

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

TAMARA FONSECA BASTOS SANTOS

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ENDOFÍTICOS DE ESPÉCIES
MEDICINAIS COM POTENCIAL DE PRODUZIR MOLÉCULAS DE INTERESSE
BIOTECNOLÓGICO**

Sorocaba
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS PARA A SUSTENTABILIDADE
CAMPUS SOROCABA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E MONITORAMENTO
AMBIENTAL

TAMARA FONSECA BASTOS SANTOS

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ENDOFÍTICOS DE ESPÉCIES
MEDICINAIS COM POTENCIAL DE PRODUZIR MOLÉCULAS DE INTERESSE
BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental da Universidade Federal de São Carlos, *campus* Sorocaba, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

Orientação: Profa. Dra. Cleoni dos Santos
Carvalho

Sorocaba
2018

Fonseca Bastos Santos, Tamara

Bioprospecção de fungos filamentosos endofíticos de espécies medicinais com potencial de produzir moléculas de interesse biotecnológico / Tamara Fonseca Bastos Santos. -- 2018.

83 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador: Cleoni dos Santos Carvalho

Banca examinadora: Angela Faustino Jozala, Natan de Jesus Pimentel

Filho

Bibliografia

1. Fungos endofíticos. 2. Compostos bioativos. 3. Plantas medicinais. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano – CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Tamara Fonseca Bastos Santos, realizada em 09/03/2018:

Profa. Dra. Cleonir dos Santos Carvalho
UFSCar

Profa. Dra. Angela Faustino Jozala
UNISO

Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho
UFSCar

*À todos os cientistas que estudam os microrganismos, a
minha avó (Dó Ni) e a minha mãe Alônica,
maior incentivadora dos meus projetos
Dedico*

AGRADECIMENTOS

À Dra. Iolanda C.S. Duarte e a Dra. Cleoni dos Santos Carvalho, pela oportunidade oferecida para a realização desse trabalho.

À Mônica A. Almeida, técnica do laboratório, pela amizade, por todos os momentos de ajuda, por ser minha grande mentora na área da microbiologia.

À Dra. Ana Carolina Araújo pelas contribuições no desenvolvimento das técnicas de genética molecular.

A minha família, principalmente a minha mãe Mônica, irmãs Bruna e Mayara, meu sobrinho Lorenzo, a minha tia Patrícia e avó Ivani, inclui-se aqui também minhas cachorrinhas Pink e Tchuca e meu gato Jamie.

Às amigas, Gabriela, Monique, Bianca e Luana grandes biólogas, pelo apoio e contribuições.

Ao grupo do facebook Bolsista Capes, onde pesquisadores de todo o Brasil se comunicam, dividindo suas angústias e também suas conquistas, pelos momentos de divertimento e de apoio.

Ao laboratório de Microbiologia Ambiental (L.A.M.A), onde tive a oportunidade de praticar a ciência.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa.

A Universidade de Sorocaba- UNISO pela liofilização das amostras.

Ao Laboratório de Biomassa e Bioenergia pela disponibilização do equipamento de FTIR.

A Universidade Federal de São Carlos campus Sorocaba-SP, instituição a que devo minha graduação, lugar onde conheci grandes amigos e profissionais. Obrigada!

RESUMO

SANTOS, Tamara Fonseca Bastos. Bioprospecção de fungos filamentosos endofíticos de espécies medicinais com potencial de produzir moléculas de interesse biotecnológico. 2018. 83-f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2018.

Microrganismos endofíticos são definidos como organismos que vivem no interior de tecidos vegetais sem causar qualquer prejuízo à planta hospedeira. Bactérias e fungos produzem diversos compostos bioativos com propriedades antimicrobianas, enzimáticas, antioxidantes entre outras. Tais compostos podem ser oriundos da capacidade dos microrganismos endofíticos em produzir substâncias semelhantes às produzidas pela planta hospedeira. Por estas razões, neste trabalho foi realizada a bioprospecção de fungos filamentosos endofíticos de plantas medicinais nativas do cerrado, com objetivo de testar a capacidade desses em produzir compostos com atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. As espécies vegetais utilizadas foram *Lafoensia pacari*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Guazuma ulmifolia* e *Siparuna guianensis*, de onde 18 fungos endofíticos foram isolados e identificados. Para obtenção dos compostos bioativos, os fungos foram submetidos a cultivo submerso em caldo malte, caldo Czapek Dox e caldo batata dextrose e, após crescimento, submetidos à centrifugação de onde os extratos brutos (sobrenadantes) foram obtidos e avaliados. Atividade antimicrobiana foi constatada no isolado GF9C (família Trichocomaceae) obtido no meio caldo malte, que inibiu o crescimento das cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. Atividades antioxidantes superiores a 50% testadas em reação com os radicais livres 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e 2,2 azino bis (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid) (ABTS) foram obtidas pelos isolados LF3C (*Talaromyces funiculosus*), GF16F (*Colletotrichum boniense*), CF7F (*Phomopsis sp*) e GF9C (família Trichocomaceae) em meio Czapek Dox. A atividade anti-inflamatória foi testada por reação com membranas de eritrócitos humanos, com os isolados CF7F, LF3C e GF9C, sendo que os dois últimos apresentaram, respectivamente, índices de atividade de 94,82% e 49,32%. Os extratos brutos desses isolados se mostraram promissores e foi possível relacionar a atividade anti-inflamatória à presença de flavonoides. Os resultados obtidos de forma geral corroboram a capacidade de fungos endofíticos em produzir compostos bioativos, sendo que as atividades testadas possuem potencial biotecnológico para aplicações futuras na medicina.

Palavras chave: endofíticos, compostos bioativos, plantas medicinais, antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos.

ABSTRACT

SANTOS, Tamara Fonseca Bastos. Bioprospecting of endophytic filamentous fungi of medicinal species with potential to produce molecules of biotechnological interest. 2018. 81p. Qualification (Master's Degree in Biotechnology and Environmental Monitoring) - Federal University of São Carlos, Sorocaba, 2018.

Endophytic microorganisms are defined as organisms that live inside plant tissues without causing any damage to the host plant. Bacteria and fungi produce several bioactive compounds, with antimicrobial, enzymatic, antioxidant and other properties. These compounds may be derived from the ability of endophytic microorganisms to produce substances similar to those produced by the host plant. For these reasons, in this work was performed the bioprospection of endophytic filamentous fungi of native medicinal plants of the Brazilian tropical savanna, with the objective of testing their ability to produce compounds with antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activity. The plant species used were *Lafoensia pacari*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Guazuma ulmifolia* and *Siparuna guianensis*. Eighteen endophytic fungi were isolated and identified from the tissues of these plants. To obtain the bioactive compounds, the fungi were submitted to submerged culture in malt broth, Czapek Dox broth and potato dextrose broth and after growth submitted to centrifugation, the supernatants (crude extracts) were evaluated. Antimicrobial activity was observed in the isolate GF9C (family Trichocomaceae) obtained in the medium malt, the crude extract inhibited the growth of bacterial strains *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. Antioxidant activities greater than 50% tested in reaction with the free radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2-azino bis (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid) (ABTS) were obtained by isolated fungi LF3C (*Talaromyces funiculosus*), GF16F (*Colletotrichum boniense*), CF7F (*Phomopsis sp*) and GF9C (Trichocomaceae family) in Czapek Dox medium. The anti-inflammatory activity was tested by reaction with membranes of human erythrocytes and the isolates C7FF, LF3C and GF9C, and the last two presented activity indexes of 94.82% and 49.32%, respectively. The crude extracts of these isolates were promising and it was possible to relate the anti-inflammatory activity to the presence of flavonoids. The results obtained in general corroborate the ability of endophytic fungi to produce bioactive compounds, and the activities tested have biotechnological potential for future applications in medicine.

Keywords: endophytic, bioactive compounds, medicinal plants, antioxidants, anti-inflammatories, antimicrobials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do composto antitumoral Taxol	6
Figura 2: Evolução do número de publicações realizadas com microrganismos endofíticos em plantas medicinais. A pesquisa foi realizada na plataforma de base de dados Scopus, com publicações contendo as palavras chaves: “Medicinal plant” e “endophytic”, os dados obtidos se iniciam no ano de 1999 de acordo com os registros contidos na base de dados.....	8
Figura 3: Estrutura básica de um flavonoide.....	11
Figura 4: Fluxograma da coleta de amostras de plantas à produção de extratos brutos a partir dos fungos obtidos.....	16
Figura 5: Amostras das plantas coletadas (A) <i>Siparuna guianensis</i> , (B) <i>Lafoensia pacari</i> , (c) <i>Guazuma ulmifolia</i> , (D) <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	25
Figura 6: Exemplo de uma placa de cultivo em meio malte, a 28 °C por 30 dias, com fungos crescidos a partir de fragmentos de folhas da espécie <i>Guazuma ulmifolia</i>	25
Figura 7: Fungos endofíticos isolados inoculados em meio ágar malte.....	28
Figura 8: Distribuição dos gêneros encontrados nas plantas selecionadas	29
Figura 9: Inibição da cepa bacteriana <i>E. faecium</i> pelo fungo GF9C, demonstrado através do halo formado em volta do fragmento do fungo.	30
Figura 10: Atividade antibacteriana pelo isolado GF9C contra a cepa <i>S. aureus</i>	32
Figura 11: Atividade antibacteriana pelo antibiótico ampicilina frente a <i>S. aureus</i> (a), halos de inibição com extrato de 5 dias em presença de <i>S. aureus</i> (b), halos de inibição com extrato de 15 dias em presença de <i>S. aureus</i> (c).	34
Figura 12: Crescimento do fungo GF9C obtido por biomassa seca.....	35
Figura 13: Atividade antioxidante no ensaio com DPPH ; (A) controle negativo, (B) LF3C, (C) GF9C, (D) GF5F, (E) GF16F, (F) SF2F, (G) CF7F, (H) SF8F, (I) GF13F.....	37
Figura 14: Atividade antioxidante no ensaio com ABTS ⁺ (A) controle negativo, (B) CF6F, (C) GF1F, (D) LF3C.....	37
Figura 15: Eliminação de radicais livres pelo método DPPH e ABTS ⁺	38
Figura 16: Detecção da presença de flavonoides em solução com cloreto de alumínio. Sendo (A) controle negativo, (B) extrato bruto de LF3C e (C) controle positivo na presença do flavonoide Rutina (45 µg mL ⁻¹).....	41
Figura 17: Teste colorimétrico de ação anti-inflamatória pelo método HRBC (Human Red Blood cell stabilization method), realizados com fungos inoculados em meio Czapek Dox, (A)	

controle (-) triton 0,1 %, (B) controle (-) água destilada, (C) controle (+) diclofenaco 1 mg mL⁻¹, (D) GF13F, (E) SF2F, (F) SF1F, (G) SF8F, (H) CF7F, (I) GF9C, (J) LF3C, (K) GF5F.....42

Figura 18: Teste colorimétrico da reação com aquecimento entre a solução de HRBC e soluções de extrato bruto. Sendo (A) controle positivo com ibuprofeno 400µg, (B) controle negativo com solução salina, (C) extrato bruto de CF7F, (D) extrato bruto de GF9C, (E) extrato bruto de LF3C.44

Figura 19: Espectro do antimicrobiano produzido pelo isolado GF9C.....45

Figura 20: Espectros de infravermelho do meio de cultivo Czapek Dox e extratos brutos dos isolados LF3C, GF9C e CF7F.47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fungos identificados a partir da comparação de suas sequências de DNA a sequências depositadas na plataforma NCBI.....	26
Tabela 2: Teste de antagonismo com os fungos isolados frente a espécies bacterianas	31
Tabela 3: Resultados da atividade antibacteriana com extratos brutos em diferentes tempos de crescimento dos fungos	34
Tabela 4: Quantidade equivalente de ácido ascórbico nos extratos brutos	40
Tabela 5: Porcentagens de proteção das membranas dos eritrócitos pelo método HRBC.....	44
Tabela 6: Grupamentos funcionais encontrados nos extratos brutos dos isolados por análise de FTIR.....	47
Tabela 7: Resumo dos resultados obtidos com os extratos brutos produzidos em meio Czapek Dox oriundos dos isolados LF3C, GF9C e CF7F.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®: marca registrada

µg: micrograma

ABTS: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

ATCC: American Type Culture Collection

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

FTIR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

HRBC: Human Red Blood Cells

mL: mililitro

NCBI: National Center For Biotechnology Information

°C – Graus Celsius

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

pH: potencial hidrogênico

RPM: rotação por minuto

UFC mL⁻¹: Unidade Formadora de Colônias por mililitro

UNESP: Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. OBJETIVO GERAL.....	2
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3. REVISÃO DA LITERATURA	2
3.1. COMPOSTOS BIOATIVOS DE ORIGEM MICROBIANA E IMPORTÂNCIA DA BIOPROSPECÇÃO	2
3.2. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS	4
3.3. VANTAGENS DA BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS	6
3.4. BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM PLANTAS DE USO MEDICINAL.....	7
3.5. PRINCIPAIS METABÓLITOS PRODUZIDOS POR ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	8
3.5.1. Antimicrobianos	9
3.5.2. Antioxidantes	10
3.5.2.1. Flavonoides.....	10
3.5.3. Anti-inflamatórios	12
3.6. ESPÉCIES MEDICINAIS UTILIZADAS NESTE ESTUDO.....	12
3.6.1. <i>Lafoensia pacari</i>	13
3.6.2. <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	13
3.6.3. <i>Guazuma ulmifolia</i>	14
3.6.4. <i>Siparuna guianensis</i>	14
4. MATERIAIS E MÉTODOS	15
4.1. COLETA DAS AMOSTRAS.....	16
4.1.1. Desinfecção.....	16
4.1.2. Isolamento dos fungos filamentosos.....	17

4.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	17
4.2.1. Extração do DNA	17
4.2.2. Amplificação do DNA por PCR	18
4.3. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	18
4.4. PRODUÇÃO DE EXTRATO BRUTO EM MEIO DE CULTIVO SUBMERSO	19
4.5. DETERMINAÇÃO DE ANTIBACTERIANOS	20
4.5.1. Método de difusão em ágar	20
4.5.2. Método de difusão em ágar soft	20
4.6. DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES	21
4.6.1. Determinação da atividade de eliminação de radicais pelo método com DPPH	21
4.6.2. Determinação da atividade de eliminação de radicais pelo método com ABTS ⁺ ...	21
4.6.3. Determinação da quantidade de antioxidantes presentes nos extratos brutos	22
4.6.4. Determinação de flavonoides totais	22
4.7. DETERMINAÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS	22
4.7.1 Método de estabilização da membrana dos glóbulos vermelhos humanos após indução de hemólise por solução hipotônica	22
4.7.2. Método da estabilização da membrana dos glóbulos vermelhos humanos após indução de hemólise por aquecimento.	23
4.8. LIOFILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE EXTRATO BRUTO	24
4.9. SELEÇÃO DE ISOLADOS COM MELHORES RESULTADOS NOS ENSAIOS COM EXTRATOS BRUTOS	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	24
5.1.1. Isolamento dos fungos	25
5.2. PRESENÇA DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	30
5.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO EM MEIO SUBMERSO.....	32
5.4. OBTENÇÃO DE ATIBACTERIANOS NO EXTRATO BRUTO	32

5.4.1 Seleção dos extratos brutos com melhores resultados na produção de antimicrobianos	33
5.4.1.1. Atividade antibacteriana no extrato bruto em ágar soft.....	33
5.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DOS ENSAIOS COM DPPH E ABTS⁺ ..	36
5.6. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE FLAVONOIDES TOTAIS	40
5.7. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	42
5.7.1. Determinação da estabilidade de membrana por indução de hemólise através de aquecimento.	43
5.8. ANÁLISE PARCIAL DAS ESTRUTURAS DOS EXTRATOS BRUTOS LIOFILIZADOS ATRAVÉS DE FTIR.	45
5.8.1. Análise do espectro obtido por FTIR para caracterização do antimicrobiano	45
5.8.2. Análise dos espectros obtidos por FTIR para caracterização de antioxidantes.	46
5.9. COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS PELOS ISOLADOS SELECIONADOS E AS RELAÇÕES ENTRE SUAS ATIVIDADES.	49
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS	52

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos vivem no interior de tecidos vegetais sem causar prejuízos a planta hospedeira. As associações aos tecidos podem ser simbióticas ou mutualísticas e promovem benefícios a planta, como resistência a doenças, tolerância a condições de estresse como ataque de herbívoros, maior disponibilidade de nutrientes e por fim aumento da biodiversidade (STROBEL et al., 2004; BERG, 2009; GOLINSKA et al., 2015).

Acredita-se que a maioria das plantas possuam microrganismos endofíticos, e que ao longo do processo evolutivo os microrganismos passaram a incorporar vias metabólicas das plantas, de forma que fungos e bactérias endofíticas podem produzir compostos fitoquímicos (STROBEL e DAISY, 2003). Outros aspectos que despertam interesse em relação a esses microrganismos são a diversidade de moléculas biológicas produzidas por eles em comparação a microrganismos epifíticos e do solo e também o baixo risco dessas moléculas serem citotóxicas, o que é de grande importância para a produção de potenciais fármacos. A maior diversidade de moléculas pode se dever as interações complexas entre os microrganismos com as plantas, assim também como o menor risco de toxicidade, uma vez que relações simbióticas e mutualísticas não causam prejuízos ou a morte ao hospedeiro (STROBEL, 2003; ALVIN et al., 2014)

Os principais compostos bioativos produzidos por esses microrganismos são moléculas derivadas de metabólitos secundários que podem apresentar propriedades antitumorais, antimicrobianas, antioxidantes, antivirais, agentes antidiabéticos, larvicidas e hormônios que promovem o crescimento em plantas (STROBEL, 2004; MEHTA, THUMAR e SINGH, 2014; GOLINSKA et al., 2015; SAINI et al., 2015). Assim a bioprospecção de microrganismos endofíticos e de seus metabólitos é apontada como fonte para a descoberta de novos fármacos para combater fitopatógenos e patógenos humanos resistentes a drogas convencionais, como vírus, bactérias e fungos, além de compostos que podem ter aplicações biotecnológicas na indústria e agricultura (TAN e ZOU, 2001; STROBEL e DAISY 2003).

Golinska e colaboradores (2015) relataram a importância do ambiente na diversidade de espécies de microrganismos e também dos compostos produzidos por eles, de forma que algumas estratégias podem ser adotadas para abranger esse aspecto. Os autores Strobel e Gary (2003) sugerem que o uso de plantas com histórico etnobotânico conhecido, como plantas de uso medicinal e a escolha de plantas originárias de ambientes de grande biodiversidade, podem auxiliar na obtenção de ambientes diferenciados.

Diante da importância da produção de compostos bioativos por microrganismos endofíticos, da relevância de ambientes tropicais como detentores de grande biodiversidade e do uso de plantas com histórico etnobotânico conhecido, este estudo teve por objetivo realizar a bioprospeção de fungos filamentosos isolados de plantas medicinais, para verificação da capacidade de produzir compostos bioativos com atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Isolar fungos filamentosos de plantas medicinais do Cerrado da região de Sorocaba-SP, para verificação da produção de compostos bioativos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos filamentosos das plantas medicinais *Lafoensia pacari*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Guazuma ulmifolia* e *Siparuna guianensis*, coletadas em Sorocaba-SP.
- Avaliar o potencial antagônico dos isolados frente a espécies bacterianas com potencial patogênico.
- Avaliar a produção de antioxidantes.
- Avaliar a produção de anti-inflamatórios.
- Identificar genotipicamente as espécies de fungos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. COMPOSTOS BIOATIVOS DE ORIGEM MICROBIANA E IMPORTÂNCIA DA BIOPROSPECÇÃO

Produtos naturais são definidos como compostos químicos de carbono provenientes de organismos vivos como, plantas, animais e microrganismos, derivados de processos metabólicos primários e secundários (BÉRDY 2005; DEMAIN e SANCHEZ, 2009). O metabolismo primário origina compostos comuns em todos os sistemas biológicos como polissacarídeos, ácidos nucleicos e ácidos graxos e o metabolismo secundário compostos de baixo peso molecular e composição química e metabólica extremamente diversa (BÉRDY, 2005).

Dados obtidos até o ano de 2005 mostram que o número de metabólitos conhecidos é superior a um milhão, com cerca de 5% produzidos por microrganismos. Dentre os produtos naturais produzidos por microrganismos 10% possuem atividade biológica, correspondendo a mais de 22.000 compostos, desses 45% produzidos por actinobactérias, 38% por fungos e 17% por bactérias. Compostos naturais com atividade bioativa ou biológica são definidos por apresentarem interações de qualquer natureza com outro composto ou organismo vivo, tais compostos podem ser derivados do metabolismo secundário (BÉRDY, 2005).

O papel dos metabólitos secundários ainda não é bem conhecido na microbiologia, uma vez que não são essenciais para o ciclo de vida do microrganismo produtor. As principais atividades são a de regulação, defesa e comunicação, além de diversas funções fisiológicas como a produção de hormônios, toxinas, antimicrobianos e também atividade biológica celular como sinalização intra e extracelular para indução a virulência ou resistência microbiana. A alta diversidade das funções dos metabólitos secundários sugere uma relação com os processos de interação entre o organismo e o ambiente (BÉRDY, 2012; BRADER et al, 2014).

Compostos bioativos de microrganismos apresentam diversas atividades como, antitumoral, antiviral, antifúngica, antibacteriana, hipoglicemiantes, antioxidante, inseticida, enzimáticas, imunossupressores e metabólitos promotores de crescimento em vegetais entre outros (STROBEL e DAISY, 2003; BÉRDY 2012; DEMAIN e SANCHEZ, 2009). Com a descoberta dos antibióticos há mais de 80 anos, houve um incentivo a procura por moléculas bioativas e até mesmo o que foi considerada a era de ouro dos bioativos, com destaque para a descoberta dos principais antibióticos utilizados atualmente e também medicamentos para tratar câncer e imunossupressores (STROBEL et al., 2004; BÉRDY, 2012; DEMAIN e SANCHEZ, 2009).

Nas últimas décadas, as grandes indústrias farmacêuticas começaram a ter prejuízos com os custos das pesquisas e vida curta desses medicamentos no mercado, como exemplo, o desenvolvimento da resistência bacteriana a antibióticos. O caminho para o desenvolvimento de um produto é custoso, envolvendo a escolha da fonte, o isolamento, caracterização estrutural e por fim a disponibilização no mercado (STROBEL et al, 2004). Entre os anos de 1980 a 2003 mais de 90% dessas pesquisas resultou em perda de lucro. Com isso o interesse mercadológico se voltou para a produção de medicamentos para doenças crônicas e utilização da química combinatória com a produção sintética de produtos. As pequenas empresas farmacêuticas e instituições acadêmicas assumiram então a maior parte das pesquisas por produtos naturais (STROBEL et al., 2004; BÉRDY, 2012).

