

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANA LUÍSA LOPES ERNESTO REIS

**ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PRODUTO DA FERMENTAÇÃO DO
FUNGO ENDOFÍTICO *Gibberella moniliformis*, PROVENIENTE DO MANGUE
BRASILEIRO**

Alfenas/MG

2018

ANA LUÍSA LOPES ERNESTO REIS

**ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PRODUTO DA FERMENTAÇÃO DO
FUNGO ENDOFÍTICO *Gibberella moniliformis*, PROVENIENTE DO MANGUE
BRASILEIRO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

Reis, Ana Luísa Lopes Ernesto
R375e Estudo da atividade biológica do produto da fermentação do fungo
endofítico *Gibberella moniliformis*, proveniente do manguê brasileiro / Ana
Luísa Lopes Ernesto Reis. -- Alfenas/MG, 2018.
87 f. : il. --

Orientador: Masaharu Ikegaki.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal
de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. *Gibberella*. 2. Fermentação. 3. Antimicóticos. 4. Sinergismo de
Drogas. I. Ikegaki, Masaharu. II. Título.

CDD-579.1



ANA LUÍSA LOPES ERNESTO REIS

“ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO PRODUTO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO
ENDOFÍTICO *Gibberella moniliformis*, PROVENIENTE DO MANGUE BRASILEIRO”

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro

Aprovado em: 13 de julho de 2018.

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

Instituição: UFSCAR

Assinatura:

Profª. Dra. Marília Caixeta franco Ariosa

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

*Aos meus pais, Geraldo e Cláudia, por todo amor e incentivo,
com gratidão, dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Masaharu Ikegaki, por me acolher na universidade e me dar a oportunidade de executar este trabalho. Agradeço pela orientação, apoio, confiança e ensinamentos que tanto contribuíram para o meu crescimento científico e pessoal.

Ao Professor Dr. Paulo Teixeira Lacava e à Dra. Fernanda L. S. Sebastianes por cederem gentilmente o fungo endofítico estudado neste projeto.

À Professora Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz pela colaboração na obtenção do extrato fúngico.

Ao Professor Dr. Severino Matias de Alencar pelo auxílio na análise de HPLC e nos ensaios antioxidantes, e às suas alunas doutoranda Jackeline Cintra Soares e mestranda Anna Paula de Souza Silva por toda ajuda e receptividade.

À Professora Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz pela colaboração com os ensaios para a determinação da atividade antiproliferativa.

Ao Professor Marcos José Marques e sua aluna doutoranda Juliana Barbosa Nunes pela colaboração com o ensaio de atividade leishmanicida.

Ao Professor Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho e seu aluno mestrando Gabriel Augusto Pires de Souza, pela colaboração com os testes de citotoxicidade.

Aos Professores Dr. Marcos José Marques, Dra. Amanda Latercia Tranches Dias e Dra. Lilian Pereira Franco, que compuseram a banca do exame de qualificação e contribuíram com importantes e valiosas sugestões para a melhoria deste trabalho.

À Dra. Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho, por todo apoio técnico e emocional, pela paciência em me ensinar cada etapa dentro do laboratório, pelos conhecimentos transmitidos, pela gentileza e disposição com que sempre me recebeu e sanou minhas dúvidas.

À toda equipe do Laboratório de Bioprocessos (Unifal-MG), especialmente ao técnico Dr. Gustavo Silveira por toda gentileza, disposição, auxílio e conhecimentos compartilhados; e à funcionária Daniela Aparecida de Paulo Pinto, pela boa convivência e auxílio com vidrarias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, à Universidade Federal de Alfenas e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela oportunidade, suporte e apoio financeiro.

À Deus e Nossa Senhora pela proteção em todos os momentos, pela força e coragem durante esta caminhada.

Aos meus pais, Geraldo e Cláudia, pelo amor incondicional, por sempre me incentivarem, apoiarem e não medirem esforços para a realização dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, Ana Cláudia e Geraldo Jr., pelo amor e amizade de sempre. Por acreditarem e torcerem por mim.

Ao meu namorado, Igor Augusto, por seu amor, apoio, compreensão e paciência durante todo este percurso.

Aos meus demais familiares por compreenderem minhas ausências, pelos conselhos e apoio, especialmente à minha vó Dircélia (*in memoriam*) que me incentivou tanto a fazer este mestrado.

