado significativamente superior.

Deve-se ressaltar que os extratos avaliados são brutos, e compostos isolados a partir dos mesmo poderão ter uma atividade significativamente maior. Como no estudo de YE et al. (2013), que isolaram a substância flavipina do extrato do fungo endofítico *Chaetomium globosum* CDW7 proveniente da *Ginkgo biloba* e obtiveram atividade antioxidante *in vitro* superior aos padrões avaliados (vitamina C, BHT e trolox).

Segundo Huang et al. (2007) a capacidade antioxidante das culturas de fungos endofíticos estudados esta correlacionada ao seu conteúdo de fenólicos totais.

Já foi relatada a capacidade antioxidante de fungos endofíticos como no caso descrito por Huang et al. (2007), que isolaram 292 fungos endofíticos com ação antioxidante de folhas, caules, flores, frutos e raízes de 29 espécies diferentes de plantas chinesas, sendo treze pertencentes à família Apocynaceae, sete à Asclepiadaceae, quatro à Polygonaceae, três à Asteraceae, uma à Lamiaceae e uma Solanaceae. Dentre os fungos endofíticos obtidos, dez foram capazes de produzir substâncias antioxidantes em concordância com suas plantas hospedeiras, que também produziam estes metabólitos em elevadas concentrações, indicando a

capacidade de produção de compostos antioxidantes por estes micro-organismos, sendo uma fonte alternativa para a busca de metabólitos.

Os resultados obtidos para os extratos foram significativos comparando os extratos, porém em relação a outras amostras não foi muito acentuados. Como no caso do própolis do Uruguai cuja atividade atingiu valores bastante elevados, que verificou o valor máximo de atividade antioxidante encontrado foi de 8000  $\mu\text{mol}$  de Trolox/g de própolis (SILVA et al., 2011) e também de estudos com a casca da jabuticaba que apresentaram alta atividade antioxidante, de  $25514,24 \pm 3037,24$   $\mu\text{mol}$  Trolox/g. (LEITE-LEGATTI et al., 2012)

#### 4.3.2.2 Ação dos extratos sobre a descoloração do radical ABTS

Este método de determinação da atividade antioxidante possui como princípio a descoloração do radical ABTS em função da sua redução por um antioxidante. Essa reação é monitorada espectrofotometricamente e depende, principalmente, da concentração, do poder da substância antioxidante e do tempo de reação. (RE et al., 1999). Os resultados obtidos para os extratos fúngicos estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4-** Atividade antioxidante equivalente ao trolox pelo método ABTS

<b>Extrato</b>	<b>Média (mmol eq trolox/g extrato ± desvio padrão)</b>
A1F2F1	0,10 ± 0,01 <sup>b</sup>
A4F14F1	1,85 ± 0,35 <sup>a</sup>
A5F18F7	0,17 ± 0,01 <sup>b</sup>

Nota: médias seguidas da mesma letra não se diferem estatisticamente pelo método Tukey (0,001)

Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

Os valores da atividade antioxidante equivalente ao trolox utilizando o método ABTS demonstrou a atividade de todos os extratos, enfatizando a melhor atividade do extrato fúngico A4F14F1 em comparação as demais.

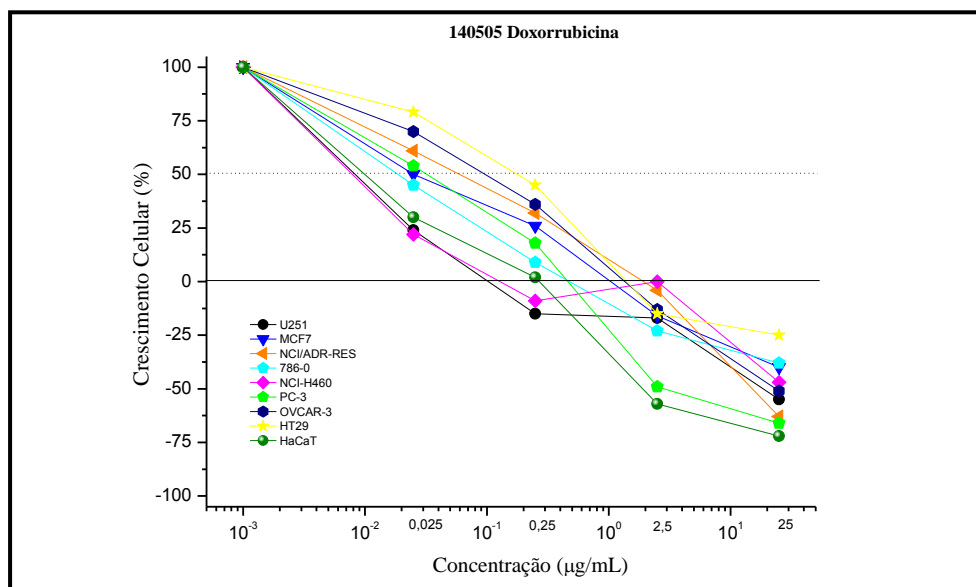
A análise dos extratos fúngicos indicou a produção de compostos capazes de capturar radicais livres. Da mesma maneira Song et al. (2005) relataram uma espécie de fungo endofítico pertencente ao gênero *Cephalosporium* capaz de produzir a substância grafislactona A, um metabólito fenólico com forte atividade antioxidante e de conversão dos radicais livres.

A atividade antioxidante dos extratos fúngicos é baixa quando contrastadas com a atividade de frutas como no relato de Rockenbach et al. (2008), que testaram extratos etanólicos de bagaço de uva das variedades Ancelota e Tannat e estas apresentaram valores  $389,9 \pm 3,8$  e  $398,1 \pm 2,8$   $\mu\text{mol}$  equivalentes em trolox/g, respectivamente. De acordo com resultados obtidos e estudos relatados na literatura pode-se correlacionar fungos endofíticos e sua capacidade de produção de compostos antioxidante mesmo que em baixa quantidade, devendo ressaltar que os extratos utilizados neste trabalho são brutos, e portanto, podem ter sua atividade potencializada no caso do isolamento de compostos.

### 4.3.3 Determinação da atividade antiproliferativa

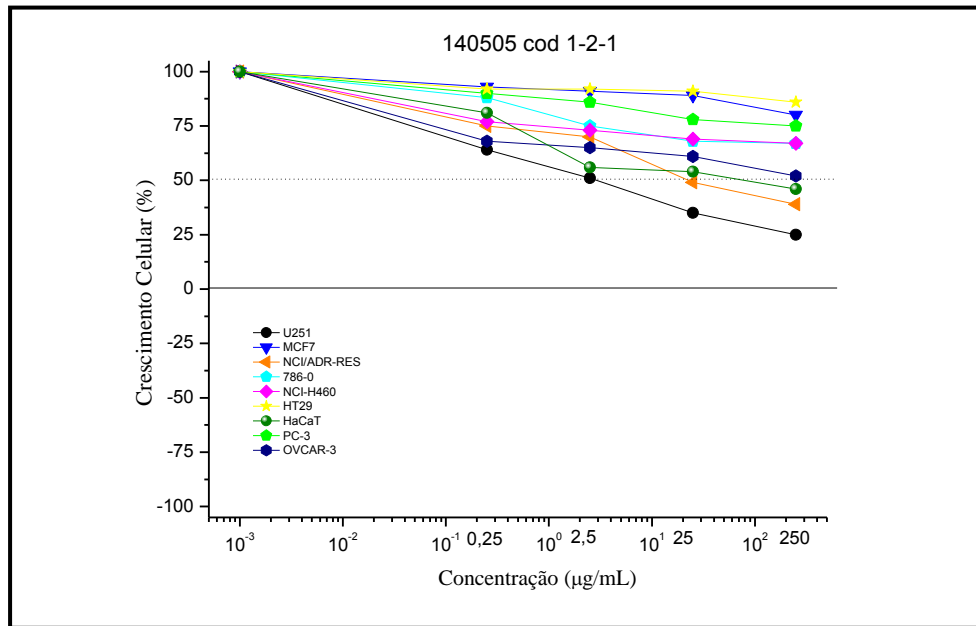
As atividades antiproliferativa exercidas pelos extratos acetato de etila dos fungos endofíticos e da Doxorubicina utilizada como padrão são demonstradas nas Figuras 4, 5, 6 e 7.