Apesar da diminuição da descoberta de novos compostos bioativos, o advento das novas técnicas genômicas, como o sequenciamento de nova geração demonstrou que o conhecimento a cerca da diversidade microbiana e também da ocorrência e estrutura de seus metabólicos, está longe de ser saturado e com apenas uma pequena parte deles conhecidos (BRADER et al., 2014). Algumas alternativas são sugeridas para a obtenção de metabólitos inéditos como metodologias com maior sensibilidade, avaliação de estirpes pouco exploradas ou então a produção a partir de sequências genômicas (MONCIARDINI et al., 2014).

A avaliação de táxons e nichos pouco explorados pode ser uma alternativa a bioprospecção de novos metabólitos bioativos. Sugere-se então que a seleção por novas fontes não seja feita de forma totalmente randômica e sim com um estudo preventivo das fontes naturais pelo investigador (STROBEL et al., 2004). As bactérias e fungos que vivem associados a plantas, denominados microrganismos endofíticos, são ainda pouco explorados em relação a outros nichos como o solo e tem alto potencial para a pesquisa (BRADER et al., 2014).

3.2. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

O termo endofítico foi cunhado pela primeira em 1866 por De Bary. Endofíticos são, por definição, microrganismos que vivem no interior de tecidos vegetais sem causar danos a planta hospedeira (SCHULZ e BOYLE, 2006; GOLYNSKA et al., 2015). Fungos e bactérias são os microrganismos endofíticos mais frequentemente isolados, mas é provável que outros também ocorram como as arqueias. Especula-se também sobre bactérias dos grupos das riquetsias e micoplasmas, porém ainda não foram relatados (STROBEL et al., 2004).

Os fungos representam a maior diversidade de microrganismos endofíticos descobertos. Estima-se que existam mais de um milhão de espécies desses microrganismos (DREYFUSS e CHAPELA, 1994). Essa grande diversidade também pode ser corroborada de acordo com a diversidade das espécies vegetais, somente as florestas tropicais abrigam mais de 300.000 espécies de plantas, sendo esperado que existam pelo menos uma ou duas espécies de fungos endofíticos em cada espécie vegetal (JIA et al., 2016). Assim novos microrganismos podem ser descobertos e associados a eles novos metabólitos (STROBEL et al., 2004).

Os fungos endofíticos são mitospóricos (reprodução sexual desconhecida) e também meiospóricos (ciclo reprodutivo de forma sexuada). São encontrados nos tecidos das folhas, caules, pecíolos, cascas e sob o solo nas raízes (JIA et al., 2016). As bactérias endofíticas, assim como os fungos, são encontradas por todo o vegetal incluindo as sementes. A

diversidade de plantas envolve monocotiledôneas, dicotiledôneas, herbáceas e lenhosas (RYAM et al., 2009).

Estudos moleculares demonstram que a diversidade de bactérias endofíticas é vasta. Vários métodos de detecção são utilizados, entre eles destacam-se as técnicas de clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA, gradiente de desnaturação em gel de eletroforese (DGGE) e análise de polimorfismo de comprimento de fragmento para demonstrar a presença de colonização em vários tecidos vegetais. Além também da presença de bactérias de diferentes origens filogenéticas que são incultiváveis (RYAM et al., 2009).

Quanto às estratégias de colonização bactérias e fungos se comportam de formas semelhantes. A colonização de ambos ocorre de forma intercelular e intracelular, as bactérias, no entanto, são mais comuns na forma intercelular. Especificamente na colonização através das raízes, os fungos podem formar espirais intracelulares por grandes extensões. Já as bactérias invadem as raízes de forma mais passiva através de aberturas como feridas ou brotamento das raízes laterais (SCHULZ e BOYLE, 2006).

As plantas produzem diversas substâncias como as saponinas que servem como proteção contra organismos invasores, o que inclui possivelmente fungos endofíticos. Assim a colonização por esses microrganismos requer a secreção de substâncias para desintoxicação como as enzimas celulases, xilanases e proteases que conseguem decompor as substâncias de defesa da planta hospedeira e assim permitir a invasão dos tecidos (JIA et al., 2016). Após a invasão, os fungos podem permanecer em estado de latência ou estabelecer relações mutualísticas ou antagônicas o que pode depender de mudanças no ambiente que sejam favoráveis ao microrganismo. As interações com a planta hospedeira apresentam grande plasticidade, sendo dependentes de fatores ambientais como o estágio de vida da planta, condição nutricional, umidade e temperatura. Há relatos que demonstraram também, que microrganismos outrora com potencial patogênico permaneceram em estado de latência e por fim tiveram a perda ou supressão do gene causador da virulência (KOBAYASHI e PALUMBO 2000; SCHULZ e BOYLE, 2006; SIEBER, 2007).

Dentro das relações citadas anteriormente, bactérias e fungos endofíticos acabam proporcionando benefícios às plantas hospedeiras aumentando a resistência a doenças, tolerância a condições de estresse e aumento da disponibilidade de nutrientes. Supõe-se que as relações entre microrganismos e suas plantas hospedeiras contribuíram para a aptidão evolutiva de ambos (STROBEL et al., 2004; BERG, 2009; GOLINSKA et al., 2015).

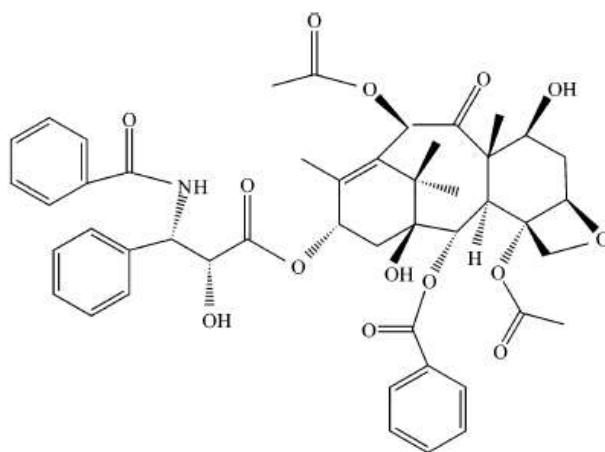
3.3. VANTAGENS DA BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

A distribuição de espécies endofíticas e, relacionada a ela, a diversidade química dos compostos sofrem influencia direta do ambiente. Em última análise, a diversidade biológica implica na diversidade de metabólitos uma vez que a inovação química seria constante em ambientes de maior pressão e seleção natural. De forma, que ambientes tropicais seriam fontes favoráveis para prospecção de compostos bioativos (REDELL e GORDON, 2000). Doroghazi e Metcalf (2013), também corroboram a importância da prospecção de microrganismos endofíticos, apontando a diversidade de metabólitos devido aos processos naturais de adaptação ao ambiente e competição por recursos comuns nas plantas e no solo.

Outro fator intrínseco de espécies endofíticas é a capacidade de produzir compostos semelhantes ou mesmo idênticos ao de suas plantas hospedeiras. Tal capacidade se deve as associações ao longo do tempo entre os endofíticos e suas hospedeiras, o que levou a participação dos microrganismos nas vias metabólicas das plantas, além da capacidade de incorporarem genes de seus hospedeiros (ALVIN, MILLER e NEILAN, 2014; GOLINSKA et al; 2015).

A primeira evidência que comprovou a produção de compostos por endofíticos semelhantes aos das plantas se deu com o fungo *Taxomyces andreanae* e seu bioativo antitumoral paclitaxel (Taxol®), figura 1.

Figura 1: Estrutura do composto antitumoral Taxol



Fonte: Strobel et al., 2004, p.265.

Usado tradicionalmente por populações nativas norte-americanas, o paclitaxel é o exemplo mais conhecido de composto bioativo que originalmente foi isolado da planta hospedeira, *Taxus brevifolia* e, posteriormente, em um fungo endofítico. Atualmente já foi comprovado que vários fungos de diversas plantas não produtoras são capazes de sintetizar o

metabólito, o isolamento da substância já foi feito em diversas partes do mundo como na Austrália e América do Sul (STROBEL e DAISY, 2003; ALVIN, MILLER e NEILAN, 2014). Outros fármacos que podem ser citados como anticancerígenos são a camptotecina e podofilotoxina (PURI et al., 2006).

Assim os microrganismos representariam também uma fonte alternativa de compostos fitoquímicos com a vantagem de não precisar utilizar plantas de crescimento lento, raro ou mesmo ameaçadas (STROBEL e DAISY, 2003). A natureza das relações entre plantas e microrganismos como a simbiótica ou mutualística indica que os compostos bioativos endofíticos são menos susceptíveis de possuir toxicidade celular, uma vez que tais compostos não afetam de maneira negativa a planta hospedeira, o que é muito relevante para a obtenção de um produto final para distribuição no mercado (ALVIN, MILLER e NEILAN, 2014). Outra vantagem da produção de metabólitos por endofíticos são as alterações que podem ser feitas nos processos de produção como mudanças no pH, aeração, controle de oxigênio e temperatura que podem otimizar a qualidade e quantidade dos compostos (KUSARI, HERTWECK e SPITELLER, 2012).

3.4. BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS EM PLANTAS DE USO MEDICINAL

A obtenção de novos microrganismos e possivelmente novos metabólitos pode ser vinculada a uma estratégia para a realização da bioprospeção. Assim algumas hipóteses podem ser levadas em consideração, Strobel et al (2004) propõem alguns critérios: plantas com biologia incomum com estratégias únicas de sobrevivência; plantas endêmicas com longevidade incomum ou que ocupem locais demasiadamente antigos; plantas que habitam lugares de grande biodiversidade e por fim; plantas com histórico etnobotânico conhecido relacionados a usos específicos por populações tradicionais.

De forma que o último critério proposto por Strobel et al (2004), engloba o uso de plantas medicinais como uma fonte a ser pesquisada. Plantas são historicamente usadas para tratamento de doenças, desde tempos imemoriais, com as primeiras descrições na forma escrita em textos do antigo Egito, Suméria, China e até mesmo relatos bíblicos (KAUL et al., 2012). Plantas medicinais são definidas segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) como “qualquer planta com um ou mais órgãos que contenham substâncias que podem ser utilizadas para terapia ou que sejam precursoras de substâncias usadas em terapias” (KAUL et al., 2012).

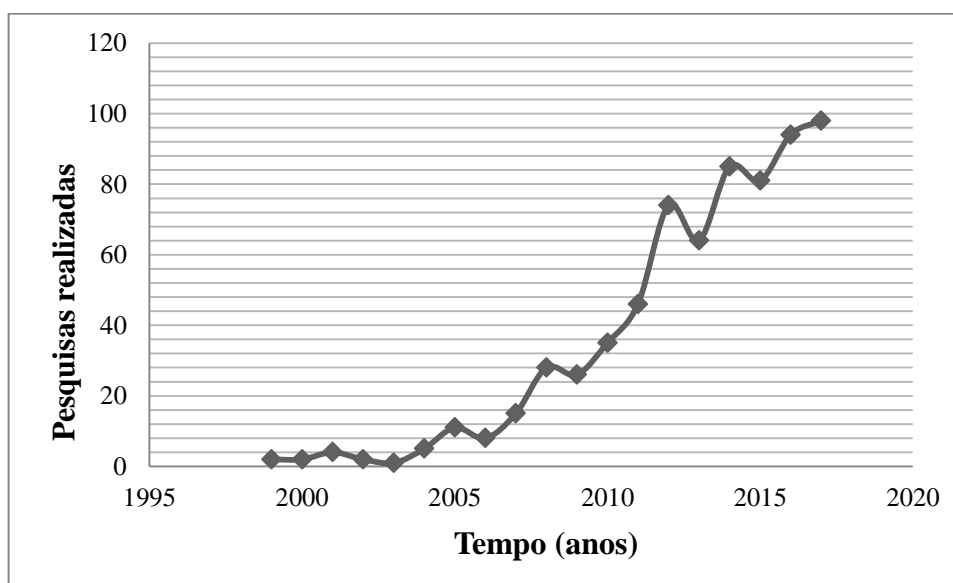
Muitas populações tradicionais detêm o conhecimento sobre plantas com poder de cura, mas a passagem de tal conhecimento ocorre apenas dentro das próprias comunidades (ALVIN, MILLER e NEILAN, 2014). O estudo etnobotânico surgiu como uma forma de transferir o conhecimento tradicional para a sociedade moderna. Os objetivos dessa ciência incluem o entendimento das interações entre os seres humanos e os recursos naturais incluindo fatores como crença, linguagem e história cultural (MENENDEZ-BACETA et al., 2015). O conhecimento etnobotânico serve então como base para a bioprospecção de compostos pela ciência moderna.

3.5. PRINCIPAIS METABÓLITOS PRODUZIDOS POR ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS

Nos últimos 20 anos houve um aumento de estudos para a bioprospecção de moléculas de endofíticos, gerando dados sobre diversas moléculas bioativas como antimicrobianas, inseticidas e anticancerígenas que foram classificadas em diferentes tipos de estrutura como alcaloides, lactonas, fenóis, quininas, terpenoides e esteroides. Apresentando os endofíticos como uma fonte para aplicações em biotecnologia e medicina (ZHANG, SONG e TAN, 2006; ZHAO, XU E JIANG, 2012).

Dados obtidos da plataforma Scopus, corroboram o aumento na bioprospecção por moléculas bioativas também para microrganismos de plantas medicinais (Figura 2).

Figura 2: Evolução do número de publicações realizadas com microrganismos endofíticos em plantas medicinais. A pesquisa foi realizada na plataforma de base de dados Scopus, com publicações contendo as palavras chaves: “Medicinal plant” e “endophytic”, os dados obtidos se iniciam no ano de 1999 de acordo com os registros contidos na base de dados.



Fonte: Elaboração do autor a partir da plataforma de base de dados Scopus.

3.5.1. Antimicrobianos

Compostos antimicrobianos são caracterizados por possuírem baixo peso molecular e serem derivados naturais, podendo ser produzidos por microrganismos e ativos em baixas concentrações contra outros microrganismos (GUO et al., 2000). Diversas bactérias e fungos endofíticos produzem antimicrobianos, sendo estes compostos os mais relatados em estudos, de modo então que será citada apenas pequena parte dos dados disponíveis a fim de caracterizar essa linha de pesquisa.

O fungo *Phoma* sp. isolado de diversas plantas medicinais, vem sendo considerado uma fonte de antimicrobiano. O novo composto derivado de α -tetralona em conjunto aos outros compostos cercosporamida, B-sitosterol e tricodermina, exibiram atividade antagônica contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Magnaporthe oryzae* e também para as bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas campestris* e *Xanthomonas oryzae* (WANG et al., 2012).

Duas novas substâncias as benzopirranonas diapanona A e B, foram isoladas do fungo *Diaporthe* sp. endofítico das folhas da planta *Pandanus amaryllifolius* e inibiram o crescimento de estirpes virulentas da espécie bacteriana *Mycobacterium tuberculosis* (BUNGIHAN et al., 2011). Dois novos alcaloides elucidados como 12 β -hidroxi-13 α -metoxiverruculogenio TR-2 e 3-hidroxifumiquinazolina-A, produzidos pela cepa *Aspergillus fumigatus* LN-4 endofítico de *Melia azedarach*, exibiram atividade antifúngica.

As substâncias sesquiterpenos, diterpenoides e triterpenoides são os principais tipos de terpenoides produzidos por fungos endofíticos. Os terpenoides já foram relatados pela atividade antimicrobiana (KAUL et al., 2012). O fungo *Phomopsis cassiae* endofítico da espécie *Cassia spectabilis* produziu cinco tipos de sesquiterpenos que demonstraram atividade antifúngica. A espécie *Xylaria* sp. endofítica de *Piper Aduncum* produziu dois novos tipos de sesquiterpenos com atividade antifúngica. Já a espécie de levedura *Pichia guillermondii* Ppf9 endofítica da espécie *Paris polyphylla* Var. *Yunnanensis* produziu quatro tipos de terpenoides com alta atividade antibacteriana (KAUL et al., 2012).

Em relação aos antimicrobianos produzidos por bactérias endofíticas, nos últimos anos vários novos antibióticos foram descobertos a partir de actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces*. Dentre esses antimicrobianos, muitos antibióticos demonstraram atividade em concentrações significativamente baixas, indicando o espectro forte e amplo (GOLINSKA et al., 2015).

Uma das primeiras cepas endofíticas descobertas do gênero *Streptomyces*, foi a *Streptomyces* spp. isolada da planta *Lolium perene* (gramínea) e produziu um antibiótico de

ação fraca, porém novos estudos se voltaram para a bioprospecção de actinobactérias (STROBEL et al., 2004). A cepa *Streptomyces* NRRL 30562 foi isolada da planta medicinal *Kennedia nigricans* (usada por povos tradicionais australianos) e produziu diversos antibióticos compostos de peptídeos (CASTILLO et al., 2001).

Em estudo realizado com plantas medicinais na floresta tropical na região de Xishuangbanna na China, 2.174 actinobactérias foram isoladas e identificadas como pertencentes a 32 gêneros diferentes, dentre eles o gênero *Streptomyces* novas espécies de actinobactérias foram relatadas e várias com ação antimicrobiana (QIN et al., 2009). Dados levantados pelos autores reforçam a importância da bioprospecção, para descoberta de novos compostos.

3.5.2. Antioxidantes

Antioxidantes são definidos como substâncias com capacidade de proteger células de danos causados por moléculas instáveis como os radicais livres. Algumas doenças degenerativas como câncer, aterosclerose e o Alzheimer estão associadas a reações com essas moléculas (STROBEL, 2004). Antioxidantes existem como método de defesa ao estresse oxidativo, na forma enzimática ou não e também intracelular ou extracelular. Os mecanismos de ação podem ser únicos ou vários, através da eliminação da peroxidação, atividade quelante de íons metálicos, quebra da reação que ocorre em cadeia da autoxidação e diminuição da quantidade de oxigênio local. A eficácia depende das características químicas e físicas do agente oxidante (BREWER, 2011; NIMSE e PAL, 2015).

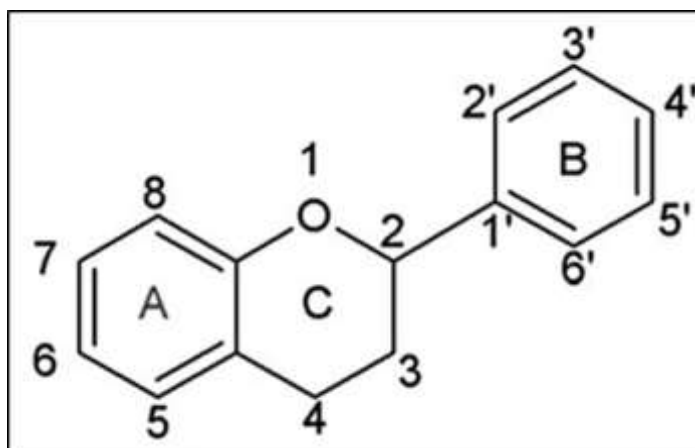
3.5.2.1. Flavonoides

Dentro dos compostos antioxidantes naturais, os flavonoides são uma importante classe. Constituídos de estruturas de polifenóis, são encontrados em frutas, vegetais, chás, vinhos, raízes e metabólitos secundários de plantas. Estudos tem demonstrado que fungos endofíticos também produzem flavonoides como um metabólito secundário, sendo que a atividade antioxidante de fungos está relacionada a presença de flavonoides (JIA et al., 2016.; PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2016).

Flavonoides oriundos de plantas são bem estudados e suas funções biológicas incluem fertilização do pólen, proteção contra patógenos, proteção de raios ultravioleta e coloração das flores. As funções biológicas em fungos não são esclarecidas, mas sabe-se que microrganismos podem produzi-los de forma idêntica ao das plantas sendo usados em engenharia genética para produções em alta escala (FERREYRA, RIUS e CASATI, 2012).

Os flavonoides são divididos nos grupos das flavonas, flavonóis, flavononas presente em cítricos, isoflavonoides comuns em leguminosas e soja, neoflavonoides, catequinas que são derivadas das flavononas, antocioninas e chalconas. A classificação das estruturas é feita segundo o posicionamento e grau de instauração do anel aromático denominado C, dos três anéis que compõe a estrutura básica de todo flavonoide (figura 3) (BREWER, 2011; PANCHE, DIWAN e CHANDRA, 2016).

Figura 3: Estrutura básica de um flavonoide



Modificado de Panche, Diwan e Chandra, 2016, p.3.

A propriedade dos flavonoides de atuar como antioxidante é presente em todos os grupos e é amplamente estudada, devido também aos resultados promissores em estudos envolvendo o tratamento de doenças humanas (NIJVELDT et al., 2001, LEE, KANG e CHO, 2007).

Os compostos pestacina e isopestacina derivados do fungo *Pestalotiopsis microspora* isolado da planta *Terminalia morobensis* na Papua Nova Guiné se assemelharam a atividade antioxidante de flavonoides, eliminando superóxidos e outros radicais livres em solução (STROBEL, 2004). A pestacina apresenta ainda atividade pelo menos uma vez maior do que o trolox, composto antioxidante derivado da vitamina E (HAPER et al., 2003).

Outros antioxidantes derivados de fungos tiveram suas estruturas elucidadas. Três novos derivados do antioxidante isobenzofuranona foram obtidos do fungo *Cephalosporium* sp. da planta *Sinarundinaria nitida* (HUANG et al, 2012). Os antioxidantes, ácido Cajaninstilbene detectado no fungo do gênero *Fusarium*, endofítico da ervilha Pombo (*Cajanus cajan*) e os antioxidantes não totalmente elucidados isolados do fungo macroscópico *Xylaria* sp. (cepa YX-28) da espécie medicinal *Ginkgo biloba* e *Chaetomium* sp. da planta *Nerium oleander*, apresentaram atividades semelhantes, com alto teor antioxidante devido a presença de flavonoides e compostos fenólicos (KAUL et al., 2012).

3.5.3. Anti-inflamatórios

Processos inflamatórios são causados por agentes biológicos como bactérias, vírus e fungos, agentes químicos como ácidos, agentes imunes (antígenos) e também agentes físicos como calor ou frio excessivos. O mecanismo básico ocorre com alterações celulares e vasculares através de sinais emitidos pelas células sanguíneas, o que acaba por gerar vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e exsudação de plasma, gerando os sinais clássicos de uma inflamação como vermelhidão, aumento da temperatura local e dor (WILLIANS, 1983).

Diversos medicamentos são utilizados para inibir as manifestações dos processos inflamatórios, devido a sensações de desconforto. Dentre eles os corticoides, sendo muito utilizados, porém ainda existem muitos efeitos adversos, levando a investimentos em pesquisas que procuram desenvolver e descobrir compostos com maior seletividade (KASSUYA, 2006). Estudos sobre fungos e bactérias endofíticos produtores de anti-inflamatórios são escassos, assim o levantamento apresentado aqui se refere a estudos com cogumelos, devido a maior disponibilidade de dados e elucidação dos compostos.

Os cogumelos vêm sendo estudados como possíveis supressores de componentes do sistema imune, uma vez que extratos de cogumelos podem inibir a ação de várias citocinas inflamatórias (LULL, WICHERS e SAVELKOUL, 2005). Alguns exemplos podem ser citados como o obtido por Schreiber et al (2017), que utilizaram extratos com os metabólitos secundários fúngicos dehidrocurvularina e galiellalactona para tratar inflamações no intestino. Já Du e colaboradores (2015) obtiveram resultados com beta glucanos, sendo ressaltado pelos autores que tal composto ainda apresenta resultados favoráveis como antitumorais e imunomoduladores. É discutido ainda que D-glucano é a forma biológica mais ativa dos beta-glucanos, porém os mecanismos de ação ainda não foram totalmente elucidados.

Vale a pena ressaltar que apesar não terem sido encontrados dados com fungos filamentosos e bactérias, os flavonoides, mencionados anteriormente, são frequentemente relatados como anti-inflamatórios. Sendo os flavonoides os principais compostos antioxidantes produzidos por fungos, estes podem também ser potenciais anti-inflamatórios (SERAFINI, PELUSO e RAGUZZINI, 2010).

3.6. ESPÉCIES MEDICINAIS UTILIZADAS NESTE ESTUDO

A escolha das espécies se deveu à característica etnobotânica do uso medicinal, por serem nativas do bioma cerrado e por não terem sido encontrados estudos relacionados à suas microbiotas de fungos endofíticos.

3.6.1. *Lafoensia pacari*

A espécie *Lafoensia pacari* conhecida como mangaba brava, pacari e dedal, pertence à família Lythraceae, da ordem Myrtales e é típica da fitofisionomia do cerrado amplamente distribuída em vários estados brasileiros dentre eles, São Paulo, Mato Grosso, Paraná, Santa Catarina e Bahia. Pode ser encontrada também no Paraguai e Bolívia (SANTOS, COELHO e PIRANI, 2009). O florescimento ocorre nos meses de outubro, novembro e dezembro com maturação dos frutos entre abril e junho. As folhas são curto-pecioladas, verde escura na superfície superior e clara na inferior, atingindo comprimento de até 15 cm. Já as flores são brancas e polinizadas por morcegos e mariposas e seus frutos são do tipo cápsula cônica em forma de dedal (LORENZI, 1998).

Os conhecimentos etnobotânicos da espécie na medicina tradicional apresentam o uso para o tratamento de várias doenças como febre, úlcera gástrica, inflamações no útero, emagrecimento e feridas (SANTOS, COELHO e PIRANI, 2009). Um exemplo que pode ser citado é o estudo realizado por Rogerio et al (2006) com extratos da planta que demonstraram atividade anti-inflamatória e analgésica, sendo o composto identificado como o ácido elágico. Rogerio et al (2008) também demonstraram o potencial da espécie no combate a asma.

3.6.2. *Campomanesia xanthocarpa*

Campomanesia xanthocarpa, popularmente conhecida no Brasil como guabiroba ou guabirobeira, guavirova, guabiroba-miúda e guabirobeira-do-mato, pertence a família das Myrtaceae e ocorre na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil nos estados ao longo de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (VALLILO et al., 2008; GOGOSZ et al., 2010). A espécie pode ser em forma de arbusto ou arvoreta atingindo de 10 m a 20 m de altura, as folhas são opostas, ovalado-oblongas com até 10 cm de comprimento, os frutos são esverdeados, mas se tornam amarelos quando maduros. A dispersão ocorre através de pássaros e mamíferos (VALLILO et al., 2008).

A espécie apresenta importância econômica na produção de licores e refrescos, doces caseiros, sorvetes e aguardente. Já em relação a medicina tradicional, as folhas são preparadas em infusão para o tratamento de diarreia, reumatismo e para diminuir o colesterol (BALLVE et al., 1995).

3.6.3. *Guazuma ulmifolia*

Guazuma ulmifolia é conhecida pelos nomes populares, mutamba, cabeça de nego, pau-de-bicho, Chico magro entre outros e é classificada seguindo a divisão: Magnoliophyta (angiospermas) da classe Magnoliopsida (Dicotyledoneas), ordem Malvales, família Sterculiaceae, gênero *Guazuma* (CARVALHO, 2007). São encontradas por toda a América tropical incluindo Cuba, México, Equador, Paraguai, Bolívia, Peru e Colômbia, com apenas Bahamas como exceção.

Especificamente no Brasil é dominante no bioma cerrado, mas pode ser encontrada desde a Amazônia até o Paraná. É uma espécie pioneira e importante para a recuperação de áreas degradadas, participando dos estágios iniciais da sucessão secundária, classificada por fim como secundária inicial (SOBRINHO e SIQUEIRA, 2008). Quanto à biologia da espécie, *Guazuma ulmifolia* pode ter forma de árvore ou de arvoretas atingindo até 30 m de altura na idade adulta. Possuem copas densas e as folhas são ovaladas ou lanceoladas, as inflorescências são panículas ramificadas em pedúnculos com até 40 flores. As flores são pequenas com 5 a 10 mm de comprimento, com 5 pétalas. Os frutos são capsulas esverdeadas podendo ser negras com 1,5 cm até 3,5 cm de comprimento. As sementes são ovoides com 3 mm a 5 mm de diâmetro. A espécie é monoica, com a polinização feita majoritariamente por abelhas e a floração ocorre por todo ano dependendo da região do país (CARVALHO, 2007).

Na medicina tradicional a casca é utilizada para o tratamento de diarreias, hemorragias, febre, tosse, bronquite, asma, doenças gastrointestinais, hipertensão e como estimulante para contrações uterinas. As folhas são utilizadas para fabricar chás e tratar doenças renais, gastrointestinais, febre, disenteria, diabetes, erupções cutâneas e calvícies (DOMINGUEZ e ALCORN, 1985; ALARCON-AGUILARA et al., 1998; CABALLERO-GEORGE et al., 2001).

3.6.4. *Siparuna guianensis*

Siparuna guianensis possui vários nomes populares. Nos estados do Mato Grosso e Goiás é conhecida como negramina, em Minas Gerais, folha santa e marinheiro, no Distrito federal como limão bravo e no interior de São Paulo como amescla de cheiro e mata cachorro. Outros nomes podem ser encontrados em outros estados do país (VALENTINI et al., 2010).

A distribuição da espécie ocorre por toda a parte norte da América do Sul até o Paraguai e foi descrita pela primeira vez nas Guianas francesas em 1775. Em relação as características biológicas, são arbustos ou arvoretas, alcançando até 15 m de altura, monoicas, folhas alongadas ou lanceoladas. As inflorescências são agrupadas com 1,0 cm a 1,5 cm de

comprimento, compostas de 5 a 15 flores, sendo estas amarelas esverdeadas com 4 a 6 pétalas (RENNER e HAUSNER, 2005). Os frutos ou pseudofrutos são múltiplos e globosos com 0,68 a 1,32 cm de comprimento, podendo ser vermelho-esverdeados (RENNER e HAUSNER, 2005).

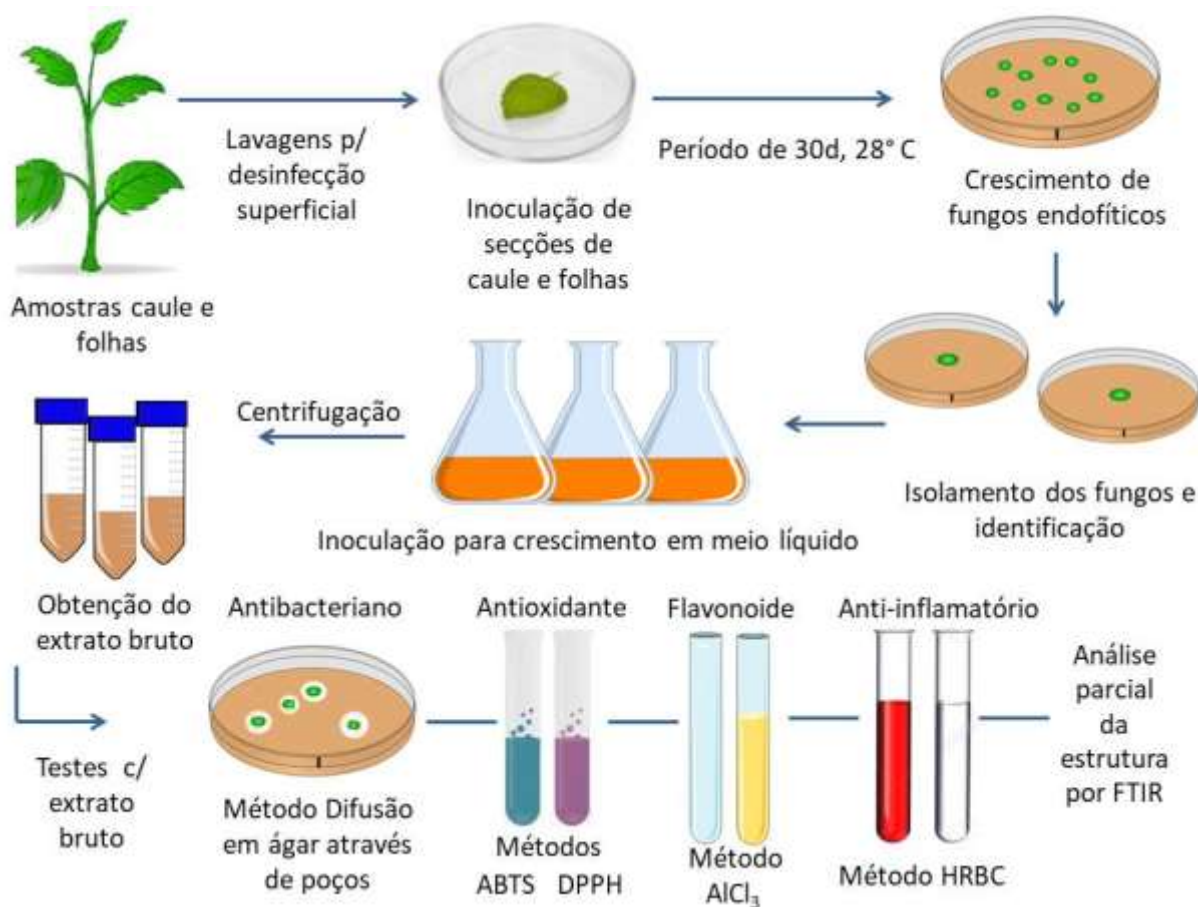
A polinização é feita por moscas da família Cecidomyiidae à noite com a postura de ovos nas flores pelas fêmeas (FEIL, 1992). A dispersão é feita por pássaros, conhecidos como papa mosca, dentre eles as espécies *Mionectes oleagineus* e *Mionectes striaticollis*. As aves levam os frutos para se alimentarem em locais seguros e as sementes são eliminadas através das fezes, realizando a dispersão (RENNER e HAUSNER, 2005). Outros estudos também relatam a atividade por formigas como a espécie *Pachycondyla villosa* Fabricius e por primatas da espécie *Callithrix flaviceps* (VALENTINI et al., 2010).

Quanto aos conhecimentos etnobotânicos se estendem do Panamá, Amazônia, Guiana, Peru, Equador e Colômbia. Na medicina tradicional, as folhas são usadas para a produção de chás e cataplasmas e utilizadas para o tratamento das mais diversas doenças, como gripe, febre, cólicas e distúrbios estomacais (VALENTINI et al., 2010). Comunidades indígenas também fazem uso da espécie. Índios da etnia Tikuna na região do Amazonas fazem o uso dos frutos para problemas de indigestão, já a etnia Kubeo para o tratamento de congestão nasal e mordidas de serpentes (BOURDY et al., 2000).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos utilizados para o isolamento dos fungos, cultivo e obtenção dos compostos bioativos estão brevemente descritos no fluxograma da figura 4. O processamento detalhado das amostras é descrito nos itens seguintes no texto.

Figura 4: Fluxograma da coleta de amostras de plantas à produção de extratos brutos a partir dos fungos obtidos.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.1. COLETA DAS AMOSTRAS

As plantas *Lafoensia pacari*, *Campomanesia xanthocarpa*, *Siparuna guianensis* e *Guazuma ulmifolia*, foram coletadas em fragmentos de mata com característica predominante do bioma Cerrado, localizado no campus da Universidade Federal de São Carlos-SP, no município de Sorocaba.

Amostras de folhas e caule, em duplicata, com aparência saudável foram seccionadas e acondicionadas em sacos plásticos previamente esterilizados e transportados até o Laboratório de Microbiologia Ambiental- UFSCar Sorocaba-SP, para análise.

4.1.1. Desinfecção

A fim de eliminar microrganismos epifíticos, as amostras foram desinfetadas superficialmente, com a imersão em álcool 70% por 1 minuto, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio 2% por 5 minutos, álcool 70% por 30 segundos e, finalmente, lavadas

com água destilada e esterilizada. Todo o procedimento foi realizado dentro de tubos esterilizados do tipo falcon de 50 mL, de forma que as amostras foram imersas e agitadas dentro dos tubos. Para confirmar a desinfecção, alíquotas de 0,1 mL da água destilada estéril utilizada na última lavagem, foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar malte (composto de 20g de extrato de malte e 20g de ágar por litro) e incubadas por 5 dias a 28 °C. Este procedimento foi adaptado de Zhao, Xu e Jiang (2012).

4.1.2. Isolamento dos fungos filamentosos

As amostras, devidamente desinfetadas, foram assepticamente dissecadas em pequenos pedaços com, aproximadamente, 25 mm² de área e semeadas no meio ágar malte, pH 6, seguido de incubação por 30 dias a 28 °C. O crescimento foi acompanhado diariamente e as colônias fúngicas foram isoladas e purificadas por sucessivos repiques em meio ágar malte, adaptado de Santos et al (2015). Os fungos isolados foram mantidos sob refrigeração a 4° C de acordo com o método descrito por Castellani (1939) e o meio de cultivo utilizado foi o ágar malte.

4.2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

4.2.1. Extração do DNA

A identificação genotípica foi realizada para todos os fungos isolados. A extração de DNA foi realizada por combinação de métodos mecânicos e químicos, baseado no protocolo descrito por Silva et al. (2012). Amostras de cada um dos micélios fúngicos foram coletadas com auxílio de alça de inoculação e transferidas para soluções de 500 µL de tampão de lise (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, NaCl 250 mM, SDS 1,0%, pH 8,0) com 0,2 g de pérolas de vidro. As amostras, nas soluções de lise, foram submetidas a choque térmico e incubação em banho-maria a 90°C por 5 minutos seguido de congelamento a temperatura de -18°C. Após esses processos, as amostras foram agitadas em o vórtex, durante 30 minutos. Os procedimentos seguintes constituíram-se de sucessivas lavagens com solventes e centrifugações. Após o processo de agitação, as amostras foram centrifugadas por cinco minutos, a 10.000 g e 25 °C, e os sobrenadantes recolhidos. Os sobrenadantes foram então transferidos para solução de 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1), homogeneizados manualmente com a inversão dos tubos e submetidos a centrifugação por 15 minutos, a 10.000 g e 25 °C. Novamente o sobrenadante foi recolhido e dessa vez transferido para soluções de 500 µL de clorofórmio, onde novamente foram centrifugados sob as mesmas

condições anteriores. Os sobrenadantes foram recolhidos e esse processo de lavagem com clorofórmio repetido.

Os sobrenadantes obtidos foram adicionados de 500 µL de isopropanol gelado e foram mantidos em temperatura de -18 °C por 16 horas. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 20.000 g a 4 °C, por 20 minutos, dessa vez os precipitados foram recolhidos. Os precipitados foram suspensos em 200 µL de etanol (70%) gelado, seguidos de centrifugação por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os precipitados foram preservados nos tubos e estes permaneceram abertos até evaporação do etanol. As amostras finais foram suspensas em alíquotas de 50 µL de água ultra purificada e armazenadas a temperatura de -18 °C.

4.2.2. Amplificação do DNA por PCR

Os produtos das extrações foram utilizados para amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) do DNA ribossomal (gene ITS rRNA) utilizando os iniciadores ITS1 (5'-TCC GTA GGTGAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). A reação de PCR consistiu nos ciclos: (1) 94°C por 3 minutos; (2) 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e (3) 72°C por 10 minutos, segundo protocolo de Cui et al (2015).

Os produtos de PCR contendo o DNA amplificado foram purificados utilizando o kit Wizard® Genomic DNA-Promega e os sequenciamentos realizados na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita" (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV). As sequências foram editadas através o software Bioedit (Hall, 1999) e comparadas com sequências depositadas na base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) para identificação de estirpes.

4.3. AVALIAÇÃO QUALITATIVA DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A avaliação qualitativa de atividade antibacteriana foi realizada por meio de triagem com microrganismos potencialmente patogênicos e que também são frequentemente relacionados a infecções hospitalares (TROVAL et al., 2014; SOLBERG, 2010; GILMORE, LEBRETON, SCHAIK, 2013). As bactérias teste utilizadas foram as gram negativas *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e gram positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecium* ATCC 6569.

Os fungos isolados foram submetidos a um ensaio em meio sólido proposto por Ichikawa et al (1971). Os fungos foram inoculados em meio ágar, por 5 dias a 30 °C. Após o

crescimento, pedaços de 5 mm de diâmetro foram recortados de forma asséptica com auxílio de tubos Durham e inoculados em placas de Petri previamente inoculadas com as bactérias teste em ágar Mueller Hinton.

As bactérias teste foram reativadas em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 35 °C por 24 horas. Após o crescimento, estas foram inoculadas em ágar nutriente e incubadas sob as mesmas condições. Após o crescimento no meio ágar nutriente, colônias foram retiradas e adicionadas a alíquotas de 10 mL de água destilada estéril até atingir a turbidez de 0,5 na escala de Mc Farland, que corresponde a, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Este procedimento foi adaptado da norma M2-A8 da NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). A inoculação das bactérias no meio Mueller Hinton foi feita com auxílio de hastes de algodão (swab). As placas-teste foram incubadas a 35 °C por 24 horas e os halos de inibição foram considerados como resultado positivo. Esse teste foi realizado em duplicata para cada fungo isolado.

4.4. PRODUÇÃO DE EXTRATO BRUTO EM MEIO DE CULTIVO SUBMERSO

Os fungos isolados foram submetidos ao cultivo submerso para obtenção dos extratos brutos e os extratos foram avaliados quanto a presença de compostos bioativos com atividades antibacterianas, antioxidantes e anti-inflamatórias. Três meios de cultivo líquidos foram utilizados a fim de verificar possíveis diferenças nas propriedades dos compostos bioativos produzidos pelos fungos.

Os isolados foram reativados com o cultivo em meio ágar malte por 5 dias a 30 °C. A inoculação nos meios submersos foi feita em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de cada meio de cultivo. O procedimento foi baseado em Phongpaichit et al (2006). Os meios de cultivo avaliados foram:

Caldo extrato de malte (extrato de malte 20 g L^{-1}), caldo batata dextrose (composto em g L^{-1}), batata (200) e dextrose (20) e o meio líquido Czapek–Dox composto por (g L^{-1}): NaNO_3 (3); K_2HPO_4 (1); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5); KCl (0,5); FeSO_4 (0,01); sacarose (30). Os fungos foram cultivados a 30 °C por 20 dias a 150 rpm (CUI et al., 2015).

Após a incubação os meios de cultura foram centrifugados a 7500 rpm por 10 minutos a 4° C e, posteriormente, filtrados em papel filtro de forma asséptica (modificado de Arora e Chandra, 2011). Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.5. DETERMINAÇÃO DE ANTIBACTERIANOS

4.5.1. Método de difusão em ágar

O método utilizado foi o de difusão do extrato bruto em poços feitos no ágar. O método consiste na adição do extrato a ser testado em pequenos poços de 5 mm de diâmetro no meio de cultivo ágar Mueller Hinton previamente inoculados com as bactérias teste, a inoculação foi realizada com hastes de algodão (swab). Os volumes foram de 25 µL, 50 µL e 100 µL e as bactérias testadas, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecium* ATCC 6569. O crescimento das cepas bacterianas e a padronização foram feitos como descrito no item 4.3. O método utilizado baseou-se nos trabalhos de Passari et al (2015) e Balouiri, Sadiki e Ibsouda (2016). A incubação foi feita por 24 horas a 35 °C e os experimentos em triplicata.

4.5.2. Método de difusão em ágar soft

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de perfuração em ágar soft através de poços, baseado em Jozala et al., (2007) e Arauz (2011). Alíquotas para a obtenção dos extratos brutos foram retiradas do meio de cultivo nos tempos de 5, 10 e 15 dias, as condições de centrifugação foram de 7.500 rpm por 10 minutos a 4 °C. O antagonismo foi testado na presença das cepas *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC25923. O crescimento das cepas bacterianas e a padronização foram feitos como descrito no item 4.3.

Com a padronização do crescimento das bactérias, alíquotas de 600 µL de cada cepa foram adicionados a 100 mL de ágar soft Mueller Hinton preparado com 0,8% de ágar bacteriológico. Em seguida, 25 mL de ágar foram adicionados a placas de petri de 90 mm de diâmetro, de modo que a espessura do ágar atingisse 5 mm. Após a secagem poços de 5mm de diâmetro foram feitos com auxílio de um tubo Durhan previamente esterilizado. Cem µL de cada extrato foram adicionados aos poços, sendo ampicilina na concentração de 60 µg mL⁻¹ utilizada como controle positivo. A presença de halos de inibição foi considerada como resultado positivo, os halos foram medidos com auxílio de um paquímetro.