**Figura 4-** Atividade da dexorrubicina no ensaio antiproliferativo.



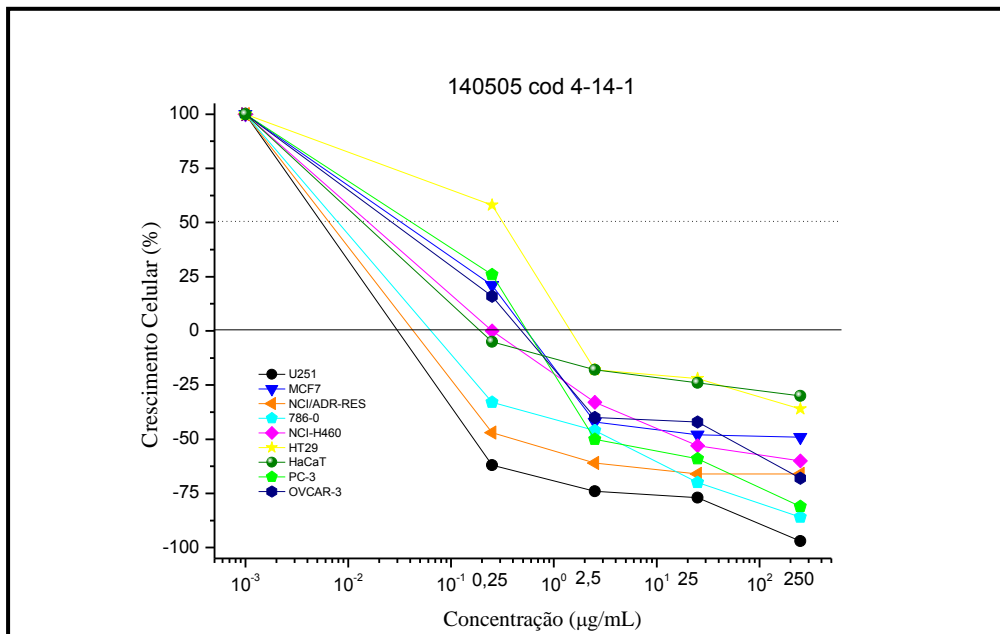
Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

**Figura 5** - Atividade do extrato A1F2F1 no ensaio antiproliferativo.



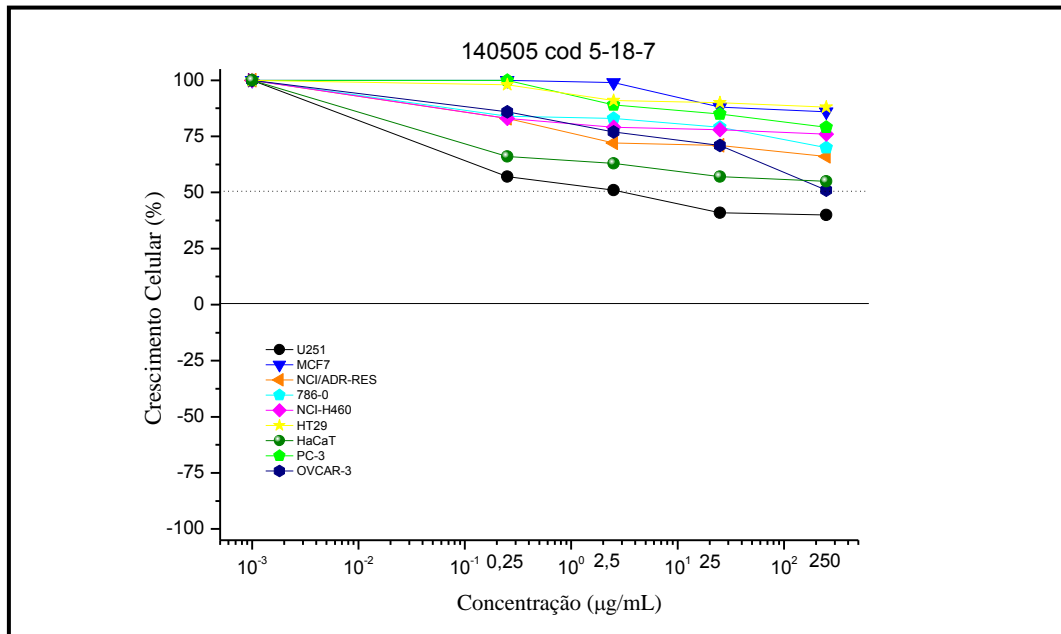
Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

**Figura 6** - Atividade do extrato A4F14F1 no ensaio antiproliferativo.



Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

**Figura 7** - Atividade do extrato A5F18F7 no ensaio antiproliferativo.



Nota: Linhagens celulares testadas: 2=U251(glioma); m=MCF-7 (mama); a= NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7= 786-0 (rim); 4= NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p= PC-3 (prótata); o= OVCAR-03 (ovário); h= HT29 (colon). Linhagem não tumoral humana: q= HaCaT (queratinócito).

Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

Para a avaliação da atividade antiproliferativa foram empregadas oito linhagens de células tumorais humanas. Na Tabela 9 encontram-se os valores da concentração necessária para inibição de 50% do crescimento celular (GI<sub>50</sub>), expressos em µg/mL, para os extratos fúngicos, contra linhagens de células humanas.

Os gráficos com a atividade dos extratos contra células de linhagens tumorais evidenciam a potencialidade do extrato A4F14F1, apresentando curvas similares ao padrão utilizado, e capaz de inibir o crescimento de todas as linhagens tumorais testadas. Esta destaca-se também por sua capacidade de seleção de linhagens tumorais, onde células de linhagem não tumoral obteve uma menor atividade do extrato.

**Tabela 5.** Inibição parcial do crescimento celular (GI<sub>50</sub>), expressos em µg/mL, de linhagens tumorais frente aos extratos fúngicos.

<b>Padrão e Extratos</b>	<b>2</b>	<b>M</b>	<b>a</b>	<b>7</b>	<b>4</b>	<b>p</b>	<b>o</b>	<b>h</b>	<b>q</b>	<b>Média log GI<sub>50</sub></b>
<b>Doxorrubici- na</b>	< 0,02	0,03	0,05	< 0,02	<0,02	0,03	0,08	0,15	0,02	- 1,40
<b>A1F2F1</b>	2,50	250,00	35,20	>250,00	>250,00	>250,00	>250,00	>250,00	59,60	> 2,01
<b>A4F14F1</b>	< 0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	< -0,60
<b>A5F18F7</b>	2,70	>250,00	>250,00	>250,00	>250,00	>250,00	>250,00	>250,00	>250,00	> 2,17

Nota: Linhagens tumorais humanas: 2=U251(glioma); m=MCF-7 (mama); a= NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 7= 786-0 (rim); 4= NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p= PC-3 (prótata); o= OVCAR-03 (ovário); h= HT29 (colon). Linhagem não tumoral humana: q= HaCat (queratinócito).

Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

Para análise e interpretação dos resultados de  $GI_{50}$  (tabela 5) foi considerado o critério do NCI (Instituto Nacional do Câncer – EUA) (Fouche et al., 2008), que classifica o efeito citostático dos extratos como inativo (média > 1,5), fraco (1,1 < média < 1,5), moderado (1,1 > média > 0) e potente (média < 0) conforme resultado da média do  $\log GI_{50}$ .

Verificam-se valores extremos de  $GI_{50}$ , variando entre <0,60 e > 250,000. Calculando a média do  $\log$  de  $GI_{50}$  temos os extratos A1F2F1 e A5F18F7 classificados como inativos.

O extrato A4F14F1 destacou-se dos demais, pois exibiu atividade classificada como potente de acordo com os critérios do NCI, no qual foi capaz de inibir o crescimento de células tumorais mesmo em concentrações muito baixas. Além da sua boa atividade contra todas as linhagens tumorais testadas, este apresentou uma pequena atividade contra célula de linhagem não tumoral, evidenciando sua capacidade de seleção às células tumorais. Este extrato demonstrou também melhores atividades nas análises antioxidantes e uma maior quantidade de fenólicos totais, ressaltando a capacidade potencial do extrato.

Comparando os valores de  $GI_{50}$  do extrato A4F14F1 e a Doxorrubicina ambos foram classificados como potentes, permitindo constatar a capacidade de inibição do crescimento celular pelo extrato.

A investigação de endófitos para a produção de substâncias com potencial anticarcinogênico é intensa, principalmente por já apresentar resultados satisfatórios como no caso do taxol (um diterpenóide com atividade antitumoral), produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* e isolado da *Taxus brevifolia*, como relatado por Stierle, Strobel e Stierle, 1993). Outro exemplo é a substância cajanol, extraída das raízes da espécie vegetal *Cajanus cajan* [L.] Millsp., que tem atividade inibitória sobre antígeno específico prostático, um novo agente antitumoral de mama que induz a apoptose das células tumorais (DUKER-ESHUN et al., 2004; LIU et al., 2011)

Sem dúvida a busca de novas drogas para o tratamento do câncer é fundamental. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a atividade de extratos de fungos endofíticos para este fim, sendo, porém necessários estudos mais aprofundados verificação de sua eficácia e potencial aplicação.

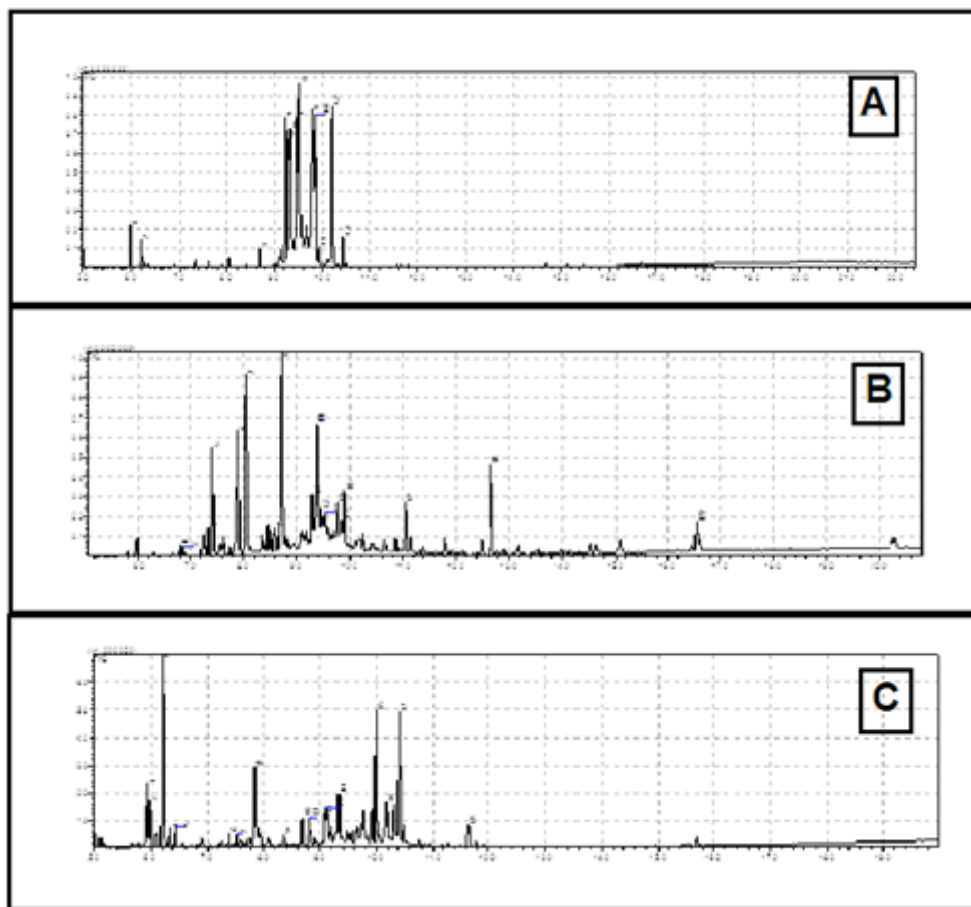
#### 4.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS

A determinação da composição química foi feita por meio da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa e através da quantificação de compostos fenólicos totais.

##### **4.4.1 Determinação da composição química dos extratos por Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (CG-EM)**

Os cromatogramas e a composição química para os extratos fúngico mais ativos A1F2F1, A4F14F1, A5F18F7 estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 8-A, 2-B E 2-C e nas Tabelas 6, 7 e 8 de acordo com técnicas e condições expostas anteriormente no item 3.7.1.

**Figura 8-** A) Cromatograma do extrato de acetato de etila A1F2F1  
B) Cromatograma do extrato de acetato de etila A4F14F1  
C) Cromatograma do extrato de acetato de etila A5F18F7



Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

**Tabela 6-** Composição química do extrato acetato de etila do isolado A1F2F1.

(Continua)

<b>Nº pico</b>	<b>Compostos Identificados</b>	<b>Tempo De Retenção</b>	<b>m/z</b>	<b>%área</b>
1	Ácido fosfórico, tris (trimetilsilil) ester	6.017	299(100) 73(48) 300(23) 314(16) 301(11) 133 (7)	2.35
2	Ácido butanodióico, bis (trimetilsilil) ester	6.242	147(100) 73(37)148(16) 149(8) 172(4) 249(1)	1.38
3	2,5- dihidroxibenzil álcool 3tms	8.717	73(100) 194(73) 356(58) 267(28) 147(21) 357(19) 195(16)	1.07
4	Glucofuranoside methyl2,3,5,6- tetraquis-o (trimetilsilil) -, -d-alpha D-frutose1,3,4,5,6- pentaquis-o (trimetilsilil) -	9.258	217(100) 73(62) 218(51) 129(45) 191(21) 204(21) 435(1)	10.59
5 E 6	D-frutose1,3,4,5,6- pentakis-o- (trimethylsilyl)-	9.308 e 9.375	73(100) 217(86) 437(55) 147(25) 438(21) 218(17) 439(9)	21.53
7	L-altrose2,3,4,5,6- pentakis-o- (trimethylsilyl)-	9.500	217(100) 73(51) 204(27) 191(21) 218(21) 147(18) 319(12) 348(1)	11.13

(Conclusão)				
Nº pico	Compostos identificados	Tempo De Retenção	m/z	%área
8	Glucofuranoside, methyl2,3,5,6-tetrakis- o-(trimethylsilyl)- ,alpha-d-	9.550	217(100) 73(62) 218(51) 129(45) 191(21) 204(21) 435(1)	13.23
9	1,2,3,4,6-pentaquis-o (trimetilsilil) hexopyranose	9.792	204(100) 73(56) 191(50) 217(24) 147(22) 205(21) 129(10) 436(1)	13.85
10	Glucopirranose 1,2,3,4,6 pentaquis-o (trimetilsilil) hexopyranose d	9.875	204(100) 73(73) 217(63) 191(35) 246(23) 147(22) 205(20) 363(2) 73(100) 217(21)	10.36    1.03
11	N.I.	9.950	147(19) 305(16) 318(16) 191(16) 204(12) 319(7) 320(3)	
12	1,2,3,4,6-PENTAQUIS O-TRIMETILSILIL) HEXOPYRANOSE	10.233	204(100) 73(56) 191(50) 217(24) 147(22) 205(21) 129(10) 436(1)	11.75
13	9-FENIL-9H- CARBAZOLE	10.475	73(100) 147(46) 333(46) 392(38) 217(23) 319(20) 205(16) 103(15)437(1)	1.73

Nota: N.I. refere-se a picos não identificados na biblioteca Wiley8.

Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

De acordo com a Tabela 6, o extrato A1F2F1 apresentou um dos picos com maior intensidade relativa a D-Frutose, este composto orgânico pertencente ao grupo dos monossacarídeos pode ter proveniência do caldo Czapek, que segundo Carvalho (2012), ao realizar o CG-EM do caldo Czapek detectou a presença do composto com intensidade relativa de 10,86%.

**Tabela 7.** Composição química do extrato acetato de etila do isolado A4F14F1

(Continua)

Nº Pico	Compostos Identificados	Tempo de Retenção	m/z	%área
1	N.I.	6.806	73 (100) 147 (31) 155 (16) 140 (15) 75 (10) 228 (6) 273 (1)	0.57
2	1,3 - BIS (trimetilsiloxi) benzeno	6.806	239 (100) 254 (73) 73 (42) 240 (21) 112 (16) 255 (16) 45 (10) 133(8) 256 (7)	0.46
3	Orcinol (5-METHYLRESORSIN OL) DITMS	7.250	268 (100) 253 (75) 73 (53) 237 (35) 269 (25) 254 (18) 179 (13) 271 (2)	1.31
4	N.I.	7.325	179 (100) 253 (93) 223 (82) 268 (78) 739 (74) 105 (38) 163 (36) 147 (28) 270 (7)	1.47
5	N.I.	7.405	147 (100) 73 (61) 134 (51) 183 (42) 75 (26) 143 (23) 81 (22) 209 (16) 273 (1)	7.27
6	Ácido benzoico, 3 - [(trimetilsilil) oxi] - TRIMETHYLSIL ESTER	7.899	267 (100) 223 (58) 282 (41) 73 (35) 193 (31) 268 (23) 224 (12) 269 (10) 284 (4)	7.49
7	N.I.	8.052	73 (100) 183 (44) 226 (36) 75 (31) 170 (25) 198 (18) 55 (17) 197 (15) 45 (13) 228 (2)	20.02