O crescimento do fungo também foi mensurado através da obtenção da biomassa seca. A biomassa foi retirada após processo de centrifugação realizado para obtenção de cada extrato bruto nos tempos de 5, 10 e 15 dias. Os precipitados (biomassa) obtidos na centrifugação foram submetidos a secagem em estufa a temperatura de 105 °C até estabilização do peso, a biomassa (crescimento do fungo) foi estimada em grama por litro.

4.6. DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES

4.6.1. Determinação da atividade de eliminação de radicais pelo método com DPPH

A avaliação da produção de antioxidantes foi feita com a utilização de 2,2- difenil-1- picril-hidrazila (DPPH). O DPPH em contato com substâncias antioxidantes é reduzido, mudando a coloração inicial púrpura para amarela, com desaparecimento de absorção que pode ser acompanhada por decréscimo da absorbância por espectrofotometria em luz visível. A partir do decréscimo da absorbância pode se medir a atividade sequestradora de radicais livres pela porcentagem de DPPH remanescente (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A atividade de remoção dos radicais do DPPH, foi realizada segundo Cui et al (2015) com pequenas modificações. Alíquotas de 1 mL de cada amostra do extrato bruto foi adicionada a 2 mL de solução de DPPH ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em álcool etílico 95%). A solução foi agitada e em seguida incubada em ausência de luz por 30 minutos a 35°C . A absorbância foi medida a 517 nm em espectrofotômetro. O controle negativo foi feito com o meio de cultivo, o controle positivo com amostra de ácido ascórbico na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o branco com álcool etílico sem a presença de DPPH. A atividade antioxidante foi medida de acordo com a equação 1.

Eq 1.

$$\text{Taxa de remoção (\%)} = \frac{(A_0 - A_1)}{A_0} \times 100$$

Onde: A_0 = absorbância da reação controle (contendo todos os reagentes exceto a amostra), A_1 = absorbância da amostra ou substância positiva).

4.6.2. Determinação da atividade de eliminação de radicais pelo método com ABTS⁺

O método utilizado foi baseado nos autores Li, Xue e Yu (2017). O preparo da solução de ABTS (2,2 azino bis (3-ethylbenzo thiazoline 6 sulfonic acid)) foi realizado com a adição de uma solução de ABTS (7 mmol) a uma solução de mesmo volume de persulfato de potássio (2,45 mmol), ambas as soluções foram feitas com água destilada. A mistura foi então incubada na ausência de luz a temperatura ambiente por 16 horas. Após esse período foi diluída em etanol até atingir absorbância de 0,700 em 734 nm. As reações foram feitas com amostras de extrato bruto de 0,5 mL misturadas a 4,5 mL de solução de ABTS⁺. O controle negativo foi feito com o meio de cultivo, o controle positivo com amostra de ácido ascórbico na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o branco com água destilada. Em seguida foram

incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. A atividade de eliminação de radicais foi calculada segundo a equação 1, descrita anteriormente no item 4.6.1.

4.6.3. Determinação da quantidade de antioxidantes presentes nos extratos brutos

A quantificação de antioxidantes foi expressa em unidades de ácido ascórbico ($\mu\text{g L}^{-1}$). Para isso uma curva de calibração foi realizada com diferentes concentrações de ácido ascórbico ($2\mu\text{g L}^{-1}$ a $20\mu\text{g L}^{-1}$) em reação com os radicais livres DPPH e ABTS⁺. As condições das reações foram as mesmas utilizadas nas reações com os extratos brutos.

4.6.4. Determinação de flavonoides totais

O teor de flavonoides foi estimado de acordo com o método descrito por Cui et al (2015), com algumas modificações. Cinco mL de cada extrato foi misturado a 0,3 mL de NaNO₃ em concentração de 5%. Após 5 minutos foi adicionado 0,3 mL de AlCl₃ em concentração de 10% e após o período de mais 5 minutos foi adicionado 2 mL de NaOH (1 mol L^{-1}). A solução final foi obtida com a adição de água destilada até o volume de 10 mL, seguida de vigorosa agitação. Após o período de 5 minutos foram realizadas as leituras de absorbância por espectrofotometria em luz visível em comprimento de onda 510 nm. O branco das amostras consistiu de todos os reagentes excetuando-se o extrato bruto e o controle positivo consistiu de uma solução de 50 μg do flavonoide rutina em água destilada (obtido comercialmente). A quantificação foi expressa em unidades do flavonoide quercetina ($\mu\text{g L}^{-1}$) obtido a partir de uma equação estimada em uma curva de calibração.

4.7. DETERMINAÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS

4.7.1 Método de estabilização da membrana dos glóbulos vermelhos humanos após indução de hemólise por solução hipotônica

O método de estabilização da membrana dos glóbulos vermelhos humanos (HRBC-Human Red Blood cell stabilization method) foi utilizado como forma de avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro*. O método foi usado para os extratos brutos dos fungos. Amostras de sangue foram coletadas de doadores humanos que não estavam fazendo uso de medicamentos ou esteroides por pelo menos duas semanas anteriores ao experimento (ANANTHI e CHITRA, 2013).

As coletas de sangue foram feitas por profissional habilitado com as punções realizadas preferencialmente na fossa antecubital (área anterior do braço em frente e abaixo

do cotovelo), todos os procedimentos foram feitos segundo as normas de coleta, segurança e higiene do manual de Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial para Coleta de Sangue Venoso, 2010.

Todo o material utilizado na coleta foi descartado cumprindo as normativas estabelecidas pela Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA Nº 306 de 07 de Dezembro de 2004. O procedimento descrito foi autorizado pelo Comitê de ética humana da UFSCar, devidamente cadastrado e autorizado pela Plataforma Brasil do Governo Federal, número da autorização CAAE: 65357917.0.0000.5504.

O sangue foi coletado em tubos de coleta a vácuo de 3,6 mL com solução de citrato de sódio tamponado 0,109 M. As amostras foram centrifugadas a 560 g por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante (plasma) descartado (FÉLIX SILVA et al, 2014). As células precipitadas foram lavadas em solução isosalina (0,85%) e centrifugadas novamente até o clareamento do sobrenadante. Após isso, uma solução de 10% v/v foi feita com a solução isosalina, que consistiu na solução HRBC. A reação teste foi feita com a adição de 2 mL de solução hiposalina (0,25%), 1 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,4), 1 mL do extrato a ser testado e 0,5 mL de solução de HRBC. O controle negativo foi feito com água destilada (para produção de 100% de hemólise) e o controle positivo com o medicamento diclofenaco 50 mg (EMS®), obtido comercialmente (para não hemólise). As soluções de reação foram incubadas a 37 °C por 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos (ANANTHI e CHITRA, 2013). A densidade da hemoglobina contida na solução foi mensurada por espectroscopia de luz visível a 560 nm. A porcentagem da atividade de estabilização (proteção) da membrana foi determinada segundo a equação 2. O branco das leituras foi feito com água destilada (ANANTHI e CHITRA, 2013; NAGAHARIKA et al., 2013).

$$\text{Eq 2: Porcentagem de proteção} = \frac{100 - \text{densidade ótica da amostra}}{\text{densidade ótica do controle negativo}} \times 100$$

4.7.2. Método da estabilização da membrana dos glóbulos vermelhos humanos após indução de hemólise por aquecimento.

O ensaio foi baseado em Shinde et al (2011). A coleta de sangue e o preparo da solução de eritrócitos (HRBC-Human Red Blood cell stabilization method) foram realizados de acordo com o item anterior (4.7.1). A reação teste consistiu em 2 mL de solução de extrato bruto em concentração de 1mg mL⁻¹ (preparada com adição de extrato bruto liofilizado em solução salina normal de 0,85%) misturada a 1mL de solução de eritrócitos (HRBC). A

reação foi submetida à leve agitação para homogeneização seguida de incubação em banho maria a 56 °C por 30 minutos. Após a incubação as reações foram resfriadas e centrifugadas a 560 g por 5 minutos a 25 °C. Os sobrenadantes foram recolhidos e a absorvância medida em espectrofotômetro em luz visível em comprimento de onda de 560 nm. O branco da reação foi realizado com água destilada, o controle positivo com o medicamento Ibuprofeno 400 mg e o controle negativo com solução salina 0,85%. A porcentagem de proteção da membrana foi calculada como apresentado na equação 2, também descrita no item 4.7.1.

4.8. LIOFILIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE EXTRATO BRUTO

Amostras de 200 mL de cada extrato bruto foram divididas em alíquotas de 50 mL submetidas a congelamento a -80 °C por 24 horas e, em seguida liofilizadas por 48 horas.

4.8.1. **Análise das amostras de extrato bruto por Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

A caracterização dos grupamentos químicos presentes nos extratos brutos foi realizada das bandas de adsorção dos espectros na região do infravermelho. As amostras de extratos brutos foram homogeneizadas em KBr (Brometo de Potássio). Em seguida as amostras foram comprimidas em um pastilhador até que ficassem translúcidas. As leituras foram realizadas na região de 400 a 4000 cm^{-1} , em transmissão com resolução de 4 cm^{-1} e 64 varreduras.

4.9. SELEÇÃO DE ISOLADOS COM MELHORES RESULTADOS NOS ENSAIOS COM EXTRATOS BRUTOS

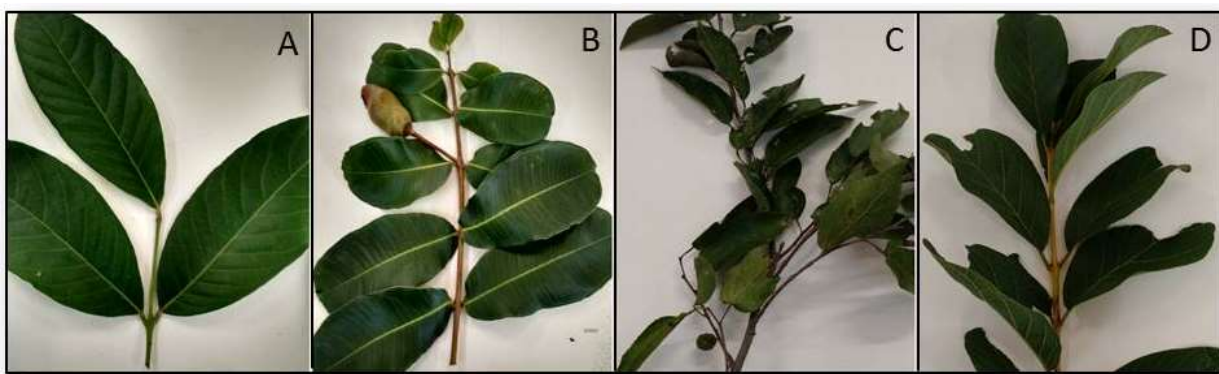
De acordo com os resultados obtidos quanto a produção de compostos bioativos, isolados fúngicos com resultados promissores foram selecionados para obtenção de mais informações sobre suas atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A coleta de todas as plantas foi realizada no mesmo dia, 13 de junho de 2016, durante o outono e identificadas gentilmente pelo MSc Ivonir Piotrowski Santos (Laboratório de Sementes e Mudanças-UFSCar-Sorocaba), figura 5.

Figura 5: Amostras das plantas coletadas (A) *Siparuna guianensis*, (B) *Lafoensia pacari*, (C) *Guazuma ulmifolia*, (D) *Campomanesia xanthocarpa*.



Fonte: Imagem do autor

5.1.1. Isolamento dos fungos

Após a incubação foi feito um monitoramento das placas a fim de verificar o crescimento dos fungos. Cada fungo selecionado para isolamento recebeu um número para identificação e, posteriormente, foi repicado para purificação (figura 6).

Figura 6: Exemplo de uma placa de cultivo em meio malte, a 28 °C por 30 dias, com fungos crescidos a partir de fragmentos de folhas da espécie *Guazuma ulmifolia*.



Fonte: Imagem do autor

A obtenção dos isolados (purificação) foi realizada por meio de sucessivos repiques em placas de ágar malte. Cada fungo selecionado para isolamento recebeu um número para identificação e posteriormente foi repicado para purificação.

Após o processamento, 32 fungos foram isolados. Estes foram selecionados de acordo com as características morfológicas macroscópicas. Os isolados foram nomeados por um código composto pela primeira letra inicial do nome da planta (ex: L para *Lafoensia pacari*), a letra F para indicar fungo seguida de um número e uma letra representando o tecido (F para Folha e C para Caule) (tabela 1).

A identificação dos fungos seguiu os critérios propostos por Cui et al (2015). Para a mesma espécie a semelhança da sequência foi estabelecida como $\geq 99\%$, mesmo gênero $> 95\%$ e mesma família $< 95\%$. Fungos identificados como da mesma espécie foram excluídos dos ensaios, assim de 32 isolados, 20 fungos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Fungos identificados a partir da comparação de suas sequências de DNA a sequências depositadas na plataforma NCBI.

Sigla	Espécie da planta	Identificação do Fungo	% de cobertura	Valor E	Identidade
SF2F		<i>Diaporthe infecunda</i>	100%	0.0	99%
SF5F		<i>Diaporthe</i> sp.	98%	0.0	98%
SF6F		<i>Colletotrichum cliviae</i>	100%	0.0	100%
SF8F	<i>Siparuna guianensis</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	100%	0.0	99%
SF10F		<i>Bjerkandera</i> sp.	99%	0.0	98%
SF4C		<i>Diaporthe inconspicua</i>	100%	0.0	99%
SF7C		<i>Fungal endophyte</i>	100%	0.0	99%
LF2F		<i>Phaeophlebiopsis peniophoroides</i>	99%	0.0	100%
LF1C	<i>Lafoensia Pacari</i>	<i>Diaporthe leucospermi</i>	100%	0.0	100%
LF3C		<i>Talaromyces funiculosus</i>	100%	0.0	99%
CF1F		<i>Curvularia oryzae</i>	99%	0.0	100%
CF6F	<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	<i>Bjerkandera atroalba</i>	100%	0.0	99%
CF7F		<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	99%
GF1F		<i>Cochliobolus sativus</i>	100%	0.0	99%
GF2F		<i>Xylariaceae</i> sp.	99%	0.0	99%
GF3F		<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	100%	0.0	99%
GF5F	<i>Guazuma</i>	Gnomoniaceae	95%	4e 10	83%
GF13F	<i>Ulmifolia</i>	<i>Diaporthe</i> sp.	100%	0.0	99%
GF16F		<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%
GF9C		Trichocomaceae	20%	4e 22	91%

Os isolados GF5F e GF9C apresentaram taxas de similaridade comparada as sequências disponibilizadas pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information) inferiores a 95% (tabela 1) sendo a identificação foi estabelecida em nível de família. O fungo GF5F foi identificado como ascomicota pertencendo à família Gnomoniaceae, ordem Diaporthales (SOGONOV et al., 2008). O fungo GF9C pertence à família Trichocomaceae que engloba os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Paecilomyce* (HOUBRAKEN e SAMSON,

2011). Já os isolados SF5F e SF10F tiveram suas sequências com similaridade de 98% sendo identificadas em nível de gênero, respectivamente como *Diaporthe* e *Bjerkandera*.

Dos fungos discutidos aqui, é importante informar que os isolados SF7C identificados apenas como um fungo endofítico e GF2F não apresentaram mais crescimento após a identificação e não foram utilizados para os testes de produção de bioativos.

Na figura 7 é possível observar as características morfológicas macroscópicas de cada isolado, excetuando-se SF7C e GF2F.

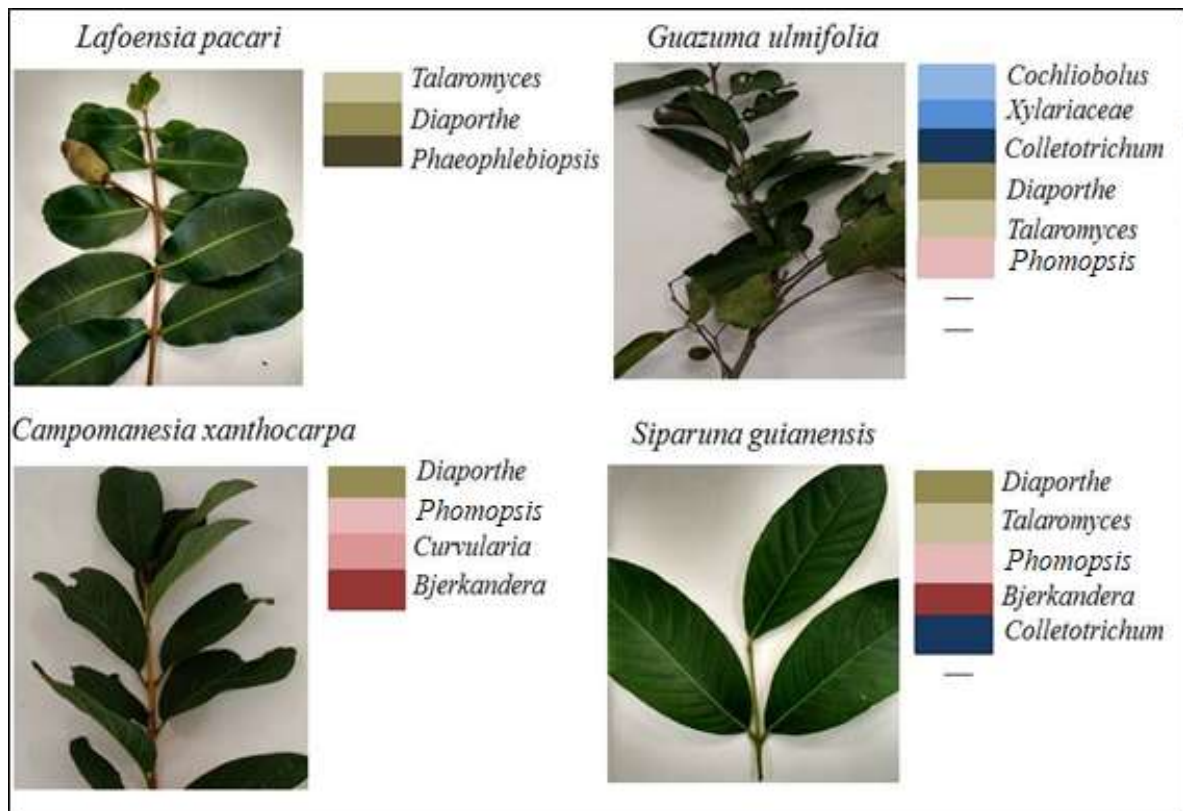
Figura 7: Fungos endofíticos isolados inoculados em meio ágar malte



Fonte: Imagem do autor.

A identificação genotípica levou a 8 gêneros: *Colletotrichum*, *Diaporthe* (*Phomopsis*), *Bjerkandera*, *Talaromyces*, *Cochliobolus*, *Phaeophlebiopsis*, *Curvularia* e *Xylariaceae* (terminologia utilizada também para indicar família). Na figura 8 é possível observar a distribuição dos gêneros de acordo com a planta hospedeira.

Figura 8: Distribuição dos gêneros encontrados nas plantas selecionadas



Fonte: Elaboração do autor

As condições específicas como temperatura, umidade, quantidade de nutrientes no solo em que se encontra a planta hospedeira, podem determinar as espécies de fungos colonizadores, incluindo também o tipo de metabólitos produzidos e ciclo de vida do fungo incluindo as fases de crescimento como germinação e esporulação (WU et al., 2013; JIA, 2016). A estrutura das populações dos fungos muda drasticamente de acordo com o ambiente, por exemplo, em regiões frias as populações diferem muito das de regiões mais quentes. No entanto, plantas que pertencem às mesmas regiões podem apresentar alto grau de similaridade de táxons e espécies (D'AMICO, FRISULLO e CIRULLI, 2008).

Apesar do objetivo desse trabalho não ser o de avaliar a diversidade ou mesmo a estrutura das populações ou comunidades dos fungos, o gênero *Diaporthe* foi encontrado nas plantas *S. guianensis*, *G. ulmifolia* e *C. xanthocarpa* e a espécie *Talaromyces funiculosus* não foi isolada apenas em *C. xanthocarpa* (figura 8). É importante ressaltar que a coleta das plantas foi feita na

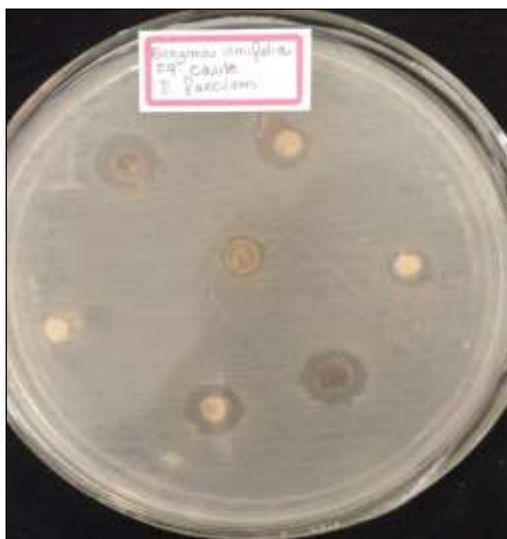
mesma região em fragmentos de mata próximos, o que pode ter influenciado na similaridade da distribuição das espécies dos gêneros encontrados neste trabalho, *Diaphorte* e *Phomopsis* (*Phomopsis* é também considerada a fase assexuada de fungos do gênero *Diaporthe*), *Colletotrichum*, *Bjerkandera*, *Cochliobolus*, *Xylariaceae*, *Talaromyces*, *Curvularia* e *Phaeophlebiopsis* já foram relatados na literatura como endofíticos, sendo estudados taxonomicamente e também para a produção de compostos (DAVIS et al., 2003; OSES et al., 2006; GOMES et al., 2013; GONZAGA et al., 2014; PALEM, KURIAKOSE e JAYABASKARAN, 2015, CAMPOS et al., 2017; JUSTO et al., 2017, MONDOL et al., 2017).

O isolado GF5F da família Gnomoniaceae é frequentemente encontrado em plantas incluindo espécies patogênicas (SOGONOV et al., 2008). Já o isolado GF9C pertencente a família Trichocomaceae apresenta uma diversidade de mais de 250 espécies. Fungos desta família são predominantemente saprófitas e costumeiramente estudados devido a produção de micotoxinas e no campo biotecnológico são utilizados para produção de biomoléculas como antibióticos (HOUBRAKEN e SAMSON, 2011).

5.2. PRESENÇA DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Fragmentos dos fungos com 5 mm² de diâmetro foram testados frente as cepas de bactérias, figura 9. Dentre as espécies fúngicas testadas, 9 apresentaram atividade antagônica (tabela 2).

Figura 9: Inibição da cepa bacteriana *E. faecium* pelo fungo GF9C, demonstrado através do halo formado em volta do fragmento do fungo.



Fonte: Imagem do autor.

Tabela 2: Teste de antagonismo com os fungos isolados frente a espécies bacterianas

Fungo	Espécie de fungo	Bactérias		Testadas	
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. aureus</i>
SF2F	<i>D. infecunda</i>		+		+
SF5F	<i>Diaporthe</i> sp.	+			+
SF6F	<i>C. cliviae</i>	+			+
LF1C	<i>D. leucospermi</i>		+		
LF3C	<i>T. funiculosus</i>		+	+	
CF1F	<i>C. oryzae</i>		+		
GF1F	<i>C. sativus</i>				+
GF3F	<i>C. gloeosporioides</i>		+		
GF9C	Trichocomaceae		+	+	+

(+) presença de halo de inibição

O gênero *Diaporthe* já foi relatado como produtor de atividade antimicrobiana. O isolado *Diaporthe* sp. F2934, oriundo de plantas tropicais no Panamá, demonstrou atividade antibacteriana contra 6 espécies bacterianas, incluindo *S. aureus* (SOUSA et al., 2016). Em um estudo realizado com uma planta medicinal chinesa, o fungo *Diaporthe* sp. LG23 também apresentou inibição sobre *E. coli* e *S. aureus*, sendo a estrutura do antibiótico elucidada como triterpenoide tetracíclico (LI et al., 2015).

O gênero *Colletotrichum* é relatado frequentemente como causador de doenças em plantas, principalmente a antracnose (WANG et al., 2016). Estudos relacionados a antagonismo contra outros microrganismos são escassos, mas os autores Zou et al. (2010) elucidaram um novo antimicrobiano denominado ácido coleleotrico, derivado da espécie *Colletotrichum gloeosporioides*, também identificada neste trabalho e que inibiu a cepa *K. pneumoniae*. Nossos resultados com os isolados *C. gloeosporioides* e *Colletotrichum clivae* inibindo duas cepas bacterianas estão de acordo com os resultados obtidos por Zou et al. (2010), de modo que foi possível indicar que o gênero, apesar da fitopatogenicidade, apresenta potencial para produção de antimicrobianos.

Guo e colaboradores (2016) descreveram o fungo da espécie *Talaromyces funiculosus*, isolado da planta *Salicornia bigelovii* em uma província na China, como produtor de um novo policetídeo, um metabólito secundário com propriedades antimicrobianas. O estudo ressalta a capacidade antagonista da espécie como encontrado neste trabalho.

Quanto à espécie *Curvularia oryzae*, esta também já foi descrita como produtora de antimicrobianos. Os autores Kharwar et al (2010) descreveram uma cepa isolada de *Eucalyptus citriodora* com ação antifúngica contra espécies fitopatogênicas e patógenas de humanos. Compostos obtidos pela cepa *Curvularia oryzae* MTCC 2605 foram purificados e identificados como 11- α -

methoxycurvularin e (S)-5-ethyl-8, 8-dimethylnonanal, sendo o primeiro composto citado antagonista de bactérias gram positivas como *Staphylococcus aureus* e gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*. Em outro estudo com estas cepas também foi demonstrado ação contra larvas e fungos (BUSI et al., 2009).

A espécie *Curvularia oryzae* assim como fungos do gênero *Colletotrichum*, é causadora de doenças em plantas (BUSI et al., 2009). No entanto ambos os tipos de microrganismos são capazes de produzir metabólitos com ação antagônica, podendo ser fontes de recursos de tratamento de doenças causadas por bactérias.

Estudos envolvendo a espécie *Cochliobolus sativus* são em sua maioria relacionados a doenças que esse fungo causa em diversas plantas, no intuito de combatê-lo, não sendo encontrados dados sobre a produção de antimicrobianos. Por fim a cepa GF9C pertence a família Trichocomaceae, a qual engloba o gênero *Penicillium*, sendo uma família conhecida como produtora de antibióticos, corroborando o resultado obtido neste estudo com os encontrados por Houbraeken e Samson (2011).

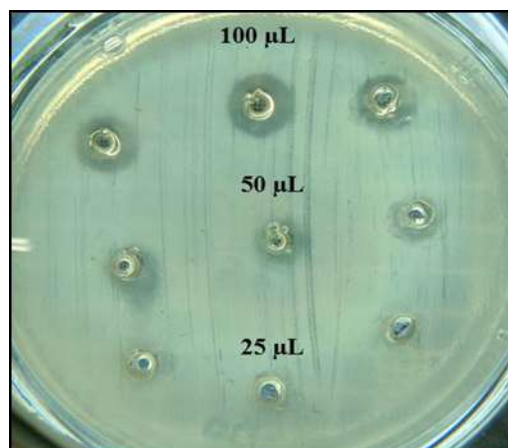
5.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO EM MEIO SUBMERSO

Após obtenção dos extratos brutos, estes foram testados quanto à presença de compostos bioativos.

5.4. OBTENÇÃO DE ATIBACTERIANOS NO EXTRATO BRUTO

Os testes realizados com extratos brutos oriundos do inóculo Czapek Dox e caldo batata dextrose não apresentaram atividade antagônica. No meio caldo malte apenas o extrato bruto com volumes de 50 μ L e 100 μ L do isolado GF9C apresentou atividade, sendo ainda que halos maiores foram obtidos com o volume de 100 μ L, porém inferiores a 1cm de diâmetro, figura 10.

Figura 10: Atividade antibacteriana pelo isolado GF9C contra a cepa *S. aureus*.



Fonte: Imagem do autor

Ao todo, 9 isolados apresentaram atividade antagônica pelo método de difusão de pedaços de ágar (item 5.2), no entanto somente o extrato bruto do isolado GF9C (família Trichocomaceae), quando cultivado em meio malte, apresentou atividade antibacteriana e somente em presença a bactéria *S. aureus*. Esses resultados podem indicar que os isolados testados, excetuando GF9C, produzem compostos antibacterianos na presença das bactérias, isto é, as bactérias podem atuar como um fator de indução à produção do composto antibacteriano.

Alguns estudos utilizando culturas mistas demonstraram que um microrganismo pode depender da interação com outro para produzir um composto bioativo. Oh et al. (2007) cultivaram o fungo marinho *Emericella* sp. em cultura simples para obtenção de dois tipos de antimicrobianos. No entanto quando cultivado junto a actinobactéria também marinha, *Salinispora arenicola* houve um aumento no rendimento dos compostos em até 100 vezes. Outro exemplo foi obtido com o fungo *Aspergillus funigatus* produtor do composto antimicrobiano gliotrinina A, porém a produção só ocorreu em co-cultivo com a bactéria *Sphingomonas* sp. (PARK et al., 2009). A regulação fisiológica dos microrganismos é complexa e envolve diversas vias bioquímicas e a produção de metabólitos secundários depende também de fatores ambientais. Em ambiente natural os microrganismos interagem entre eles o que gera competição, de modo que metabólitos antimicrobianos podem ser produzidos como uma estratégia desenvolvida pelos microrganismos para a sobrevivência (KNIGHT et al., 2003.; PARK et al., 2009).

A ausência da produção do composto antibacteriano pelo isolado GF9C nos meios Czapek Dox e caldo batata dextrose, evidencia a influencia do meio de cultivo. O carbono é considerado um fator importante nas vias metabólicas da produção de antibacterianos, de forma que a sacarose presente no meio Czapek Dox e a glicose presente no meio caldo batata podem ter contribuído para a ausência de produção. A glicose, por exemplo, proporciona boas taxas de crescimento, mas pode inibir a produção de compostos como o antibiótico cefalosporina. Contudo diferentes fontes de nitrogênio ou mesmo temperatura, também interferem (KNIGHT et al., 2003)

5.4.1 Seleção dos extratos brutos com melhores resultados na produção de antimicrobianos

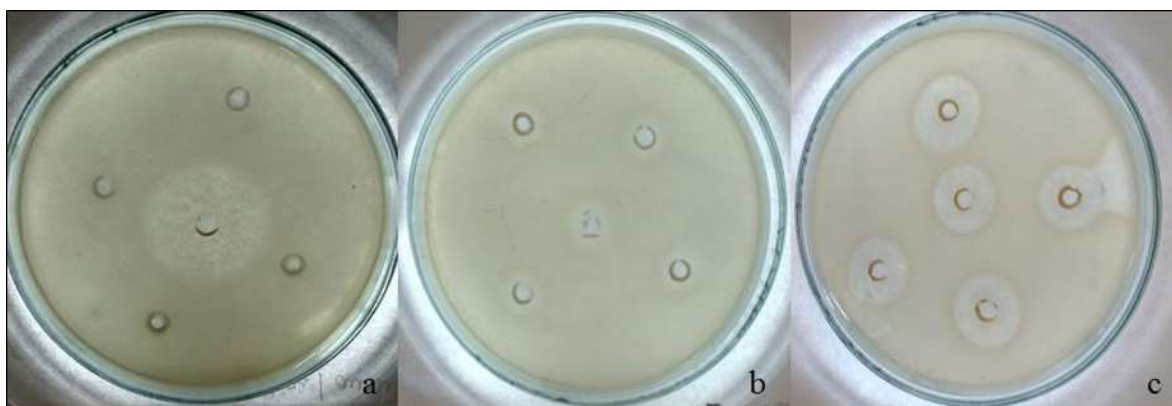
A fim de estudar com maior profundidade a atividade antimicrobiana dos extratos brutos, dois isolados foram selecionados para estudo com método utilizando ágar soft.

5.4.1.1. Atividade antibacteriana no extrato bruto em ágar soft

Os testes foram realizados somente com fermentações oriundas dos isolado GF9C e SF6F no meio caldo malte devido aos resultados obtidos anteriormente no ensaio de perfuração de ágar, onde somente nesse meio de cultivo compostos antimicrobianos foram observados. O método de

perfuração em ágar soft foi utilizado, pois a técnica permite a distribuição das bactérias por todo o gradiente do ágar, o que poderia aumentar a sensibilidade aos extratos brutos testados. Os extratos do isolado SF6F não apresentou atividade, enquanto que nos extratos brutos de GF9C houve atividade. Os halos podem ser observados na figura 11 e analisados na tabela 3.

Figura 11: Atividade antibacteriana pelo antibiótico ampicilina frente a *S. aureus* (a), halos de inibição com extrato de 5 dias em presença de *S. aureus* (b), halos de inibição com extrato de 15 dias em presença de *S.aureus* (c).



Fonte: Imagem do autor

Tabela 3: Resultados da atividade antibacteriana com extratos brutos em diferentes tempos de crescimento dos fungos

Tempo de incubação do extrato	Bactérias			
	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
5 dias	-	-	-	-
10 dias	-	7,5mm ± 0,707	9 mm ± 0,707	-
15 dias	-	11,4 mm ± 2,509	15,4 mm ± 2,302	-

Desvio padrão = ±

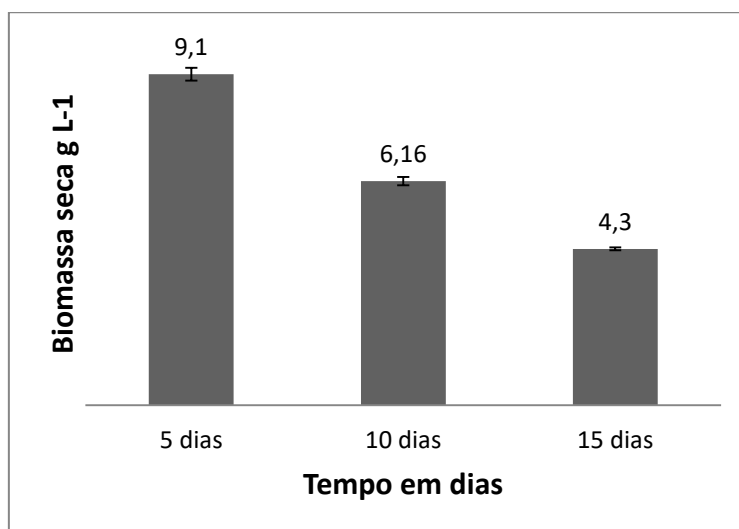
Em estudo realizado por Santos et al. (2015) com fungos endofíticos da planta hospedeira *Indigofera suffruticosa* Miller, 18 isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra as espécies de bactéria *S.aureus*, *Baciillus subtilis*, *E.coli*, *K. pneumoniae* e *P.eruginosa*. Assim como apresentado nesse trabalho os maiores halos de inibição foram obtidos contra *S. aureus*, com médias entre 12 mm com a espécie *Nigrospora sphaerica* e 36 mm com a linhagem de *N. sphaerica* (URM-6060). Nos resultados obtidos pelos autores apenas um isolado a *N. sphaerica* (URM-6060) apresentou inibição contra *P. aeruginosa*, corroborando a maior dificuldade em inibir a espécie.

A inibição contra a espécie *S. aureus* se mostra relevante, uma vez que houve um aumento no número de casos de resistência desenvolvida pela bactéria ao antibiótico metilicina e vancomicina (Menichetti, 2005). A espécie está entre os principais agentes causadores de infecção

hospitalar segundo um levantamento realizado nos Estados Unidos, assim também como espécies de *Enterobacter*. Dentre as enterobactérias, *E. faecalis*, apesar de ser naturalmente encontrada no trato gastrointestinal, é um patógeno oportunista e frequentemente causa infecções no trato urinário e endocardites e assim como *S. aureus* apresenta casos de resistência ao antibiótico vancomicina. A resistência bacteriana a medicamentos torna o tratamento mais difícil e também mais caro (PAULSEN ET AL., 2003; RICE, 2008).

O crescimento do isolado GF9C foi acompanhado e medido através da biomassa seca, figura 12.

Figura 12: Crescimento do fungo GF9C obtido por biomassa seca



Relacionando o crescimento dos fungos com a eficácia na produção dos compostos antibacterianos, crescimentos menores em 10 dias (6,16 g L⁻¹) e 15 dias (4,3 g L⁻¹) proporcionaram maior eficácia na inibição bacteriana. O resultado obtido corrobora com os estudos de engenharia metabólica de microrganismos que apontam que a produção de antimicrobianos ocorre em uma fase mais tardia do crescimento, quando os nutrientes estão limitados, ou seja, não em condições ótimas de crescimento (NIELSEN, 2017).

O metabolismo primário apesar de não originar os antimicrobianos está relacionado ao metabolismo secundário, de forma que a maioria dos antibacterianos são formados a partir de precursores dos metabólitos primários comuns, os mesmos que formam as estruturas celulares para o crescimento, além também de co-fatores como ATP (adenosina trifosfato) e o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida). Sendo assim ocorre uma competição no metabolismo por vias essenciais entre o crescimento e a produção de metabólitos secundários (ROKEM, LANTZ e NIELSEN, 2007; NIELSEN, 2017). Já do ponto de vista ecológico a produção baixa e também tardia de antimicrobianos pode ocorrer porque microrganismos selvagens, assim

como o isolado testado, evoluíram priorizando o crescimento (ROKEM, LANTZ e NIELSEN, 2007).

Por fim, em relação ao método utilizado, os halos obtidos contra a bactéria *S. aureus*, após 15 dias de crescimento, se mostrou superior ao obtido no método de perfuração de ágar proposto e descrito no item (4.5.1), método onde as bactérias teste foram inoculadas por espalhamento na superfície do ágar e os halos de inibição foram menores do que 10 mm. Os melhores resultados podem ser devido a maior homogeneização das bactérias no meio de cultivo ágar soft, uma vez que as bactérias se encontram distribuídas em todos os gradientes do ágar.

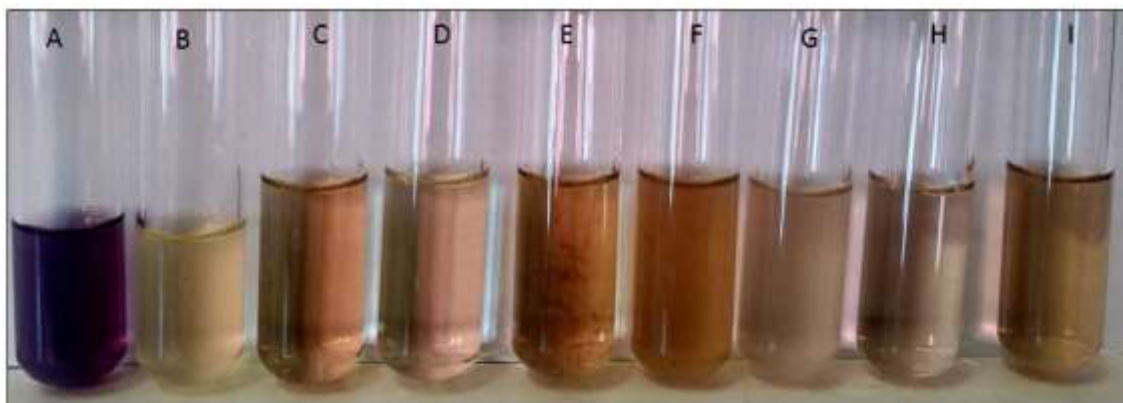
5.5. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ATRAVÉS DOS ENSAIOS COM DPPH E ABTS⁺

Os ensaios foram realizados somente nos extratos brutos obtidos no meio Czapek Dox. Não foi possível medir a atividade antioxidante dos extratos brutos produzidos nos meios caldo malte e caldo batata dextrose, pois os meios sem inóculo, usados como controle negativo apresentaram atividade antioxidante elevada com mudança de cor da solução de DPPH de púrpura para amarelo.

Como descrito em uma revisão sobre as propriedades do malte por Carvalho, Gonçalves e Guido (2016), o malte é uma mistura complexa de antioxidantes e é rico em flavonoides. Em relação a batata, também em uma revisão, Brown (2005) descreve que a presença de carotenoides em tubérculos principalmente em batatas apresenta ação antioxidante. Desta forma, os meios de cultivo, caldo batata dextrose e caldo malte podem interferir na leitura da atividade dos extratos brutos que contém os possíveis compostos antioxidantes produzidos pelos fungos, uma vez que resquícios do meio podem ainda estar presentes.

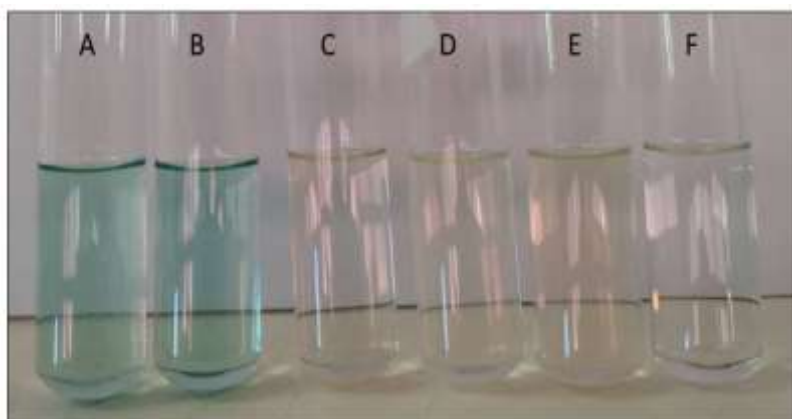
Os resultados obtidos no meio Czapek Dox são apresentados a seguir. Na figura 13 é possível verificar as mudanças na coloração do reagente DPPH da cor púrpura para amarelo de acordo com a potência do antioxidante presente no extrato bruto. Na figura 14 é possível observar a mudança na coloração do reagente (radical ABTS⁺) sendo a reação de controle negativo na cor púrpura e os demais tubos em tons de amarelo conforme o potencial do antioxidante testado.

Figura 13: Atividade antioxidante no ensaio com DPPH ; (A) controle negativo, (B) LF3C, (C) GF9C, (D) GF5F, (E) GF16F, (F) SF2F, (G) CF7F, (H) SF8F, (I) GF13F.



Fonte: Imagem do autor

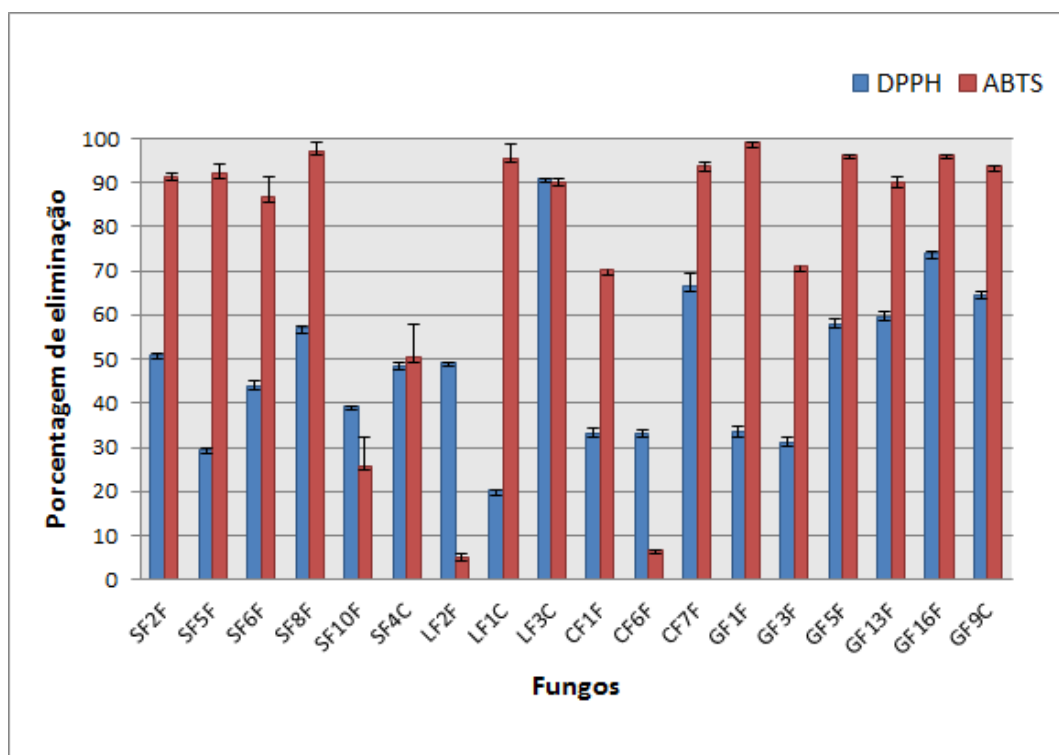
Figura 14: Atividade antioxidante no ensaio com $ABTS^+$ (A) controle negativo, (B) CF6F, (C) GF1F, (D) LF3C.



Fonte: Imagem do autor

Na figura 15 são apresentadas as atividades antioxidantes, de acordo com a capacidade de remoção dos radicais livres para ambos os reagentes.