(Continua)				
Nº Pico	Compostos Identificados	Tempo de Retenção	m/z	%área
8	N.I.	8.589	73 (100) 217 (56) 194 (26) 75 (23) 103 (18) 230 (16) 147 (15) 218 (13) 215 (12) 130 (9)	2.54
9	2,5 - dihidroxibenzil ÁLCOOL 3 TMS	8.701	73 (100) 356 (75) 194 (66) 267 (24) 357 (24) 147 (17) 341 (15) 45 (15) 195 (11) 358 (11)	20.34
10	N.I.	9.287	73 (100) 263(60) 110 (40) 235 (35) 75 (33) 226 (29) 138 (24) 42 (17) 55 (14) 153 (14)	2.47
11	N.I.	9.378	73 (100) 226 (70) 110 (44) 263 (42) 75 (41) 235 (35) 138 (26) 153 (22) 42 (18) 323 (16)	13.41
12	N.I..	9.465	73 (100) 191 (42) 217 (16) 147 (13) 75 (13) 110 (11) 74 (8) 254 (7) 45 (7) 192 (7)	0.94
13	N.I.	9.514	73 (100) 191 (74) 445 (24) 147 (24) 355 (19) 217 (18) 192 (13) 187 (11) 446 (11) 74 (8)	0.75
14	N.I.	9.763	73 (100) 371 (34) 147 (24) 204 (19) 497 (17) 372 (12) 143 (12) 217 (11) 191 (10) 75 (10)	2.68
15	N.I.	9.882	73 (100) 242 (36) 184 (30) 169 (29) 211 (24) 75 (18) 263 (16) 110 (15) 42 (11) 45 (100)	0.65
16	N.I.	9.378	185 (100) 73 (55) 288 (25) 143 (19) 186 (19) 298 (17) 157 (16) 299 (14) 75 (10) 147 (8)	2.81
17	N.I.	11.054	159 (100) 73 (79) 185 (56) 175 (48) 173 (47) 173 (43) 200 (41) 190 (33) 119 (32) 43 (28)	3.81
18	N.I.	12.674	73 (100) 197 (54) 188 (43) 173 (42) 143 (41) 119 (22) 147 (22) 103 (21) 107 (21) 132 (21)	8.23

					(Conclusão)
Nº Pico	Compostos Identificados	Tempo de Retenção	m/z		%área
19	Benzaldeído, 2,5 - bis [(trimetilsilil) OXY]-	16.561	267 (100) 268 (38) 73 (33) 269 (13) 251 (10) 103 (4) 75 (4) 217 (3) 252 (3) 193 (3)		2.78

Nota: N.I. refere-se a picos não identificados na biblioteca Wiley8.

Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

No extrato A4F14F1 foi detectada a presença do álcool dihidroxibenzil com intensidade relativa de 20,34% e o composto com segunda maior intensidade 20,02% seu pico não foi identificável na biblioteca Wiley8, podendo este ser um composto com atividade (Tabela 7).

**Tabela 8.** Composição química do extrato acetato de etila do extrato do isolado A5F18F7

					(Continua)
Nº Pico	Compostos Identificados	Tempo de Retenção	m/z		%área
1	3,7 dioxo-2,8 DISILANONANE, 2,2,8,8- TETRAMETIL-5	5.941	147 (100) 73 (92) 205 (50) 117(39) 103 (34) 218 (20) 133 (19) 148 (15) 149 (10) 129 (9)		5.63
2	[(TRIMETHYLSIL) oxil] - ÁCIDO FOSFÓRICO, TMS	5.985	299 (100) 73 (46) 300 (25) 314 (18) 301 (13) 133 (8) 283 (7) 45 (5) 207 (5) 225 (4)		3.54
3	Ácido butanodioico, BIS (TRIMETHYLSILYL) ESTER	6.222	147 (100) 73 (37) 148 (10) 247 (13) 73 (12) 149(8) 33 (3) 43 (3) 172 (3) 30 (4)		21.62
4	Ácido propanoico , 2,3 BIS (TRIMETHYLSILYL)OX Y]- TRIMETHYLSILYL ESTER	6.358	73(100) 147(70) 189(47) 292 (31) 102 (24) 103 (23) 133 (21) 117 (14) 130 (11) 148 (11)		1.56

(Continua)

Nº Pico	Compostos Identificados	Tempo Retenção	m/z	%área
5	PIRIMIDINA, 2,4-BIS[(TRIMETHYSILYL) OXY]-	6.445	241 (100) 99 (85) 147 (72) 255 (62) 73 (52) 256 (43) 126 (27) 113 (26) 242 (21) 45 (17)	2.20
6	Ácido butanodioico, [(TRIMETHYLSILYL) OXY]- BIS(TRIMETHYLSILYL) ESTER	7.397	73 (100) 147 (64) 233 (17) 133 (14) 148 (10) 75 (10) 245 (10) 189 (9) 74 (9)	1.41
7	BUTANOL, 2,3,4-TRI[(TRIMETHYLSILYL) OXY]-	7.352	73 (100) 147 (70) 217 (59) 103 (32) 117 (28) 205 (24) 204 (15) 1889 (14) 133 (13) 129 (13)	1.18
8	N.I.	7.856	73 (100) 167 (83) 211 (78) 75 (74) 137 (43) 193 (40) 109 (34) 181 (22) 45 (19) 168 (13)	10.15
9	Ácido xilónico, 2,3,5-TRIS-O-(TRIMETHYSILYL)- GAMMA- LACTONE.D-	8.349	73 (100) 147 (23) 117 (18) 75 (13) 217 (12) 246 (11) 133 (9) 231 (9) 204 (9) 74 (9)	1.19
10	2,5- dihidroxibenzil ÁLCOOL 3TMS	8.690	73 (100) 194 (70) 356 (40) 147 (24) 267 (20) 357 (13) 195 (12) 75 (10) 45 (10) 341 (9)	2.76
11	Ácido xilónico, 2,3,4,5-PENTAKIS-O-(TRIMETHYSILYL)-	8.821	73 (100) 218 (87) 147 (55) 102 (43) 205 (27) 129 (26) 218 (20) 307 (19) 319 (19) 117 (14)	4.10
12	Ácido benzoico, 2,4-BIS (TRIMETHYLSILYLOXY )- TRIMETHYSILYL ESTER	9.101	355 (100) 73 (85) 356 (32) 147 (21) 357 (16) 129 (15) 149 (9) 378 (1)	1.12
13	D-RIBO-HEXONIC ÁCIDO, 3-desoxi-2,5,6-TRIS-O (trimetilsilil) - LACTONA	9.126	73(100) 129 (65) 147 (61) 155 (31) 248 (29) 103 (24) 117 (16) 273 (15) 292 (12) 230 (1)	0.82

Nº Pico	Compostos Identificados	Tempo Retenção	m/z	(Conclusão)
				%área
14	N.I.	9.337	73 (100) 217 (57) 273 (56) 147 (49) 347 (21) 375 (15) 274 (13) 218 (11) 129 (9) 465 (7)	5.18
15	D-glucitol, 1,2,3,4,5,6-hexaquis-O (trimetilsilil) -	10.000	319 (100) 73 (94) 147 (56) 217 (54) 205 (50) 320 (33) 103 (31) 307 (17) 218 (11)	13.90
16	N.I.	10.191	204 (100) 73 (94) 147 (56) 217 (54) 205 (50) 320 (33) 103 (31) 307 (17) 218 (11)	2.77
17	N.I.	10.422	73 (100) 255 (30) 312 (20) 110(20) 147 (18) 294 (12) 222 (12) 412 (1)	16.65
18	N.I.	11.643	261 (100) 351(61) 73 (52) 117 (30) 129 (25) 262 (20) 339 (17) 96 (10) 355 (1)	4.22

Nota: N.I. refere-se a picos não identificados na biblioteca Wiley8.

Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

No extrato fúngico A5F18F7 foi detectado o pico referente ao ácido butanodióico também conhecido como ácido succínico com intensidade relativa de 21,62%, sendo estes compostos com a maior intensidade dentre os que foram identificados (tabela 8). O ácido butanodióico consiste em um ácido orgânico dicarboxílico que participa do metabolismo energético em células animais e vegetais, este pode ser produzido por meio da fermentação realizada por bactérias e leveduras. Dentre suas principais aplicações estão a preparação de solventes, vernizes, fabricação de tintas e corantes, plastificantes, poliéster, podendo ser utilizado também na indústria alimentícia na produção de refrigerantes, cervejas, entre outros.

A utilização deste ácido vai além das já determinadas, sendo utilizado também pela indústria farmacêutica, como na preparação de fármacos para o tratamento da úlcera, antibióticos e vitaminas (SONG; LEE, 2006; ZEIKUS; JAIN; ELANKOVAN, 1999). No entanto este fungo capaz de produzir este ácido de grande utilização em diversas áreas.

Os extratos dos fungos endofíticos isolados podem ser testados no intuito de verificar a atividade de seus metabólitos secundários. Dentre os compostos produzidos pelos fungos endofíticos já foram relatados como sendo prolíficos produtores de compostos antimicrobianos, segundo Wiyakrutta et al. (2004) 360 extratos de fungos endofíticos isolados foram estudados resultando em 25,6% demonstrando atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (concentração inibitória mínima 0.0626- 200 µg/mL).

Segundo Yu et al. (2010) uma série de produtos naturais bioativos isolados de fungos endofíticos já foram relatados, entre eles antimicrobianos, tais como: alcaloides, peptídeos, esteroides, triterpenoides, quinonas, flavonoides, compostos alifáticos e fenóis, evidenciando a relevância do estudo destes organismos

#### **4.4.2 Compostos fenólicos totais presentes nos extratos fúngicos**

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal. São definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (SHAHIDI; NACZK, 1995).

**Tabela 9-** Teores de compostos fenólicos nos extratos fúngicos mais ativos

Extrato	Média (mg equivalente ao ácido gálico / g de extrato $\pm$ desvio padrão)
A1F2F1	9,09 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup>
A4F14F1	141,38 $\pm$ 6,15 <sup>a</sup>
A5F18F7	10,05 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>

Nota: médias seguidas da mesma letra não se diferem estatisticamente pelo método Tukey (0,001).

Fonte: Andrea Natan de Mendonça, 2014.

De acordo com a Tabela 9 o extrato A4F14F1 apresentou uma maior quantidade de compostos fenólicos. Os extratos A5F18F7 e A4F14F1 apresentaram teores baixos, mas sem demonstrar diferença estatística entre eles.

Apesar de não terem sido identificados os picos referentes aos compostos fenólicos nos cromatogramas, os resultados desta análise confirmam a presença de fenólicos nos extratos.

O resultado da análise de compostos fenólicos nos extratos confirmam os resultados obtidos nos testes de verificação da atividade antioxidante, sendo o extrato A4F14F1 o de melhor atividade antioxidante em ambos os teste (ORAC e ABTS), também foi a que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais. Segundo Huang et al. (2007) a capacidade antioxidante das culturas de fungos endofíticos estudados esta correlacionada ao seu conteúdo de fenólicos totais.

Dentre as estruturas químicas às quais se atribui atividade antioxidante e conseqüentemente sua função fisiológica, destacam-se os compostos fenólicos tais como ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico e flavonóides (CHEN et al. 1998; EWALD et al. 1999; SWAIN; HILLIS, 1959)

Segundo Guimarães et al. (2009), entre as substâncias antioxidantes derivadas de compostos fenólicos temos o tirosol que apresenta grande capacidade de conversão de radicais livres provenientes do metabolismo do oxigênio e do nitrogênio. O tirosol já foi descrito em diversas espécies de fungos endofíticos isolados de plantas da família Asteraceae, especialmente a partir de extratos do fungo *Glomerella cingulata*, isolado de *Viguiera arenaria*.

Os endófitos são capazes de produzir uma infinidade de compostos como os alcalóides, quinolonas, flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides, terpenoides, xantonas e outros (PIMENTEL et al., 2011; TAN; ZOU, 2001) que conferem inúmeras atividades biológicas tais como antitumoral, antidiabética, inseticida, imunossupressora, antioxidante, antiparasitária e antimicrobiana (MAHESHWARI 2006; GUO et al., 2008; PIMENTEL et al., 2011). Devido à produção destas substâncias com grande potencial terapêutico, tem aumentado o interesse pelo estudo e descoberta de novos fungos endofíticos (RADIĆ; STRUKELJ, 2012).

## 5 CONCLUSÕES

- a) Fungos endofíticos são considerados uma rica fonte de biodiversidade e produtos biológicos;
- b) Estes podem ter sua presença alterada de acordo com o período de coleta para o isolamento;
- c) Os extratos apresentaram resultados significativos como antimicrobianos;
- d) Extratos foram capazes de sequestrar radicais livres de acordo com as análises antioxidantes realizadas;
- e) Extrato A4F14F1 comportou-se como um potente e potencial agente antitumoral.

## REFERÊNCIAS

- AL-DUAIS, M. et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European of Food Research and Technology**, n. 228, p. 813-821, 2009.
- ALMEIDA, S.P. Frutas nativas do cerrado: caracterização físico-química e fonte potencial de nutrientes. In **Cerrado: ambiente e flora**. Embrapa-CPAC, Planaltina, p.247-281, 1998.
- ALY, A. H; DEBBAB, A; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 90, p. 1829–1845, 2011.
- ARAÚJO, W. L. et al. **Guia prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos**, CALO: Piracicaba, 2010.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Empraba Meio Ambiente, c. 4, p. 117-138, 1998.
- BARRETO, T.E.; HIRUMA-LIMA, C. A.; **Potencial farmacológico de um Fragmento de Mata de Galeria, Fisionomia do Bioma Cerrado, denominado Mata do BUTIGNOLI**, Botucatu, SP, Estudo monográfico, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ 1991. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125, 1991.
- BARROSO, G. M.; et al. **Annonaceae**. São Paulo: LTC/EDUSP, v.1. 1978.
- BORGES, W.S. **Estudo de fungos endofíticos associados a plantas da família Asteraceae como fontes de metabólitos secundários e em processos de biotransformações**. 350f. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CAO, L. X. et al. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. **FEMS Microbiol Lett.** n. 247, v. 2, p. 147–152, 2005.

CARVALHO, J. A. **Marolo**: o doce sabor do cerrado; sugestões de cultivo. Machado: Folha Machadense, 2002.

CARVALHO, P. L. N. et al. *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: antioxidant and antiproliferative activities of endophytic fungus associated with *Rheedia brasiliensis* plant. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 1, p. 172-176, 2012.

CHEN, Y. et al. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 8179–8184, 2011.

CHEN, Z. Y. et al. Antioxidative activity of green tea catechin extract compared with that of Rosemeiy extract. **Journal Analytical Official Chemistry Society**, v. 75, n. 9, p. 327-333, 1998.

CHISTÉ, R. C. et al. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, n. 127, p. 419-426, 2011.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, J. D. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Pure Appl. Chem.** p. 7, 2005.

DA SILVA, E. A. A. et al. Preliminary studies on dormancy of *Annona crassiflora* Mart. seeds. In: **International symposium on plant dormancy**, International Conference Centre, p.4, 2004.

DEMAIN, A. Microbial secondary metabolism: a new theoretical for academia, a new opportunity for industry. In: **secondary metabolites**; their function and evolution. Chichester: J. Willey, p.3-23, 1992.

DUKER-ESHUN, G. et al. Antiplasmodial constituents of *Cajanus cajan*. **Phytother Res** n. 18, p. 128–130, 2004.

DUXBURY, D. Antioxidant analysis: Measuring disease fighters. **Food Technology**, v. 3, p. 56-58, 2005.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia**, EDUCS, Caxias do Sul, 2010, v.2, c3., p.75-80.

EWALD, C. et al. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. **Food Chemistry**, n. 64, p. 231-235, 1999.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. **Nutrition**, v.18, p. 872– 879, 2002.

FERNANDES, M. R. V. et al. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea Arabica*. **B.J. Pharm. Sci.**, São Paulo, n.4, v. 45, p. 680-681, dez. 2009.

FERNANDEZ- PACHON, M. S. et al. Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.48, p. 649-671, Aug., 2008.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FISHER, P.J. et al. Fungal endophytes of *dryas octopetala* from a high arctic polar semidesert and from the swiss alps. **Mycologia**, v.87, p.319-323, 1995.

FISHER, P. J.; PETRINI, O. ;LAPPIN SCOTT, H. M The distribution on some fungal and bacteria endophytes in maize (*Zea mays* L.) **New Phytologist**, v.122, p.299-305, 1992.

FONSECA, A. G.; MUNIZ, I. A. F.; **Informações sobre a cultura de espécies frutíferas nativas da região do cerrado**. Informe Agropecuário. 1992, v. 16, p. 12-17.

FOUCHE, G. et al. *In vitro* anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 119, p. 455– 461, 2008.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Rev. bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v.15, n.2, p.178-182, 2005.

GALLO, M. B. C. et al. Atividade Citotóxica de Extratos de Fungos Endofíticos Isolados de *Smallanthus sonchifolius*. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, s. 2, p. 402-404, jul. 2007.

GAMBOA, M. A.; LAUREANO, S.; BAYMAN, P. Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: Does size matter? *Mycopathologia*, **Dordrecht**, v. 156, n. 1, p. 41-45, 2003.

GIMENEZ, C. et al. Fungal endophytes and their role in plant protection. **Curr Org. Chem.** v. 11, p. 707-720, 2007.