Figura 15: Eliminação de radicais livres pelo método DPPH e ABTS⁺



De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que as porcentagens de atividade divergiram em relação aos métodos e também em relação aos isolados. Enquanto que para o método com DPPH os isolados com melhores resultados, isto é, com porcentagem de eliminação de radicais superiores a 50%, foram LF3C (*Talaromyces funiculosus*), CF7F (*Phomopsis* sp.), GF16F (*Colletotrichum boniense*) e GF9C (Trichomaceae). Para o método ABTS⁺, a maioria das cepas, 97,3% apresentou atividade antioxidante superior a 50%, excetuando-se os fungos CF6F (*Bjerkandera atroalba*), LF2F (*Phaeophlebiopsis peniophoroides*) e SF10F (*Bjerkandera*). Em relação ainda a divergência de resultados da atividade entre os métodos, as cepas SF10F, LF2F e CF6F foram as únicas com porcentagens de eliminação inferiores aos obtidos pelo método DPPH.

O reagente ABTS após reação com persulfato de potássio forma o radical catiônico ABTS⁺ que ao reagir com um antioxidante é estabilizado e sua coloração esverdeada sofre descoloração conforme a potência do antioxidante. O uso de ABTS⁺ foi descrito como eficaz para detectar atividade de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (RE et al., 1999). Da mesma forma, o reagente DPPH também reage com antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos. Sua estrutura possui um elétron desemparelhado e quando em contato com átomos de hidrogênio doados por um antioxidante, o DPPH é reduzido a hidrazina e sua coloração muda para amarelo (ALVES et al., 2010).

O mecanismo de ação de ambos os métodos é o mesmo e a eficiência do composto é medida através da transferência de elétrons entre o composto e o radical livre (reagente). No entanto, como já apresentado por outros autores, nem sempre ocorre linearidade entre os resultados

(SUGIHARTO, YUDIARTI e ISROLI, 2016). Quanto aos dados obtidos na literatura sobre os isolados com os melhores resultados, foram considerados os gêneros e famílias com atividade antioxidante superior a 50% para ambos os métodos (LF3C, CF7F, GF16F e GF9C).

Uma vez que o gênero *Phomopsis* é considerado a fase assexuada do gênero *Diaporthe*, como mencionado anteriormente, os resultados obtidos com o isolado CF7F (*Phomopsis sp*) também foram discutidos com trabalhos utilizando o nome *Diaporthe*.

O gênero *Diaporthe* já foi descrito em outros trabalhos. Dentre estes estudos, destaca-se o trabalho dos autores Nath, Raghunatha e Joshi (2012) que obtiveram atividades com porcentagem entre 18,90% a 26,06% para a espécie *Diaporthe sp.* cultivada em caldo batata dextrose. Os resultados obtidos foram inferiores ao obtido pelo isolado CF7F neste estudo. As diferenças encontradas podem refletir que apesar dos fungos pertencerem ao mesmo gênero, divergiram em relação a atividade, o que pode ser justificado devido aos diferentes meios de cultivo (meio Czapek-Dox utilizado nesse trabalho e caldo batata dextrose pelos autores). Já o isolado *Phomopsis sp.* GJJM07 em um trabalho de Jayanthia e colaboradores (2011) obteve atividade antioxidante com alta reatividade, sendo segundo estes autores, um isolado promissor.

O gênero *Colletotrichum* foi estudado por Tianpanich et al. (2011) que descrevam o fungo *Colletotrichum sp.* CRI535- 02, isolado de *Piper ornatum*, como produtor de compostos antioxidantes. Os autores também fizeram a identificação da estrutura da molécula bioativa. Em relação à espécie *Talaromyces funiculosus*, um estudo utilizando os métodos DPPH e ABTS⁺ relacionou a ação antioxidante com uma fração (fração 5) de um composto extraído do fungo (GUO et al., 2016).

Os dados obtidos para todas as espécies e os gêneros, foram corroborados por outros trabalhos, como anteriormente discutidos. De forma que os resultados ressaltam o potencial desses fungos em produzir compostos antioxidantes.

5.5.1. Quantificação do antioxidante presente no extrato bruto

Os extratos brutos dos isolados GF9C, CF7F e LF3C foram selecionados para que suas atividades antioxidantes fossem mensuradas em unidades do antioxidante conhecido ácido ascórbico.

A atividade antioxidante presente nos extratos brutos foi determinada por construção de curvas de calibração utilizando diferentes concentrações de ácido ascórbico (2 µg mL⁻¹ a 20 µg mL⁻¹ em meio Czapek Dox) em reações com os radicais DDPH e ABTS.

Os valores obtidos nas leituras de absorvância dos extratos brutos de GF9C, CF7F e LF3C foram substituídos nas equações com as leituras de absorvância do ácido ascórbico, os resultados são apresentadas na tabela 4.

Tabela 4: Quantidade equivalente de ácido ascórbico nos extratos brutos

<i>Fungo</i>	<i>Atividade antioxidante (%) em DPPH</i>	<i>Equivalente em ác ascórbico ($\mu\text{g L}^{-1}$) DPPH</i>	<i>Atividade antioxidante (%) em ABTS</i>	<i>Equivalente em ác ascórbico ($\mu\text{g L}^{-1}$) em ABTS</i>
GF9C	50,52 ± 0,83	12,07 ± 0,42	93,58 ± 0,20	22,06 ± 0,18
CF7F	52,71 ± 0,47	18,62 ± 0,18	93,65 ± 1,09	22,08 ± 0,30
LF3C	87,33 ± 0,09	30,97 ± 0,04	90,23 ± 0,65	21,12 ± 0,06

Desvio padrão = ±

Através dos resultados foi possível detectar que uma quantidade menor de equivalente em ácido ascórbico na reação com ABTS⁺ resulta em porcentagens de atividade antioxidantes maiores quando comparadas com as reações obtidas com DPPH. Como mencionado anteriormente, ambos os reagentes possuem o mesmo mecanismo de ação através da transferência de elétrons. Não havendo drásticas nos mecanismos de ação os resultados com ácido ascórbico evidenciam que o radical ABTS⁺ foi mais sensível a presença de antioxidantes nos compostos.

5.6. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE FLAVONOIDES TOTAIS

Os isolados GF9C, CF7F e LF3C foram selecionados para determinação da presença de flavonoides, devido aos resultados promissores obtidos na produção de antioxidantes.

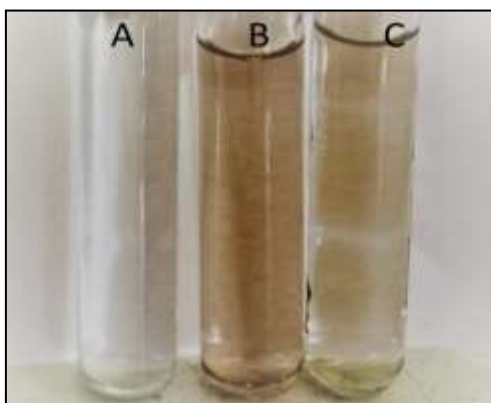
A determinação da presença de flavonoides foi realizada por teste colorimétrico. A mudança na coloração ocorre devido a deslocamentos batocrômicos, isto é, quando ocorre deslocamento de absorção para um comprimento de onda maior. Tais deslocamentos podem ocorrer devido a capacidade de complexação de metais por grupamentos presentes nos flavonoides (CORNARD e MERLIN, 2001).

O resultado é considerado positivo quando apresenta tons de amarelo. Na presença do cloreto de alumínio ocorre a complexação de íons de Al⁺³ com grupamentos hidroxila das posições 3 e 5 da estrutura do flavonoide, de forma que quanto maior for a presença de flavonoides mais a solução tenderá a cor amarelada. Porém é importante ressaltar que existem flavonoides que não

possuem grupamentos que reagem à presença de metais, logo não ocorre a mudança de seus espectros (DENG e BERKEL, 1998).

Na figura 16 é possível observar a tonalidades de amarelo nas amostras, indicando então a presença de flavonoides e, portanto, estes apresentam capacidade de se complexar com metais.

Figura 16: Detecção da presença de flavonoides em solução com cloreto de alumínio. Sendo (A) controle negativo, (B) extrato bruto de LF3C e (C) controle positivo na presença do flavonoide Rutina ($45 \mu\text{g mL}^{-1}$).



Fonte: Imagem do autor

Para determinar a quantidade de flavonoides nas amostras, uma curva de calibração foi realizada com o flavonoide quercetina. A equação da reta foi obtida e a quantidade de flavonoides determinada e expressa em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do flavonoide quercetina. .

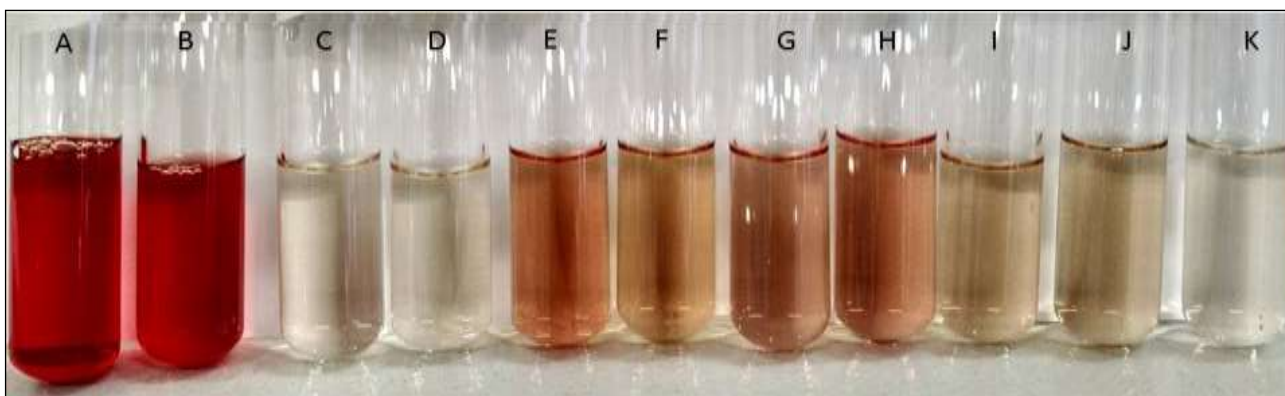
Os valores de absorvância obtidos das amostras foram substituídos na equação da reta e os extratos brutos apresentaram os seguintes resultados: isolado GF9C = $21,7 \pm 1,76 \mu\text{g mL}^{-1}$, CF7F = $7,75 \pm 0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e LF3C = $72,68 \pm 3,09 \mu\text{g mL}^{-1}$ equivalentes do flavonoide quercetina. A concentração de flavonoides foi significativamente menor no extrato bruto oriundo do isolado CF7F (*Phomopsis* sp.). No entanto, Bharathidasan e Panneerselvam (2012) na espécie *Phomopsis* sp. endofítica de plantas de mangue na Índia, detectaram a presença de flavonoides em extratos etílicos da espécie cultivada em meio líquido batata dextrose, a concentração de $6,44 \text{ mg g}^{-1}$, de forma que a espécie possui capacidade de produzir flavonoides. Em relação ao isolado *Talaromyces funiculosus* não foram encontrados dados sobre a produção de flavonoides.

A presença de flavonoides já foi relatada em extratos obtidos de crescimentos de fungos endofíticos. Li e colaboradores (2015), por exemplo, estudaram os fungos endofíticos *Alternaria alternata*, *Fusarium proliferatum*, *Schizophyllum commune* e *Trametes hirsuta* isolados da erva medicinal *Salvia miltiorrhiza* Bge, e estes também apresentaram concentrações de flavonoides em extratos brutos etanólicos.

5.7. ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

A figura 17 mostra os resultados obtidos no teste de atividade anti-inflamatória. Na imagem a presença de hemoglobina no sobrenadante demonstra resultado negativo com aspecto vermelho, devido ao pigmento. Enquanto que o sobrenadante translúcido significa resultado positivo, sem a liberação da hemoglobina.

Figura 17: Teste colorimétrico de ação anti-inflamatória pelo método HRBC (Human Red Blood cell stabilization method), realizados com fungos inoculados em meio Czapek Dox, (A) controle (-) triton 0,1 %, (B) controle (-) água destilada, (C) controle (+) diclofenaco 1 mg mL⁻¹, (D) GF13F, (E) SF2F, (F) SF1F, (G) SF8F, (H) CF7F, (I) GF9C, (J) LF3C, (K) GF5F.



Fonte: Imagem do autor

Apesar dos resultados estarem apresentados, não foram considerados. Ao se utilizar os meios de cultivo caldo malte, caldo batata dextrose e caldo Czapek Dox como controles negativos para esse experimento foi verificada a presença de atividade anti-inflamatória. Após o procedimento de centrifugação era esperado que os sobrenadantes tivessem a coloração avermelhada devido ao rompimento das membranas dos eritrócitos, o que não ocorreu.

A fim de eliminar possíveis interferentes nesse experimento alguns testes foram realizados: soluções tampão com pH 7,4 podem ser utilizadas como controle positivo para o método HRBC, uma vez que impedem o rompimento dos eritrócitos. Assim o pH de cada um dos meios foi medido e ajustado para os valores de 7,4 como o tampão e os valores extremos de 4,5 e 9,0. Porém a atividade anti-inflamatória persistiu, de forma que o pH não foi o fator determinante para esse resultado, não sendo possível, através desses testes, determinar o que possibilitou a estabilização das membranas de eritrócitos pelos meios de cultivo.

5.7.1. Determinação da estabilidade de membrana por indução de hemólise através de aquecimento.

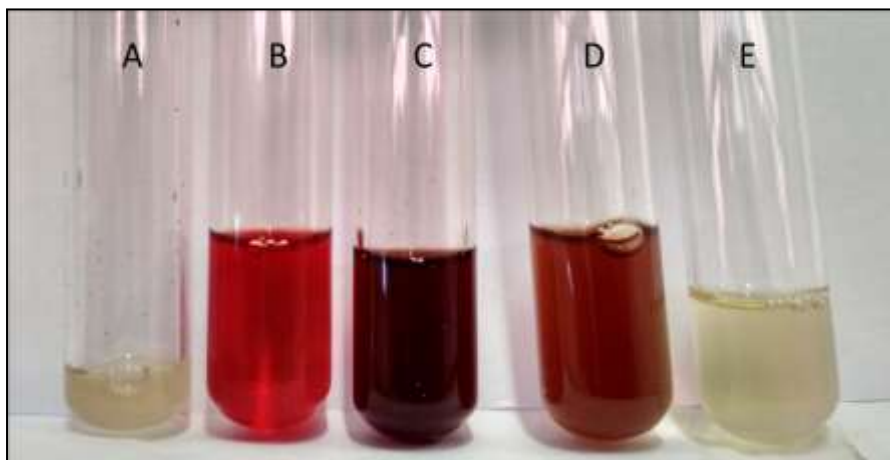
Os isolados Os isolados GF9C, CF7F e LF3C foram selecionados para determinação da atividade anti-inflamatória, devido aos resultados promissores obtidos na produção de antioxidantes e pela constatação da presença de flavonoides. O método descrito no item 4.7.2 foi utilizado, devido às interferências constatadas no método com a indução de hemólise por solução hipotônica, discuto no texto logo acima.

A atividade anti-inflamatória foi avaliada com a utilização do extrato bruto liofilizado (1mg L^{-1}) preparado em solução salina normal (0,9 % de NaCl), de forma que nesse método não houve a utilização do extrato bruto líquido e nem solução de tampão fosfato, o que foi realizado com o intuito de diminuir interferências que podem ter ocorrido no método anteriormente discutido.

O método de estabilização de HRBC foi selecionado devido a facilidade de avaliar possíveis compostos anti-inflamatórios *in vitro*, uma vez que a membrana dos eritrócitos se comporta de forma análoga a membrana lisossomal (PARVIN et al., 2011). Os lisossomos são os responsáveis pela liberação de enzimas proteolíticas e constituintes lisossômicos de neutrófilos que provocam processos inflamatórios e danos nos tecidos após a liberação no meio extracelular. Quando a membrana dos lisossomos é estabilizada por anti-inflamatórios, a liberação dessas enzimas se torna reduzida (GUYTON e HALL, 2006; SALEEM et al., 2011). Os medicamentos anti-inflamatórios sem esteroides são os que atuam dessa forma, inibindo enzimas hidrolíticas e também estabilizando as membranas lisossômicas (DE, 2017).

De forma que os extratos utilizados que estabilizaram a membrana dos eritrócitos, evitaram o rompimento e liberação da hemoglobina e foram detectados e calculados por espectrometria e os resultados podem ser observados na figura 18 e tabela 5.

Figura 18: Teste colorimétrico da reação com aquecimento entre a solução de HRBC e soluções de extrato bruto. Sendo (A) controle positivo com ibuprofeno 400µg, (B) controle negativo com solução salina, (C) extrato bruto de CF7F, (D) extrato bruto de GF9C, (E) extrato bruto de LF3C.



Fonte: Imagem do autor

O extrato bruto de LF3C apresentou a maior porcentagem de proteção, seguido por GF9C, já o extrato de CF7F se mostrou ineficiente (Tabela 5).

Tabela 5: Porcentagens de proteção das membranas dos eritrócitos pelo método HRBC

<i>Fungo</i>	<i>Identificação do isolado</i>	<i>Atividade anti-inflamatória (%)</i>
GF9C	<i>Trichocomaceae</i>	49,32 ± 2,04
CF7F	<i>Phomopsis sp</i>	0,97 ± 1,68
LF3C	<i>Talaromyces funiculosus</i>	94,82 ± 1,43

Desvio padrão = ±

A utilização de solução de HRBC para avaliar a presença de compostos anti-inflamatórios é amplamente encontrada em pesquisas com extratos de plantas medicinais, no entanto ainda não havia sido aplicada a extratos de compostos de origem fúngica, por esse motivo não foram encontrados dados com extratos fungicos. Com relação as plantas destacam-se os estudos de Kumar et al. (2012) utilizando extratos de folhas com concentração de 400 mg da planta *Skimmia anquetilia* originaria da Índia, obtiveram médias entre 40,18 ± 0,61% a 68,40 ± 1,57% e Parvin et al. (2015) em estudo com extratos de folhas e casca da planta medicinal *Crescentia cujete* da família Bignoniacea obtiveram porcentagens de inibição de hemólise entre 43,55 ± 6,20 % a 61,85 ± 5,56 %. Desta forma o resultado do isolado LF3C pode ser considerado promissor. Em ambos os trabalhos, os autores relacionaram a atividade com a presença de flavonoides.

Atividades anti-inflamatórias testadas em extratos vegetais têm sido relacionadas a presença de flavonoides, muitas pesquisas se voltaram ao estudo dessas moléculas devido a presença em

diversos alimentos e plantas, na expectativa de tratar doenças crônicas. Os estudos indicam que certos flavonoides, como a quercetina possuem atividade inibitória contra diversas enzimas envolvidas nos processos inflamatórios como a proteína quinase C, proteína tirosina quinase e fosfolipase A2 (MIDDLELTON, 1998; SERAFINI, PELUSO e RAGUZZINI, 2010). Assim, como demonstrado neste estudo, os extratos brutos testados possuem flavonoides, assim a atividade anti-inflamatória pode estar ligada a presença destes.

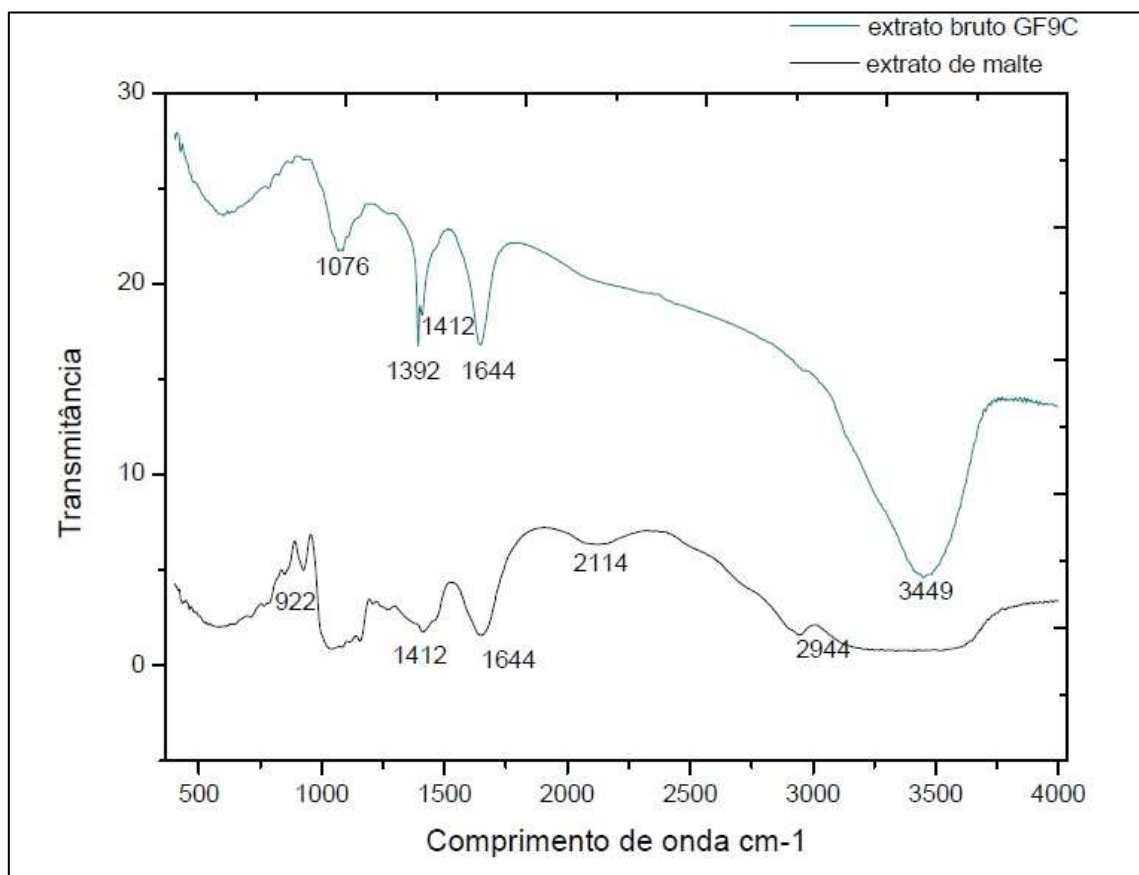
5.8. ANÁLISE PARCIAL DAS ESTRUTURAS DOS EXTRATOS BRUTOS LIOFILIZADOS ATRAVÉS DE FTIR.

Os extratos brutos liofilizados dos isolados LF3C, GF9C e CF7F foram selecionados para avaliação de suas estruturas através de leituras de FTIR.

5.8.1. Análise do espectro obtido por FTIR para caracterização do antimicrobiano

Na figura 19 é apresentado o espectro do extrato bruto do isolado GF9C produzido em meio malte com atividade antimicrobiana.

Figura 19: Espectro do antimicrobiano produzido pelo isolado GF9C



Os antimicrobianos oriundos de fungos endofíticos são classificados em diversos compostos como, terpenoides, alcalóides, fenilpropanóides, compostos alifáticos, policetídeos e peptídeos (MOUSA e RAIZADA, 2013). Segundo ainda Mousa e Raizada (2013), de acordo com a revisão feita pelos autores os policetídeos e terpenoides são os metabólitos secundários mais comuns.

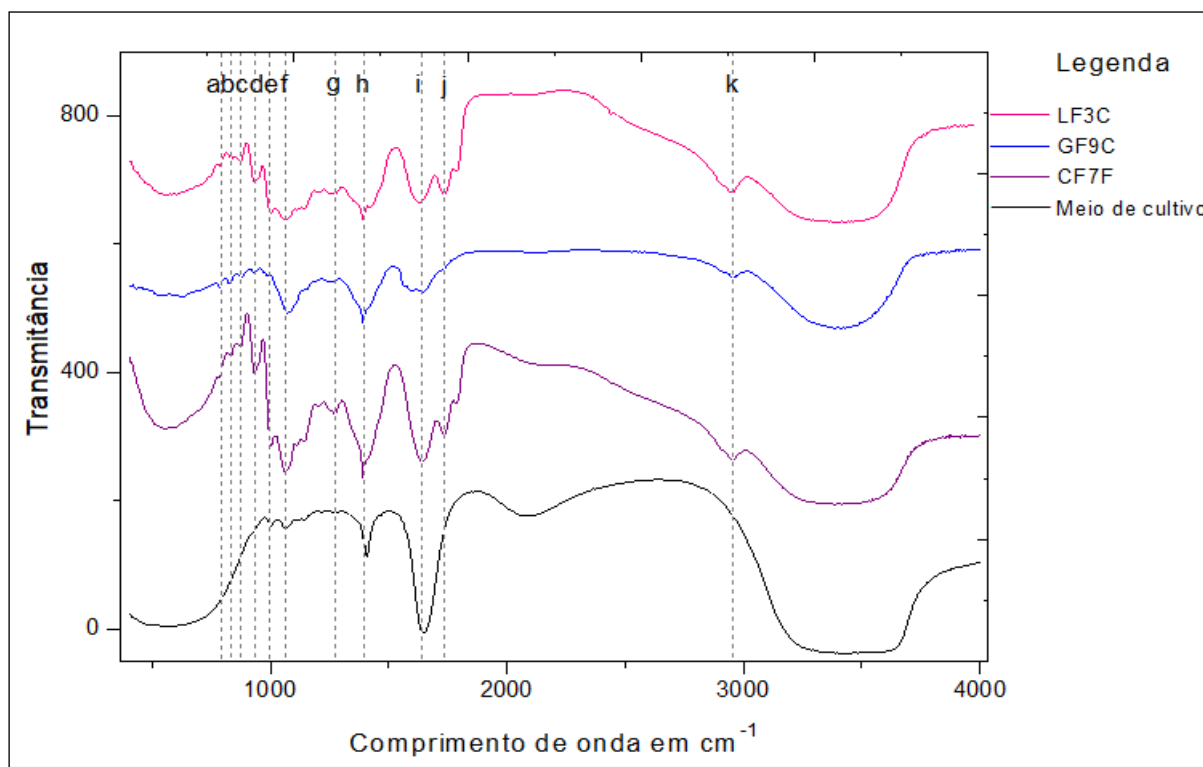
Um espectro do meio de cultivo caldo malte foi comparado ao do extrato bruto, os picos de 1412 que pode representar CH_2 e 1644 que pode estar relacionado agrupamentos de amida, são comuns a ambos os espectros e não foram considerados nas análises dos extratos brutos, uma vez que podem ser apenas resquícios do meio de cultivo

Em relação aos picos que aparecem somente no extrato bruto, o pico 1076 é associado a presença de C-O de éteres e o pico 1392, quando em duplete, é relacionado ao grupamento CH_3 . Já no pico 3449 pode indicar OH associada a uma formação polimérica (LOESGEN et al., 2011). O pico 1644, relacionado a amida, presente também no extrato de malte é provável que seja um resquício do meio de cultivo. De forma que o antimicrobiano provavelmente não seja um peptídeo, por não apresentar grupamentos amida ou amina, no entanto não foi possível identificá-lo porque o espectro gerado indicou apenas uma elucidação parcial dos grupamentos presentes.

5.8.2. Análise dos espectros obtidos por FTIR para caracterização de antioxidantes.

As análises em FTIR foram realizadas para caracterizar de forma parcial os possíveis grupos funcionais nos extratos brutos. Na figura 20, os espectros foram comparados a trabalhos com estudos de antioxidantes e flavonoides. As técnicas de espectroscopia de vibração, tal qual é a técnica de FTIR, são utilizadas para demonstrar grupos hidroxila e carbonila, presentes em flavonoides. Baseada nessas informações a análise dos espectros foi realizada (PINHEIRO e JUSTINO, 2012).

Figura 20: Espectros de infravermelho do meio de cultivo Czapek Dox e extratos brutos dos isolados LF3C, GF9C e CF7F.



De acordo com os espectros obtidos é possível notar que os extratos brutos dos isolados LF3C, GF9C e CF7F possuem as mesmas características. Um espectro do meio de cultivo Czapek Dox foi comparado aos dos extratos brutos, os picos (d), (e) e (h) são comuns a todos os espectros e não foram considerados nas análises dos extratos brutos, uma vez que podem ser apenas resquícios do meio de cultivo. Na tabela 6 os grupamentos funcionais encontrados estão apresentados.

Tabela 6: Grupamentos funcionais encontrados nos extratos brutos dos isolados por análise de FTIR

<i>Tipo de ligação</i>	<i>Letra correspondente ao pico</i>	<i>Referências bibliográficas</i>
C-H	(a) 834, (b) 873, (c) 932	Agatonovic-Kustrin, Morton e Yusof (2013)
-C-OH	(f) 1271	Heneczkowski et al. (2001)
C=O	(g) 1390	Heneczkowski et al. (2001)
C-H	(i) 1735	Kumar, Manoj e Giridhar (2015)
OH	(j) 2947	Heneczkowski et al. (2001)
		Agatonovic-Kustrin, Morton e Yusof (2013)

De acordo com Agatonovic-Kustrin, Morton e Yusof (2013) os picos (a), (b) e (c) possivelmente representam deformações fora do plano ocasionadas pela presença de C-H de grupos aromáticos. Os picos que indicam a presença de -C-OH e C=O, ficaram próximos aos valores encontrados para espectros de FTIR do flavonoide ácido quercetina-5'-sulfonado. O pico (i) também remete a presença de CH em grupos aromáticos. Por fim a presença de um grupamento OH na região de 2947 (j) não é relevante para interpretação, pois geralmente indica a presença de água (HENECKZKOWSKI et. al., 2001., AGATONOVIC-KUSTRIN, MORTON e YUSOF, 2013).

Existem diversos tipos de flavonoides, todos possuem a característica básica que é o compartilhamento da estrutura C6-C3-C6 fenil-benzopirano, constituída de anéis aromáticos. Não foi possível elucidar os espectros até essa estrutura, entretanto os grupamentos encontrados já foram descritos em flavonoides, por exemplo, os grupos a,b,c e i corroboram com a presença de anéis aromáticos e que podem estar ligados à estrutura fenil-benzopirano.

5.9. COMPOSTOS BIOATIVOS PRODUZIDOS PELOS ISOLADOS SELECIONADOS E AS RELAÇÕES ENTRE SUAS ATIVIDADES.

Um resumo das atividades bioativas dos extratos brutos dos isolados selecionados obtidos no meio Czapek Dox é apresentado na tabela 7.

Tabela 7: Resumo dos resultados obtidos com os extratos brutos produzidos em meio Czapek Dox oriundos dos isolados LF3C, GF9C e CF7F

Isolado	Espécie	Atividade antioxidante DPPH (%)	Atividade antioxidante ABTS (%)	Equivalente em ác. Ascórbico (DPPH) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equivalente em ác. ascórbico (ABTS) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Presença de flavonoides ($\mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetina)	Atividade anti-inflamatória (%)	Grupamentos funcionais em FTIR
LF3C	<i>Talaromyces funiculosus</i>	87,33 \pm 0,09	90,23 \pm 0,65	30,97 \pm 0,04	21,12 \pm 0,06	72,68 \pm 3,09	94,82 \pm 1,43	C- H, COH, C=O, CH,OH
GF9C	Família Trichocomaceae	50,52 \pm 0,83	93,58 \pm 0,20	12,07 \pm 0,42	22,06 \pm 0,18	21,7 \pm 1,76	49,32 \pm 2,04	C-H, COH, C=O, CH,OH
CF7F	<i>Phomopsis sp</i>	52,71 \pm 0,47	93,65 \pm 1,09	18,62 \pm 0,18	22,06 \pm 0,18	7,75 \pm 0,50	0,97 \pm 1,68	C-H, COH, C=O, CH,OH

Desvio padrão = \pm

As análises por FTIR dos extratos brutos produzidos pelos isolados LF3C, GF9C e CF7F em meio Czapek Dox, demonstraram que apesar dos fungos pertencerem a espécies diferentes, o composto produzido foi o mesmo e com características de grupamentos aromáticos. Em se tratando do mesmo composto, pode-se inferir que as diferenças nas atividades antioxidantes e anti-inflamatórias estejam relacionadas a quantidade do composto liberado pelos fungos durante o crescimento no cultivo submerso, de onde os extratos brutos foram retirados.

Em relação a atividade antioxidante, frequentemente em estudos com fungos endofíticos é relacionada a presença de flavonoides. Cui et al. (2015) realizaram a bioprospecção de fungos endofíticos em plantas medicinais chinesas, o que levou a identificação de 57 gêneros. Destes, foram isolados 5 gêneros com capacidade antioxidante superiores a 50% e a presença de flavonoides foi relacionada com a atividade antioxidante. O mesmo foi observado nos extratos brutos de LF3C e GF9C, comparando a atividade antioxidante de ambos na reação com DPPH. Para LF3C a atividade antioxidante foi maior do que com GF9C, o mesmo ocorreu quanto a presença de flavonoides. A relação estabelecida foi de que maiores porcentagens de atividade antioxidante também apresentaram maiores quantidades de flavonoides equivalentes em quercetina.

Em relação a atividade anti-inflamatória, como mencionado anteriormente nesse trabalho, muitos flavonoides apresentam tal propriedade. Assim como discutido sobre a atividade antioxidante dos isolados LF3C e GF9C, a atividade anti-inflamatória se mostrou superior quando a presença de flavonoides foi maior.

Se tratando do mesmo composto, pode se dizer que quanto maior a presença de flavonoides nos extratos, maior a atividade antioxidante e maior é a atividade anti-inflamatória. Contudo, o isolado CF7F não corroborou com tais resultados, no entanto pode ser que devido ao tempo de armazenamento do extrato bruto. A amostra pode ter deteriorado e os testes de atividade anti-inflamatória e presença de flavonoides foram prejudicados, uma vez que, por questões de processamento foram realizados após os testes de atividade antioxidante, seriam necessários então, novos testes.

6. CONCLUSÕES

O isolamento de 20 diferentes fungos corroboram plantas medicinais como uma fonte de microrganismos endofíticos. Dentre os gêneros encontrados *Diaporthe* e *Talaromyces*, estavam presentes em 3 das espécies vegetais utilizadas, de forma que as condições ambientais como temperatura, umidade e proximidade das plantas podem ter contribuído para a similaridade da distribuição dessas espécies.

Os resultados obtidos com os extratos brutos mostram que os fungos produzem compostos com bioatividade. A atividade antimicrobiana foi obtida pelo isolado GF9C (família Trichocomaceae) que foi capaz de inibir o crescimento de cepas bacterianas com potencial patogênico relevante. O composto antimicrobiano foi produzido em uma fase tardia de crescimento, sugerindo que o isolado se torna mais eficiente na produção do antimicrobiano à medida que as condições do meio de cultivo se tornam menos favoráveis ao crescimento.

O potencial antioxidante foi promissor para os gêneros *Diaporthe* (*Phomopsis*), *Colletotrichum*, *Talaromyces* e a família Trichocomaceae, com atividades antioxidantes superiores a 50 % para ambos os métodos testados, DPPH e ABTS⁺.

Os isolados LF3C (*Talaromyces funiculosus*) e GF9C (Família Trichocomaceae) apresentaram atividade anti-inflamatória possivelmente ligada a presença de flavonoides no composto. A análise do composto produzido por ambos os fungos mostra a forte presença de grupos aromáticos, reforçando a presença de um flavonoide.

Por fim a realização de testes utilizando extrato bruto requer atenção em relação à interferências nos resultados que os meios de cultivo podem ocasionar o que foi discutido nesse trabalho para os métodos de detecção de atividade antioxidante e anti-inflamatória.

7. REFERÊNCIAS

AGATONOVIC-KUSTRIN, S., MORTON, D.W., YUSOF, S.P. The Use of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy and Artificial Neural Networks (ANNs) to Assess Wine Quality. **Modern Chemistry & Applications**. v.1, n.4, p.1-8, 2013.

ALARCON-AGUILARA, F.J., ROMAN-RAMOS, R., PEREZ-GUTIERREZ, S., AGUILAR CONTRERAS, A., CONTRERAS-WEBER, C.C., FLORES-SAENZ, J.L. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 61, p. 101–110, 1998.

ALVES, C.Q., DAVID, J.M., DAVID, J.P., BAHIA, M.V.,AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**. v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

ALVIN, A., MILLER, K.I., NEILAN, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiological Research**. v. 169, p. 483–495, 2014.

ANANTHI, T., CHITRA, M. Screening of invitro anti-inflammatory activity of *Michelia champaca* linn. Flowers. **Asian journal oh Pharmaceutical and Clinical Research**. v.6, n.5, p. 71-72, 2013.

ARAUZ, L.J. Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ATCC 11454 em biorreator. 2011. 156f. Dissertação de doutorado. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

ARORA, D.S., CHANDRA, P. Antioxidant Activity of *Aspergillus fumigatus*. **ISRN Pharmacology**. v. 2011, p.1-11, 2011.

BALLVÉ, A. C., SIQUEIRA, N. C. S., MENTZ, L. A., SILVA, G. A. B; JOSÉ, K. F. D. Plantas medicinais de uso popular. **Atlas Farmacognóstico**. Canoas: Editora da ULBRA, 1995. p.205.

BALOUIRI, M., SADIKI, M., IBNSOUDA, S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v.6, n.2, p.71-79, 2015.

BÉRDY, J .Bioactive Microbial Metabolites A Personal View. **The Journal of Antibiotics**. v.58, p. 1-26, 2005.

BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading . **The Journal of Antibiotics**. v. 65, p. 385–395, 2012.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 84, p.11–18, 2009.

BHARATHIDASAN, R., PANNEERSELVAM, A. Antioxidant activity of the endophytic fungi isolated from mangrove environment of Karankadu, ramanathapuram district. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. v.3, n.8, p. 2866-2869, 2012.

BOURDY, G. et al. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**.v.70, p.87-109, 2000.

BOURDY, G., DEWALT, S. J., CHÁVEZ DE MICHEL, L.R., ROCA, A., DEHARO, E., MUÑOZ, V., BALDERRAMA, L., QUENEVO, C., GIMENEZ, A. Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p.87-109, 2000.

BRADER, G., COMPANT, S.; MITTER, B., TROGNITZ, F., SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**. v.100, p. 30-37, 2014.

BRAND-WILIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BREWER, M.S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 10, p. 221- 247, 2011.

BROWN, C.R. Antioxidants in potato. **American Journal of Potato Research**. v.82, n.2, p.163-172, 2005.

BUNGIHAN, M.E., TAN, M.A., KITAJIMA, M., KOGURE, N., FRANZBLAU, S.G., CRUZ, T.E.E., TAKAYAMA, H., NONATO, M.G. Bioactive metabolites of *Diaporthe* sp. P133, an endophytic fungus isolated from *Pandanus amaryllifolius*. **Journal of Natural Medicines**. v. 65, p. 606–609, 2011.

BUSI, S., PEDDIKOTLA, P., UPADYAYULA, S.M.,YENAMANDRA, V. Secondary Metabolites of *Curvularia oryzae* MTCC 2605. *Records Natural Products*. v. 3, n.4, p. 204-208, 2009.

CABALLERO-GEORGE, C., VANDERHEYDEN, P.M., SOLIS, P.N., PIETERS, L., SHAHA, A.A., GUPTA, M.P., VAUQUELIN, G., VLIETINCK, A.J. Biological screening of selected medicinal Panamian plants by radioligand-binding techniques. **Phytomedicine**.v 8, n.1, p. 59–70, 2001.

CAMPOS, F.B., ROSA, L.H., COTA, B.B., CALIGIORNE, R.B., RABELLO, A. L. T., ALVES, T.M.A., ROSA, C.A., ZANI, C.L. Leishmanicidal Metabolites from *Cochliobolus* sp. an Endophytic Fungus Isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 2, n. 12, 2017.

CARVALHO, GONÇALVES, GUIDO. Overall Antioxidant Properties of Malt and How They Are Influenced by the Individual Constituents of Barley and the Malting Process. **Comprehensive reviews in food science and food safety**. v.15, n.5, p. 927-943, 2016

CARVALHO, P.E.R. Mutamba- Guazuma ulmifolia. Circular técnica 141. EMBRAPA, 2007.

CASTILLO, U.F., STROBEL, G.A., FORD, E.J., HESS, W.M., PORTER, H., JENSEN, J.B., CORNARD, J.P., MERLIN, J.C. Structural and spectroscopic investigation of 5-hydroxyflavone and its complex with aluminium. **Journal of Molecular Structure**.v.596, n.1, p.129-138, 2001.

CUI, J.; GUO, T.; REN, Z.; ZHANG, N.; WANG, M. Diversity and Antioxidant Activity of Culturable Endophytic Fungi from Alpine Plants of *Rhodiola crenulata*, *R. angusta*, and *R. sachalinensis*. **Plos one**. 2015.

D'AMICO, M., FRISULLO, S., CIRULLI, M. Endophytic fungi occurring in Fennel, lettuce, chicory and celery comercial cropsin Southern Italy. **Mycological Research**. v. 112, p. 100–107, 2008.

DAISY, B.H., STROBEL, G.A., CASTILLO, U., EZRA, D., SEARS, J., WEAVER, D.K., RUNYON, J.B. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**. v.148, p. 3737-41, 2002.

DAVIS, C., FRANKLIN, J.B., SHAW, J., VILGALYS, R. Endophytic xylaria (xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. **American Journal of Botany**. v. 90, n.11, p. 1661–1667, 2003.

DE, PUSPAL., SARKAR, S., MUKHOPHADHYAY, M. J. Study the antioxidant and In vitro Anti-inflammatory activity by membrane stabilization method of *Amaranthus gangeticus* leaf extract. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**. v. 6, n.4, p. 103-105, 2017.

DEMAIN, A. L., SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**. v. 62, p. 5–16, 2009.

DENG, H., GARY J. VAN BERKEL,G. J. Electrospray Mass Spectrometry and UV/Visible Spectrophotometry Studies of Aluminum(III)–Flavonoid Complexes. **Journal of mass spectrometry**. v.33, P.1080-1087, 1998.

DOMINGUEZ, X., ALCORN, J. Screening of medicinal plants used by Huastec Mayans of Northeastern Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**. v.13, p. 139–156, 1985.

DOROGHAZI, J.R., METCALF, W.W. Comparative genomics of actinomycetes with a focus on natural product biosynthetic genes. **BMC Genomic**. v.14, p.611, 2013.

DREYFUSS, M. M., CHAPELA, I. H. Potential of Fungi in the Discovery of Novel, low-molecular weight pharmaceuticals. **Biotechnology**. v.26, p.49-80, 1994.

DU, B., LIN, C., BIAN, Z., XU, B. An insight into anti-inflammatory effects of fungal beta-glucans. **Trends in Food Science & Technology**. v. 41, n.1, p. 49-59, 2015.

FEIL, J.P. Reproductive ecology of dioecious *Siparuna* (Monimiaceae) in Ecuador, a cane of gall midge polinattion. **Botanical Journal of the Linnean Society**.v.110, p.171-203, 1992.

FÉLIX-SILVA, J., SOUZA, T., MENEZES, Y.A.S., CABRAL, B., CÂMARA, R.B.G., SILVA-JUNIOR, A.A., HUGO A. O. ROCHA, REBECCHI, I. M.M., ZUCOLOTTI, S.M., FERNANDES-PEDROSA, M.F. Aqueous Leaf Extract of *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae) Inhibits Enzymatic and Biological Actions of Bothrops jararaca Snake Venom. **Plos one**. 2014.

FERREYRA, M. L.F., RIUS, S.P., CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**.v.3, n. 222, 2012.

GILMORE, M.S., LEBRETON, F., SCHAİK, W.V. Genomic Transition of Enterococci from Gut Commensals to Leading Causes of Multidrug-resistant Hospital Infection in the Antibiotic Era. **Current Opinion in Microbiology**. v.16, n.1, p.10-16, 2013.

GOGOSZ, A. M., COSMO, N.L., BONA, C., SOUZA, L.A. Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae). **Acta Botânica Brasilica**. v.24, n.3, p. 613-623, 2010.

GOLINSKA, P.; WYPIJ, M.; AGARKAR, G.; RATHOD, D.; DAHM, H.; RAI, M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 108, p. 267–289, 2015.

GOMES, R.R., GLIENKE, C., VIDEIRA, S.I., LOMBARD, L., GROENEWALD, J.Z., CROUS, P.W. Diaporthe: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. **Persoonia**. v.31, p.1-41, 2013.

GONZAGA, L.L., COSTA, L.E.O., SANTOS, T, T., ARAÚJO, E.F., QUEIROZ, M.V. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. **Journal of applied microbiology**. v.118, n.2, p. 485-496, 2015.