GOOSSENS, H. et al. **Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance:** a crossnational database study. *Lancet.*; 365(9459), p. 579-87, 2005.

GREVE, H. et al. Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. **Phytochem.** n. 9, p. 537, 2010.

GUIMARÃES, D.O. et al. A simple method for the quantitative analysis of tyrosol by HPLC in liquid Czapek cultures from endophytic fungi. **Journal Brazilian of Chemistry Society**, v.20, p. 188-194, 2009.

GUIMARÃES, D.O. et al. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, p. 134–144, 2008.

GUO, B. et al. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136–142, 2008.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 16, p. 33-50, 1996.

HARPER, J.K. et al. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Elsevier**, v. 59, p. 2471–2476, 2003.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HUANG, W.-Y. et al. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. **Economic Botanic**, v.61, p.14-30, 2007.

HUANG, W-Y. et al. Endophytic fungi from Nerium oleander L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 23, p. 1253-1263, 2007.

JALGAONWALA, R. B.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. J. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **Microbiol. Biotech.**, 2011.

JUNIOR C. V.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Quím. Nova** vol.29 no.2 São Paulo Mar./Apr. 2006.

LACAVA, P. T.; SEBASTIANES, F. L. S.; AZEVEDO, J. L. **Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas**. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (Org.). **Fungos: Biologia, Bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: Editora da universidade de Caxias do Sul. 2010.

LAWAL, T.E.; et al. Extraction of enzymes from four fungi and their use to improve the nutritive value of groundnut pod for broiler feeding. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 4, p. 340-346, 2010.

LEITE-LEGATTI, A. V. et al. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, p. 596–603, 2012.

LIU, X.L. et al. Cajanol inhibits the growth of Escherichia coli and Staphylococcus aureus by acting on membrane and DNA damage. **Planta Med**, n. 77, p. 158–163, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1998, v. 2, 368p.

MACIEL, M. A. M. et al. Medicinal Plants: The need for multidisciplinary scientific studies. **Química Nova**, v.25, 2002.

MAHESHWARI, R. What is an endophytic fungus? **Current Science**, v. 90, n. 10, p.25, 2006.

MARINHO, A. M. R. et al. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus from fruits of *Melia azedarach*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, n.2, 2005.

MAKI C.S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao L.*)**; Tese doutorado – Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba (USP), 2006.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**, Embrapa-CNPMA: Jaguariúna, 1998.

MENDES, R. **Diversidade e caracterização genética de comunidades microbianas endofíticas associadas à cana-de-açúcar**. 119f. (Tese de doutorado em Agronomia). - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo (USP). Piracicaba, 2008.

MITTERMEYER, R.A.; MYERS, N.; MITTERMEYER C.G. Hotspots. **Earth’s biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. Mexico City: CEMEX Conservation International, 1999.

MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 757-766, 1991.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. J.; Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Natural Product** .p 75, 311, 2012.

OCAMPO D.M.; OCAMPO R. Bioactividad de la familia Annonaceae. **Revista Universidad de Caldas**, págs. 135 – 155, Enero – Diciembre, 2006.

ORLANDELLI, R.C. et al. Ação antibacteriana de metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* Sw. contra *Micrococcus luteus*. ;In: **Encontro internacional de produção científica**, 7, 2011, Maringá. Editora CESUMAR, 2011.

PANDI, M.; MANIKANDAN, R.; MUTHUMARY, J. Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., an endophytic fungus, against 7, 12 80 dimethyl benz(a)anthracene (DMBA)- induced mammary gland carcinogenesis in *Sprague dawley* rats. **Biomedicine pharmacotherapy**, v. 64, p. 48-53, 2010.

PARTIDA-MARTINEZ, L.P.; HEIL, M. The microbe-free plant: fact or artifact? **Front Plant Sci.** 2011 Dec 29;2:100. doi: 10.3389/fpls.2011.00100. eCollection 2011.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos Endofíticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 62-76, nov. de 2002.

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

PERFORMANCE STANDARDS FOR ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, CLSI- **Clinical and Laboratory Standards Institute 2005**, Fifteenth Informational Supplement CLSI document M100-S15, CLSI, Wayne (2005).

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: FOKKEMA, N.J.; HEUVEL, J. van DEN (Eds.) **Microbiology of the phyllosphere**. Cambridge: Cambridge University Press, p.175-187, 1986.

PETRINI, O.; et al. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, Hoboken, v. 1, p. 185-196, 1992.

PIMENTEL, I. C. et al. **Fungos endofíticos em folhas de erva-mate** (*Ilex paraguariensis* A. St. il.) FLORESTA, Curitiba, PR, v. 36, n. 1, jan./abr. 2006.

PIMENTEL, M. R. et al. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnology Research International**, 2011.

PIRES, M. O; SANTOS, I. M. **Construindo o cerrado sustentável: experiências e contribuições das ONG's**. Gráfica Nacional, Goiás, 2000,v. 1, c. 4, p. 147.

POLLI A. et al. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, 2012.

PRADO S, LI, Y.; NAY. B. **Diversidade e significado ecológico de fungos endofíticos Produtos Naturais**. Em: Atta-ur-Rahman, editor. Estudos em Química de Produtos Naturais: Elsevier Science Publishers-Amesterdão, 2011.

QUADT-HALLMANN; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Can. J. Microbiol.** v. 43, p. 577-582, 1997.

RADIĆ, N.; STRUKELJ, B., Endophytic fungi—The treasure chest of antibacterial substances. **Phytomedicine**, 2012.

RATTER ,J.A.; RIBEIRO,J.F.; BRIDGEWATER,S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany.** v. 80, p. 223–230, 1997.

RE, R; et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical carion decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, p.1237, may, 1999.

RIBEIRO, J.F. et al. **Araticum (Annona crassiflora Mart.)**. Jaboticabal: Embrapa Cerrados, 2000.

RIOS, J.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80- 85, 2005.

RIZZINI, C.T. **Aspectos ecológicos da regeneração em algumas plantas do cerrado**. 3. São Paulo In M.G Ferri (Coord.). Simpósio sobre o cerrado. 239 p. Anais p. 61-64, 1971.

ROBINSON, T.; SINGH, D.; NIGAM, P. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 55, p. 284-289, 2001.

ROCKENBACH, I. I. et al. Influencia do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*vitis vinifera*) variedades *Tannat* e *Ancelota*. **Ciência e tecnológica de alimentos**, campinas, v.28, p.238-244, dez., 2008

RODRIGUES, H. G. et al. Antioxidant effect of saponin: potential action of a soybean flavonoid on glucose tolerance and risk factors for atherosclerosis. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 56, n. 2, p. 79-85, 2005.

ROESLER, R. **Estudo de frutas do cerrado brasileiro para avaliação de propriedade funcional com foco na atividade antioxidante**. Tese de doutorado, Campinas (UNICAMP), Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2009.

RUBIN, E. et al. Rubin Patologia: Bases clinicopatológicas da Medicina. In: RUBIN & STRAYER. **Lesão celular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 3-39, 2006.

SAIKKONEN, K.; et al. Fungal endophytes: continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, p. 319-343, 1998.

SAMUELS, G. J.; SEIFERT, K. A.; The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 37-67, set. de 1995.

SANTOS, L. P. et al. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Phytochemistry**, v. 42, p. 705-7, 1996.

SCHULZ, B.; et al. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. **Mycological Research**, Cambridge, v. 97, n. 12, p. 1447-1450, Dec. 1993.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food Phenolics: sources, chemistry, effects and applications. **Lancaster: Technomic**, p. 331, 1995.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by mean of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods of Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SILVA, J. J. et al. - In vitro screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linné and *Annona crassiflora* Mart. against Oxacillin Resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 4 p. 333-40, 2014.

SILVA M. V. et al. **Growth Inhibition Effect of Brazilian Cerrado Plant Extracts on Candida Species**. v. 39, n. 2, P. 138-14, 2001

SILVA, V. et al. Antioxidant Activity of Uruguayan Propolis. In Vitro and Cellular Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 6430–6437, 2011.

SONG, H. LEE, S.Y. Process for the production of succinic acid by anaerobic fermentation. **Elsevier**. v. 5, p. 143-833, 2006.

SONG, Y. C. et al. Characterization of graphislactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium sp.* IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 506-509, 2005.

SOUZA, A. Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (audl) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.

SOUZA L. K. H. et al. Antifungal properties of brasilian cerrado plants. **Brasilian Journal of Microbiology**. v. 33 no. 3 São Paulo july/Sept. 2002.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 18, p. 382-385.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.

STROBEL, G.A. **Microbial gifts from rain forests**. Symposium contribution. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 24, p. 14-20, 2002.

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.

STROBEL, G. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Nat. Prod.** v. 67, n. 257-268, 2004.

STROBEL. G.A.; DAISY, B.; CASTILLO, U. The biological promise of microbial endophytes and natural products. **Plant Pathology Journal**. p.161-176, 2005.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I Quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal Science and Food Agricultural**, n. 10, p. 63-68, 1959.

TABALIPA M. M. et al. **Informação sobre ocupação em registros hospitalares de câncer no estado do Rio de Janeiro.** Cad. Saúde coletiva (Rio de Janeiro), 2011.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports.** Nat. Prod. Rep. v. 18, p. 448-459, 2001.

TEJESVI M.V. et al. Bioactivity and genetic diversity of endophytic fungi in *Rhododendron tomentosum* Harmaja, **Fungal Diversity**, v. 47, p. 97-107, 2011.

TORRES, A. M.; MAU LASTOVICKA, T. REZAALYAN, R. Total phenolics and highperformance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. **Journal Agricultural- Food Chemistry**, n. 35, p. 921-925, 1987.

VELOSO, V. R. S.; L. G. ALMEIDA , M. F.; SILVA, M. F. **Levantamento dos insetos associados ao araticunzeiro (*Annona crassiflora* Mart.) no cerrado goiano.** In Reunião Especial da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1, Uberlândia, 94 p. Resumos, 1994.

WANG, L. W. et al. Natural products with antitumor activity from endophytic fungi. **Mini Rev Med Chem.** n. 11 v. 12, p. 1056–1074., 2011.

WEBER, R. W. S. et al. Anti-Candida metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 68, p. 886-892, 2007.

WIYAKRUTTA, S. et al. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-ancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 265-272, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Antimicrobial resistance.** Fact sheet. n. 194, Updated April, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), **Cancer.** Fact sheet. n. 297, February 2014.

YANG, X.; ZHANG, J.; LUO, D. The taxonomy, biology and chemistry of the fungal *Pestalotiopsis* genus. **Nat. Prod. Rep.** v.29, p. 622-641, 2012.

YE, Y. et al. Flavipin in *Chaetomium globosum* CDW7, an endophytic fungus from *Ginkgo biloba*, contributes to antioxidant activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2013.

YU H. et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, n. 165, p. 437–449, 2010.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL-FILHO V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim Nova**. v. 24, p. 147-152, 2001.

ZEIKUS, J. G, JAIN, M. K., ELANKOVAN P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. **Appl Microbiol Biotechnol**, n. 51, v. 5, p. 545–552, 1999.

Zhang, H. W.; Song, Y. C.; Tan, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Nat. Prod.** v. 5, 753-754, 2006.

## ANEXOS

## Anexo A: Morfologia macroscópica dos isolados fúngicos

(Continua)

<b>Fungos Isolados</b>	<b>Características</b>
A1F4F1	Rosa cottonoso
A1F8F2	Marrom filamentosos
A1F9F1	Marrom filamentosos
A1F16F3	Amarelo cremoso
A1F17F7	Marrom filamentosos
A1F17F6	Preto pulverulentas
A1F17F3	Preto pulverulentas
A1F18F4	Branco cottonoso
A1F20F7	Marrom filamentosos
A1F20F1	Marrom pulverulentas
A1F20F4	Cinza filamentosos
A1F20F2	Creme cremoso
A1F11F1	Branco cottonoso
A1F3F3	Amarelo filamentosos
A1F3F2	Amarelo filamentosos
A1F17F2	Branco cottonoso
A1F20F3	Branco cottonoso
A1F11F6	Amarelo filamentosos
A1F2F6	Branco cremoso
A1F6F6	Marrom pulverulentas
A1F18F1	Preto pulverulentas
A1F20F6	Amarelo cremoso
A1F3F5	Marrom filamentosos
A1F2F2	Branco filamentosos
A1F3F1	Branco filamentosos
A1F7F5	Branco cottonoso
A1F19F2	Preto cremoso

(Continua)

<b>Fungos Isolados</b>	<b>Características</b>
A1F15F1	Preto cottonoso
A1F10F4	Preto filamentoso
A1F2F3	Branco cottonoso
A1F17F1	Branco cottonoso
A1F3F7	Marrom cremoso
A1F18F7	Preto pulverulentas
A1F16F5	Branco cottonoso
A1F17F4	Branco filamentoso
A1F2F1	Bege cremoso
A1F1F7	Preto pulverulentas
A1F8F4	Branco filamentoso
A1F4F2	Branco cottonoso
A2F18F7	Preto pulverulentas
A2F6F6	Marrom pulverulentas
A2F6F6	Marrom cottonoso
A2F17F1	Cinza pulverulentas
A2F15F3	Rosa filamentoso
A2F20F1	Branco filamentoso
A2F18F5	Marrom cremoso
A2F18F4	Branco cottonoso
A2F19F4	Branco cottonoso
A2F19F3	Marrom cremoso
A2F12F6	Branco filamentoso
A2F12F2	Branco cottonoso
A2F16F5	Branco cottonoso
A2F17F1	Cinza cottonoso
A2F17F3	Marrom pulverulentas
A2F16F7	Amarelo pulverulentas
A2F17F7	Bege pulverulentas
A2F19F2	Bege cremoso
A2F15F1	Branco filamentoso

(Continua)

<b>Fungos Isolados</b>	<b>Características</b>
A2F14F5	Branco cotonoso
A2F18F1	Branco cotonoso
A2F19F6	Marrom cremoso
A2F19F1	Cinza cremoso
A2F17F2	Branco cremoso
A2F20F7	Branco filamentoso
A2F16F1	Preto filamentoso
A2F12F3	Branco cremoso
A2F11F3	Preto pulverulentas
A2F12F1	Branco filamentoso
A2F18F3	Branco filamentoso
A2F18F2	Preto cremoso
A2F13F2	Branco cotonoso
A2F14F6	Preto pulverulentas
A2F1F3	Branco cotonoso
A2F16F6	Branco filamentoso
A3F2F1	Cinza cotonoso
A3F17F7	Branco filamentoso
A3F20F6	Branco filamentoso
A3F20F1	Creme pulverulentas
A3F15F5	Branco filamentoso
A3F15F2	Branco cotonoso
A3F16F1	Creme pulverulentas
A3F18F1	Branco filamentoso
A3F18F3	Branco filamentoso
A3F18F6	Preto pulverulentas
A3F18F1	Amarelo filamentoso
A3F19F7	Branco cotonoso
A3F15F1	Branco cotonoso
A3F16F4	Branco cotonoso
A3F16F7	Preto filamentoso

(Continua)

<b>Fungos Isolados</b>	<b>Características</b>
A3F19F3	Preto cottonoso
A3F18F5	Branco cottonoso
A3F16F5	Branco filamentoso
A3F18F7	Branco filamentoso
A3F19F1	Amarelo cottonoso
A3F16F6	Branco filamentoso
A3F19F2	Branco filamentoso
A3F2F3	Branco filamentoso
A3F20F5	Preto pulverulentas
A3F17F3	Branco cremoso
A3F15F3	Bege cottonoso
A4F17F7	Cinza pulverulentas
A4F18F2	Branco pulverulentas
A4F17F1	Branco filamentoso
A4F19F1	Branco filamentoso
A4F15F5	Branco pulverulentas
A4F18F3	Branco filamentoso
A4F16F3	Preto pulverulentas
A4F19F7	Preto filamentoso
A4F16F1	Cinza pulverulentas
A4F20F4	Branco cremoso
A4F20F6	Branco filamentoso
A4F19F4	Branco cottonoso
A4F20F3	Branco filamentoso
A4F16F5	Branco cottonoso
A4F15F7	Branco filamentoso
A4F17F3	Branco filamentoso
A4F17F4	Branco filamentoso
A4F15F4	Laranja pulverulentas
A4F7F4	Branco cottonoso
A4F12F1	Branco cottonoso

(Continua)

<b>Fungos Isolados</b>	<b>Características</b>
A4F16F6	Branco pulverulentas
A4F15F6	Bege cottonoso
A4F16F4	Bege filamentoso
A4F18F4	Preto pulverulentas
A4F15F2	Preto pulverulentas
A4F16F2	Branco filamentoso
A4F15F1	Branco cremoso
A4F17F3	Cinza filamentoso
A4F18F7	Amarelo filamentoso
A4F19F5	Cinza filamentoso
A4F19F2	Preto pulverulentas
A4F20F1	Branco cottonoso
A4F17F2	Branco filamentoso
A4F16F7	Branco cottonoso
A4F5F1	Branco filamentoso
A4F4F3	Branco filamentoso
A4F20F7	Preto pulverulentas
A4F19F3	Branco filamentoso
A5F13F1	Branco filamentoso
A5F16F4	Amarelo pulverulentas
A5F16F7	Branco pulverulentas
A5F16F1	Cinza cottonoso
A5F17F3	Branco filamentoso
A5F7F1	Branco filamentoso
A5F18F1	Preto pulverulentas
A5F19F6	Branco cottonoso
A5F10F1	Amarelo filamentoso
A5F2F1	Marrom filamentoso
A5F3F3	Branco filamentoso
A5F6F3	Preto pulverulentas
A5F6F5	Amarelo filamentoso