GUO, B., DAI, J. N.G. S, HUANG, Y., LEONG, C., ONG, W., CARTE, B.K. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. **Journal of Natural Products**. v. 63, p. 602–604, 2000.

GUO, J., RAN, H., ZENG, J., LIU, D., XIN, Z. Tafuketide, a phylogeny-guided discovery of a new polyketide from *Talaromyces funiculosus* Salicorn 58. **Biotechnological products and process engineering**. 2016.

GUYTON, A.C., HALL, J.E. Tratado de fisiologia médica. 6 ed. Rio de Janeiro. Elsevier. 2006. p.953.

HAAL, T.A. BioEdit. a user –friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** v.41, p.95-98, 1999.

HARPER, J.K., ARIF, A.M., FORD, E.J., STROBEL, G.A., PORCO, J.A., TOMER, D.P., ONEILL, K.L., HEIDER, E.M., GRANT, D.M. Pestacin: a 1,3- dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotics activities. **Tetrahedron**. v. 59, p. 2471–2476, 2003.

HENECZKOWSKI, M., KOPACZ, M., NOWAK, D., KUZIAR,A. Infrared Spectrum Analysis of Some Flavonoids. **Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research**. v.58, n.6, p. 415-420, 2001.

HOUBRAKEN, J.,SAMSON, R.A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of Trichocomaceae into three families. **Studies in Mycology**. v. 70, n. 1, p. 1-51, 2011.

HUANG, X., ZHU, Y., GUAN, X., TIAN, K., GUO, J., WANG, H., FU, G. A Novel Antioxidant Isobenzofuranone Derivative from Fungus *Cephalosporium* sp. AL031. **Molecules**. v.17, n.4, p.4219-4224, 2012.

ICHIKAWA T., DATE, M., ISHIKURA T., OZAKI, A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica (Praha)**. v.16, p. 218–224, 1971.

JAYANTHIA, G., KAMALRAJA, S., KARTHIKEYAN, K., MUTHUMARYA, J. Antimicrobial and antioxidant activity of the endophytic fungus *Phomopsis* sp. GJJM07 isolated from *Mesua férrica*. **International Journal of Current Science** .v. 1, p. 85-90, 2011.

JIA, M., CHEN, L., XIN, H., ZHENG, C., RAHMAN, K., HAN, T., QIN, L. A Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review . **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n.906, 2016.

JOZALA, F. A., ANDRADE, M.S., ARAUZ, L.J., PESSOA JR, A., PENNA, C. V. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 136-140, 2007.

JUSTO, A., MIETTINEN, O., FLOUDAS, D., ORTIZ-SANTANA., SJOKVIST, E., LINDNER, D., NAKASONE, K., NIEMELA, T., LARSSON, K., RYVARDEN, L., HIBBETT, D.S. A revised family-level classification of the Polyporales (Basidiomycota). **Fungal biology**. v. 121, p.798 - 824, 2017.

KASSUYA, C.A.L. Atividade antiinflamatória e antinociceptiva de extratos e lignanas isolados de *Phyllanthus amarus*. 2006. 121 f. Dissertação de doutorado – Universidade Federal de Santa Catarina- Santa Catarina, 2006.

KAUL, S., GUPTA, S., AHMED, M., DHAR, M.K. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry Reviews**. v. 11, p.487-505, 2012

KHARWAR, R.N., GOND, S.K., KUMAR, A., MISHRA, A. A comparative study of endophytic and epiphytic fungal association with leaf of *Eucalyptus citriodora* Hook and their antimicrobial activity. **World Journal Microbiol Biotechnology**. v. 26, p.1941–1948, 2010.

KNIGHT, V., SANGLIER, J.J., TULLIO, D. D., BRACCILI, S., BONNER, P., WATERS, J., HUGHES , D., ZHANG, L. Diversifying microbial natural products for drug Discovery. **Applied Microbiology Biotechnoly.** v. 62, p. 446–458, 2003.

KOBAYASHI, D.Y., PALUMBO, J.D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon CW, White JF (eds) *Microbial endophytes*. Dekker, New York, p. 199–236, 2000.

KUMAR, V., ALI BHAT, Z., KUMAR, D., KHAN, N., CHASHOO, I. Evaluation of anti-inflammatory potential of leaf extracts of *Skimmia anquetilia*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine.** v. 2, n.8, p. 627-630, 2012.

KUSARI, S., HERTWECK, C., SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology.** v. 63, n. 5, p. 620-624, 2000.

LEE, E., KANG, G., CHO, S. Effect of Flavonoids on Human Health: Old Subjects but New Challenges. **Recent Patents on Biotechnology.** v.1, n.2, p.139 – 150, 2007.

LI, F., XUE, F., YU, X. GC-MS, FTIR and Raman Analysis of Antioxidant Components of Red Pigments from *Stemphylium lycopersici*. *Current Microbiology.* v. 74, n.4, p. 532-539, 2017.

LI, G., KUSARI, S., KUSARI, P., KAYSER, O.,SPITELLER, M. Endophytic *Diaporthe* sp. LG23 Produces a Potent Antibacterial Tetracyclic Triterpenoid. **Journal of Natural Products.** v.78, p. 2128–2132, 2015.

LI, Y., XIN, X., CHANG, Z., SHI, R., MIAO, Z., DING, J., HAO, G. The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* Bge.f. alba are a potential source of natural antioxidant. **Botanical Studies.** v.56, n.5, p. 2-7, 2015.

LOESGEN, S., BRUHN, T., MEINDL, K., DIX, I., SCHULZ, B., ZEECK, A., BRINGMANN, G. (+)-Flavipucine, the Missing Member of the Pyridione Epoxide Family of Fungal Antibiotics. **European Journal of Organic.** v. 2011, n. 26, p. 5156–5162, 2011.

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

LULL, C., WICHERS, H.J., SAVELKOUL, H.F.J. Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites. **Mediators of Inflammation**. v.2, p.63–80, 2005.

MEHTA, V.J.; THUMAR, J.T.; SINGH, S.P. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. **Bioresource Technology**. v.97, n.14, p. 1650–1654, 2006.

MENENDEZ-BACETA, G., ACEITUNO-MATA, L., REYES-GARCÍA, V., TARDÍO, J., SALPETEUR, M., PARDO-DE-SANTAYANA, M. The importance of cultural factors in the distribution of medicinal plant knowledge: A case study in four Basque regions. **Journal of Ethnopharmacology**.v.161, p.116–127, 2015.

MENICHETTI, F. Current and emerging serious Gram-positive infections. **Clinical Microbiology Infection**. v.11, p. 22–28, 2005.

MIDDLETON, E. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 439, p. 175-18, 1998.

MONCIARDINI, P., IORIO, M., MAFFIOLI, S., SOSIO, M., DONADIO, S. Discovering new bioactive molecules from microbial sources. **Microbial Technology**. v.7, n. 3, p. 209-220, 2014.

MONDOL, A.M., FARTHOUSE, J., ISLAM, M.T., SCHÜFFLER, A., LAATSCH, H. Metabolites from the Endophytic Fungus *Curvularia* sp. M12 Act as Motility Inhibitors against *Phytophthora capsici* Zoospores. **Journal of Natural Products**.v.80, n.2, p.347-355, 2017.

MOUSA, W. K., RAIZADA, M.N. The diversity of anti-microbial secondary metabolites produced by fungal endophytes: an interdisciplinary perspective. **Frontiers in Microbiology**. v.4, n. 65, p.1-18, 2013.

NAGAHARIKA, Y., KALYANI, V., RASHEED, S. , RAMADOSSKARTHIKEYAN. Anti-inflammatory activity of leaves of *Jatropha gossypifolia* L. by HRBC membrane stabilization method. **Journal of Acute Disease**. p.156-158, 2013.

NATH, A., RAGHUNATHA, P., JOSHI, S.R. Diversity and Biological Activities of Endophytic Fungi of *Emblica officinalis*, an Ethnomedicinal Plant of India. **Mycobiology**. v. 40, n.1, p. 8-13, 2012.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NIELSEN, J. Systems Biology of Metabolism. **Review in Advance**, 2017

NIJVELDT, R.J., VAN NOOD, E., VAN HOORN, D.E.C., BOELEN, P.G., VAN NORREN, K., VAN LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.74, n.4, p.418–425, 2001.

NIMSE, S. B., PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **The Royal Society of Chemistry**. v. 5, p. 27986–28006, 2015.

OH, D., KAUFFMAN, C.A., JENSEN, P.R., FENICAL, W. Induced Production of Emericellamides A and B from the Marine-Derived Fungus *Emericella* sp. in Competing Co-culture. **Journal of Natural Products**. v. 70, n.4, p 515–520, 2007.

OSÉS, R., VALENZUELA, S., FREER, J., BAEZA, J., RODRÍGUEZ, J. Evaluation of fungal endophytes for lignocellulolytic enzyme production and wood biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**.v. 57, n.2, p. 129-135, 2006.

PALEM, P.P.C., KURIAKOSE, G.C., JAYABASKARAN, C. An Endophytic Fungus, *Talaromyces radicus*, Isolated from *Catharanthus roseus*, Produces Vincristine and Vinblastine, Which Induce Apoptotic Cell Death. **Plos one**, 2015.

PANCHE, A.N., DIWAN, A.D., CHANDRA, S.R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**. v.5, n.47, p.1-15, 2016.

PARK, H.B., KWON, H.C.K., LEE, C., YANG, H.O. Glionitrin A, an Antibiotic–Antitumor Metabolite Derived from Competitive Interaction between Abandoned Mine Microbes. **Journal of Natural Products**. v.72, n.2, p.248-252, 2009.

PARVIN, S., DAS, N., JAHAN, N., AKHTER, A., NAHAR, L., ISLAM, E. Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. **BMC Research Notes**.v. 8, n. 412, 2015.

PASSARI A. K., MISHRA V. K., SAIKIA R., GUPTA V. K., SINGH B. P. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential. **Frontiers in Microbiology**.v.6, p.273, 2015.

PAULSEN, I. T., BANERJEE, L., MYERS, G. S. A., NELSON, K.E., SESHADRI, R., READ, T.D., FOUTS, D.E., EISEN, J.A., GILL, R., HEIDELBERG, J.F., TETTELIN, H., DODSON, R.J., UMayAM, L., BRINKAC, L., BEANAN, M., DAUGHERTY, S., DEBOY, R.T., DURKIN, S., KOLONAY, J., MADUPU, R., NELSON, W., VAMATHEVAN, J., TRAN, B., UPTON, J., HANSEN, T., SHETTY, KHOURI, H., UTTERBACK, T., RADUNE, D., KETCHUM, K.A., DOUGHERTY, B.A., FRASER, C.M. Role of Mobile DNA in the Evolution of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis*. **Science**. v. 299, n. 5615, p. 2071-2074, 2003.

PHONGPAICHIT, S., RUNGJINDAMAI, N., RUKACHAISIRIKUL, V., SAKAYAROJ, J. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated from *Garcinia* species. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.48, p.367–372, 2006

PINHEIRO, P.F., JUSTINO, G.J. (2012). Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds - A Review of Spectroscopic Applications, *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), InTech, DOI:10.5772/29152. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a->

global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/structural-analysis-of-flavonoids-and-related-compounds-a-review-of-spectroscopic-applications.

PURI, S.C., VERMA, V., AMNA, T., QAZI, G.N., SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**. v. 68, p.1717–1719, 2005.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REDELL, P., GORDON, V. Lessons from nature: can ecology provide new leads in the search for novel bioactive chemicals from rainforests? p. 205–212. In S. K. Wrigley, M. A. Hayes, R. Thomas, E. J. T. Chrystal, and N. Nicholson (ed.), *Biodiversity: new leads for pharmaceutical and agrochemical industries*. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, United Kingdom, 2000.

RENNER, S.S.; HAUSNER, G. Monograph of Siparunaceae: Flora Neotropica 95. New York: New York Botanical Garden, 2005.

RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **The Journal of Infectious Diseases**. V.197, p.1079–1081, 2008.

ROGERIO, A. P., FONTANARI, C., BORDUCCHI, E., KELLER, A.C., RUSSO, M., SOARES, E. G., ALBUQUERQUE, D.A., FACCIOLI, L.H. Anti-inflammatory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. **European Journal of Pharmacology**, v.580, p.262–270, 2008.

ROGERIO, A. P., FONTANARI, C., MELO, M. C.C., AMBROSIO, S. R., SOUZA, G. E. P., PEREIRA, P. S., FRANÇA, S.C., COSTA, F. B., ALBUQUERQUE, D.A., FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia Pacari* extract and ellagic acid. **The journal of pharmacy and pharmacology**. v. 58, p. 1265- 1273, 2006.

ROKEM, J.S., LANTZ, A.E., NIELSEN, J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. **Natural Product Reports**. v. 24, p. 1262–1287, 2007.

RYAN, R.P., GERMAINE, K., FRANKS, A., RYAN, D. J., DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**. v. 278, p. 1–9, 2009.

SAINI, A.; AGGARWAL, N.K.; SHARMA, A.; YADAV, A. Actinomycetes: A Source of Lignocellulolytic Enzymes. **Enzyme Research**. 2015.

SALEEM, T.K.M., AZEEM, A.K., DILIP, C., SANKAR, C., PRASANTH, N.V., DURAIISA, R. Anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Gendarussa vulgaris* Nees. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v.1, n.2, 147-149, 2011.

SANTOS, I.P., SILVA, L.C.N., SILVA, M.V., ARAÚJO, J.M., CAVALCANTI, M.S., LIMA, V.L.M. Antibacterial activity of endophytic fungi from leaves of *Indigofera suffruticosa* Miller (Fabaceae). **Frontiers in Microbiology**. v.6, n.350, 2015.

SANTOS, L.W.1., COELHO, M.F.B., PIRANI, F.R.. Fenologia de *Lafoensia pacari* A.St.-Hil. (Lythraceae) em Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.11, n.1, p.12-17, 2009.

SCHREIBER, D., MARX, L., FELIX, S., CLASOHN, J., WEYLAND, M., SCHÄFER, M., KLOTZ, M., LILISCHKIS, R., ERKEL, G., SCHÄFER, K. Anti-inflammatory Effects of Fungal Metabolites in Mouse Intestine as Revealed by In vitro Models. **Frontiers in Physiology**. v.8, n. 566, 2017.

SCHULZ, B., BOYLE, C. Microbial root endophytes. In: Sieber, T.N (ed) What are endophytes? v.9, Springer, Berlin, p. 1–13, 2006.

SERAFINI, M., PELUSO, I., RAGUZZINI, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. **The proceedings of the Nutrition Society**. v.69, n. 3, p. 273-278, 2010.

SERAFINI, M., PELUSO, I., RAGUZZINI, A. Session 1: Antioxidants and the immune system Flavonoids as anti-inflammatory agentes. **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 69, p. 273–278, 2010.

QIN, S., LI, J., CHEN.H., ZHAO,G., ZHU, W., JIANG, C., LI-HUA, XU., LI, W. Isoation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China. **Applied and Enviromental Microbiology**. v.75, n.19, p. 6176–6186, 2009.

SHINDE, U.A., PHADKE, A.S., NARI, A.M., MUNGANTIWAR, A.A., DIKSHIT, V.J., SARAF, M.N. Membrane stabilization activity- a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil. **Fitoterapia**. v. 70, p. 251-257, 1999.

SIEBER, T.N. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**. v. 21, n.2, p. 75–89, 2007.

SILVA, G. A., BERNARDI, T. L., SCHAKER, P. D. C., MENEGOTTO, M. e VALENTE, P. Rapid Yeast DNA Extraction By Boiling And Freeze-Thawing Without Using Chemical Reagents And DNA Purification. **Brazilian Archives of Biology and Technology**.v. 55, n. 2, p. 319-327, 2012.

SOBRINHO, S.P., SIQUEIRA, A.G. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE FRUTOS, SEMENTES, PLÂNTULAS E PLANTAS JOVENS DE MUTAMBA (*Guazuma ulmifolia* Lam – STERCULIACEAE). **Revista Brasileira de Sementes**. v. 30, n.1, p.114-120, 2008.

SOGONOV, M.V., CASTLEBURY, L.A., ROSSMAN, A.Y., MEJÍA, L.C., WHITE, J.F. Leaf-inhabiting genera of the Gnomoniaceae, Diaporthales. **Studies in Mycology**. v. 62, p. 1–79, 2008.

SOLBERG, C.O. Spread of *Staphylococcus aureus* in hospitals: causes and prevention. **Scandinavian Journal of Infectious diseases**. v. 32, n.6, p. 587-595, 2000.

SOUSA, J.P.B., AGUILAR-PEREZ, M.M., ARNOLD, A.E., RIOS, N., COLEY, P.D., KURSAR, T.A., CUBILLA-RIOS, L. Chemical constituents and their antibacterial activity from the tropical endophytic fungus *Diaporthe* sp. F2934. **Journal of Applied Microbiology**. v. 120, p. 1501-1508, 2016.

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

STROBEL, G. A.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D.; FUNG, P. C. W.; CHAU, R.M.W. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**. v. 60, n.2, p. 179- 183, 2002.

STROBEL, G., DAISY, B.,CASTILLO, U., HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**. v. 67, 257-268, 2004.

SUGIHARTO, S., YUDIARTI, T., ISROLI, I. Assay of Antioxidant Potential of Two Filamentous Fungi Isolated from the Indonesian Fermented Dried Cassava. **Antioxidants (Basel)**.v.5, n.1, 2016.

TAN, R.X, ZOU, W.X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural products reports**. v.18, n.4, p. 448-459, 2001.

TIANPANICH, K., PRACHYA, S., WIYAKRUTTA,S., MAHIDOL,C., RUCHIRAWAT,S., KITTAKOOP, P. Radical Scavenging and Antioxidant Activities of Isocoumarins and a Phthalide from the Endophytic Fungus *Colletotrichum* sp. **Journal of Natural Products**. v.74, n.1, p.79-81, 2011.

TOVALA, F., KÖHLERA, C., VOGELB, U., WAGENLEHNERC, F., MELLMANNA, A., FRUTHD, A., SCHMIDTE, A., KARCHA, H., BIELASZEWSKA, A. M., DOBRINDTA, U.. Characterization of *Escherichia coli* Isolates from Hospital Inpatients or Outpatients with Urinary Tract Infection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 52, n.2, p.407, 2014.

VALENTINI, C. M. A., RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C. E., COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 12, n. 1, p. 96-104, 2010.

VALLILO, M.I., MORENO, P.R., OLIVEIRA, E., LAMARDO, L.C.A., GARBELOTTI, M.L.Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, p. 231-237, 2008.

WANG, L.W., XU, B.G., WANG, J.Y., SU, Z.Z., LIN, F.C., ZHANG, C.L., KUBICEK, C.P. Bioactive metabolites from Phoma species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.93, p.1231–1239, 2012.

WANG, Y., HAO, X., WANG, L., XIAO, B., WANG, X., YANG, Y. Diverse *Colletotrichum* species cause anthracnose of tea plants (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) in China. **Science Reports**. v. 6, 2016.

WILLIAMS, T.J. Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. **British Medical Bulletin**. v. 39, n.3, p. 239-242, 1983.

WU, L., HAN, T., LI W., JIA, M., XUE, L., RAHMAN, K., ET AL. Geographic and tissue influences on endophytic fungal communities of *Taxus chinensis* var. *mairei* in China. **Current Microbiology**. v. 66, p. 40–48, 2013.

ZHANG, H.W., SONG, Y.C., TAN, R.X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Products Reports**.v.23, n.5, p.753-771, 2006.

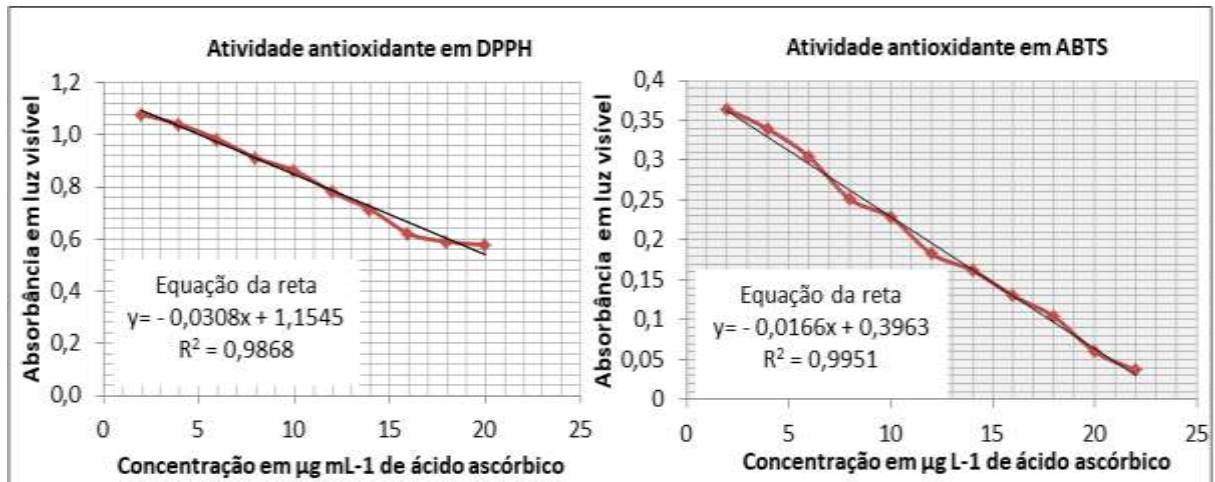
ZHAO, L., XU, L., JIANG, C. Methods for the Study of Endophytic Microorganisms from Traditional Chinese Medicine. **Methods in Enzymology**. v. 517, p.3-21, 2012.

ZOU, W. X., MENG, J. C., LU, H., CHEN, G.X., SHI, G.X., ZHANG, T.Y., TAN, R.X. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mongolica*. **Journal of Natural Products**. v. 63, p.1529-1530, 2000.

Anexo A

Obtenção da curva de calibração em reação de ácido ascórbico e DPPH e ácido ascórbico e ABTS⁺. As concentrações utilizadas foram de 2µg a 20 µg de ácido ascórbico, as condições das reações foram as mesmas utilizadas com os extratos brutos.

Figura A1: Gráficos para obtenção dos valores de absorvância em reações com DPPH e ABTS de acordo com a concentração em µg mL⁻¹ do ácido ascórbico.



Obtenção da curva de calibração em reação do flavonoide quercetina em diferentes concentrações (2µg a 16µg). As condições das reações foram as mesmas utilizadas com os extratos brutos.

Figura A2: Gráfico para obtenção dos valores de absorvância de acordo com a concentração em µg mL⁻¹ de quercetina.