(Continua)

<b>Fungos Isolados</b>	<b>Características</b>
A5F6F1	Marrom filamentoso
A5F9F3	Creme filamentoso
A5F7F4	Branco cotonoso
A5F19F3	Branco filamentoso
A5F5F1	Marrom cremoso
A5F19F1	Amarelo filamentoso
A5F5F5	Branco filamentoso
A5F5F6	Branco cotonoso
A5F1F7	Branco pulverulentas
A5F8F2	Bege filamentoso
A5F16F6	Cinza pulverulentas
A5F16F3	Cinza pulverulentas
A5F12F1	Branco cotonoso
A5F16F2	Branco filamentoso
A5F19F2	Branco pulverulentas
A5F18F4	Marrom pulverulentas
A5F7F5	Cinza cotonoso
A5F13F2	Amarelo filamentoso
A5F15F7	Cinza pulverulentas
A5F17F2	Branco filamentoso
A4F17F3	Branco filamentoso
A5F15F3	Preto pulverulentas
A5F17F1	Amarelo filamentoso
A5F14F5	Preto pulverulentas
A5F3F1	Branco cotonoso
A5F6F6	Marrom cremoso
A5F1F1	Marrom cremoso
A5F7F2	Amarelo filamentoso
A5F7F3	Branco pulverulentas
A4F1F1	Cinza cotonoso
A4F1F2	Marrom pulverulentas

(Conclusão)

<b>Fungos Isolados</b>	<b>Características</b>
A4F1F3	Branco filamentoso
A3F7F1	Branco cotonoso
A3F2F2	Branco cotonoso
A3F1F1	Branco pulverulentas
A2F1F1	Marrom pulverulentas
A2F1F2	Branco cotonoso
A2F1F4	Branco pulverulentas
A1F2F4	Branco filamentoso
A1F2F5	Cinza cotonoso
A1F3F4	Branco pulverulentas

**Anexo B-** Triagem dos fungos endófitos de *A. crassiflora* produtores de antimicrobianos.

(Continua)

<b>Triagem</b>			
<b>Fungos Isolados</b>	<b><i>C. albicans</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>
A1F2F1	33,0	37,0	36,0
A1F2F5	12,0	10,0	S.I.
A1F3F2	11,0	12,0	S.I.
A1F3F3	11,0	11,0	S.I.
A1F3F4	S.I.	S.I.	S.I.
A1F3F6	S.I.	S.I.	S.I.
A1F3F7	S.I.	S.I.	S.I.
A1F4F1	11,0	13,0	S.I.
A1F9F1	14,0	15,0	S.I.
A1F13F1	S.I.	12,0	11,0
A1F16F3	S.I.	S.I.	S.I.
A1F16F5	S.I.	11,0	10,0
A1F17F1	S.I.	10,0	S.I.
A1F17F2	S.I.	10,0	S.I.
A1F17F3	18,0	14,0	S.I.
A1F17F4	S.I.	15,0	S.I.
A1F17F7	S.I.	S.I.	S.I.
A1F18F7	S.I.	11,0	11,0
A1F20F1	S.I.	S.I.	S.I.
A1F20F3	12,0	12,0	S.I.
A2F12F6	12,0	S.I.	S.I.
A2F13F2	S.I.	13,0	12,0
A2F14F6	S.I.	S.I.	S.I.
A2F15F3	S.I.	S.I.	S.I.
A2F16F1	S.I.	S.I.	S.I.
A2F16F6	S.I.	S.I.	S.I.
A2F17F2	S.I.	S.I.	S.I.
A2F18F1	S.I.	S.I.	10,0

(Continua)

<b>Fungos Isolados</b>	<b><i>C. albicans</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>
A2F18F2	S.I.	11,0	S.I.
A2F18F3	S.I.	12,0	12,0
A2F18F4	S.I.	S.I.	S.I.
A2F18F5	S.I.	10,0	19,0
A2F18F6	S.I.	S.I.	S.I.
A2F19F3	10,0	S.I.	S.I.
A2F19F4	S.I.	S.I.	S.I.
A2F20F1	S.I.	S.I.	S.I.
A2F20F7	S.I.	S.I.	11,0
A3F3F1	S.I.	S.I.	S.I.
A3F15F5	S.I.	S.I.	12,0
A3F16F5	S.I.	10,0	11,0
A316F6	S.I.	10,0	11,0
A3F17F3	S.I.	S.I.	11,0
A3F17F7	S.I.	S.I.	12,0
A3F18F5	S.I.	10,0	11,0
A3F18F7	19,0	15,0	17,0
A3F19F1	S.I.	S.I.	16,0
A3F19F2	S.I.	11,0	S.I.
A3F20F5	11,0	S.I.	S.I.
A3F20F6	14,0	13,0	S.I.
A4F4F3	18,0	19,0	17,0
A4F7F7	10,0	S.I.	S.I.
A4F5F1	19,0	18,0	15,0
A4F12F2	11,0	10,0	S.I.
A4F14F1	27,0	40,0	35,0
A4F15F1	S.I.	11,0	10,0
A4F15F2	S.I.	S.I.	S.I.
A4F15F4	S.I.	10,0	S.I.
A4F15F5	12,0	13,0	S.I.
A4F15F7	S.I.	14,0	10,0

(Continua)

<b>Fungos Isolados</b>	<b><i>C. albicans</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>
A4F15F6	S.I.	13,0	16,0
A4F16F2	S.I.	11,0	12,0
A4F16F4	12,0	S.I.	12,0
A4F16F5	13,0	16,0	12,0
A4F16F6	10,0	14,0	13,0
A4F16F7	S.I.	S.I.	11,0
A4F17F1	11,0	11,0	S.I.
A4F17F2	S.I.	S.I.	S.I.
A4F17F3	S.I.	11,0	S.I.
A4F17F4	S.I.	S.I.	S.I.
A4F18F3	S.I.	25,0	S.I.
A4F18F4	S.I.	S.I.	S.I.
A4F18F7	S.I.	10,0	S.I.
A4F19F1	12,0	10,0	S.I.
A4F19F2	S.I.	S.I.	S.I.
A4F19F3	11,0	S.I.	15,0
A4F19F4	S.I.	S.I.	11,0
A4F19F5	S.I.	S.I.	13,0
A4F20F1	S.I.	S.I.	S.I.
A4F20F3	12,0	S.I.	13,0
A4F20F7	19,0	13,0	14,0
A5F1F1	S.I.	11,0	11,0
A5F1F2	11,0	12,0	12,0
A5F1F7	S.I.	12,0	11,0
A5F2F1	S.I.	S.I.	S.I.
A5F3F1	S.I.	15,0	11,0
A5F5F2	S.I.	S.I.	S.I.
A5F5F5	S.I.	19,0	16,0
A5F6F3	S.I.	10,0	11,0
A5F6F6	S.I.	S.I.	S.I.
A5F7F1	S.I.	S.I.	S.I.

(Conclusão)

<b>Fungos Isolados</b>	<b><i>C. albicans</i></b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>
A5F7F4	11,0	12,0	S.I.
A5F7F5	S.I.	11,0	S.I.
A5F8F2	11,0	10,0	16,0
A5F10F1	10,0	10,0	S.I.
A5F12F1	10,0	S.I.	10,0
A5F13F2	S.I.	15,0	16,0
A5F15F7	S.I.	11,0	13,0
A5F15F3	S.I.	11,0	S.I.
A5F16F1	S.I.	12,0	S.I.
A5F16F2	S.I.	S.I.	14,0
A5F16F3	S.I.	16,0	13,0
A5F16F5	S.I.	S.I.	10,0
A5F16F6	S.I.	11,0	10,0
A5F16F7	S.I.	S.I.	S.I.
A5F17F3	10,0	S.I.	S.I.
A5F18F1	S.I.	S.I.	S.I.
A5F18F4	S.I.	S.I.	S.I.
A5F18F7	13,0	22,0	25,0
A5F19F1	S.I.	11,0	11,0
A5F19F2	S.I.	S.I.	12,0
A5F19F3	12,0	15,0	13,0
A5F19F6	S.I.	S.I.	S.I.

Nota: S.I. = Sem inibição

A sigla A\_F\_F\_ refere-se à árvore, folha e fragmento respectivamente.