Às grandes amigas que ganhei, Marina, Catherine, Letícia e Patrícia, agradeço por toda ajuda, incentivo, convívio, parceria e pelas boas risadas. Tudo seria mais difícil sem vocês!

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

RESUMO

A busca por novos compostos para uso na medicina, agricultura e indústria está em contínuo crescimento, e os produtos naturais constituem a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novas moléculas. Entre os diversos produtos naturais existentes considera-se os fungos endofíticos de mangues uma fonte valiosa para a descoberta de novas substâncias de interesse terapêutico e biotecnológico, pois oferecem uma diversidade incontável de estruturas químicas. Tendo em vista o potencial bioativo destes micro-organismos, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a atividade biológica e a composição química da fração butanólica do extrato proveniente da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) visando identificar novos metabólitos bioativos. O endófito, isolado da planta de mangue *Laguncularia racemosa*, foi submetido ao processo de fermentação em caldo Czapek e posteriormente o caldo fermentado foi particionado com diferentes solventes gerando a fração butanólica (FBuOH). A composição química da fração FBuOH foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD), bem como foi determinado seu conteúdo de fenólicos totais (15,85 mg GAE/g). O estudo cromatográfico da fração FBuOH sugeriu a presença de grupos cromóforos (revelados por luz UV 254 nm), terpenos, saponinas e flavonoides (positivos ao anisaldeído sulfúrico), alcaloides (reativos a Dragendorff) e aminas primárias (positivos a ninhidrina). Foi investigado o potencial biológico da fração FBuOH por meio de diferentes ensaios *in vitro*. Nos ensaios antimicrobianos foram avaliadas a concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM) contra diferentes micro-organismos, sendo que a fração FBuOH evidenciou forte potencial antifúngico contra *Candida albicans* ATCC 10231, apresentando CIM de 25-50 µg/mL e CMM de 50 µg/mL, moderada atividade contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (CIM: 100-200 µg/mL e CMM > 400 µg/mL) e foi inativa frente à *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 nas concentrações testadas. Verificou-se efeito sinérgico na associação da fração FBuOH com fluconazol (ICIF = 0,375), com potencialização em 8 vezes da ação do fármaco contra *C. albicans*. A atividade antioxidante da fração FBuOH foi avaliada pelos métodos DPPH, ABTS, ORAC e FRAP, com resultados de 39,03; 152,16; 213,72 µmol de Trolox/g de fração e 182,28 µmol de Fe²⁺/g, respectivamente, e também por HPLC-ABTS⁺⁺ *on-line*, não evidenciando compostos com atividade expressiva. A atividade antiproliferativa foi testada pelo método sulforadamina B (SRB) frente a dez linhagens tumorais humanas e uma linhagem não tumoral e verificou-se que FBuOH não inibiu a proliferação celular de nenhuma das linhagens avaliadas nas concentrações testadas (TGI > 250 µg/mL), sendo relevante destacar que a mesma apresentou TGI > 250 µg/mL também para a linhagem não tumoral HaCaT (queratinócito). A fração FBuOH não apresentou atividade contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* nas concentrações testadas (IC₅₀ > 100 µg/mL). No ensaio de citotoxicidade a concentração citotóxica da fração FBuOH que inibiu 50% de células Vero foi de 449 µg/mL, apresentando índice de seletividade de 8,98. Conclui-se que o fungo *G. moniliformis* 99(3) é promissor na produção de compostos antifúngicos, incentivando a continuidade de estudos com a fração FBuOH tanto para um possível isolamento do composto responsável pela atividade evidenciada, quanto para futuros testes *in vivo*.

Palavras-chave: *Gibberella moniliformis*. Fermentação. Potencial antifúngico. Sinergismo. Ensaio biológicos.

ABSTRACT

The search for new compounds to use on medicine, agriculture and industry is continuously growing, and natural products are the most successful strategy for discovery of new molecules. Among the various existing natural products, endophytic fungi of mangrove are considered a valuable source for discovery of new substances with therapeutic and biotechnological interest, since they offer an uncountable diversity of chemical structures. Considering the bioactive potential of these microorganisms, the aimed of this work was to evaluate the biological activity and chemical composition of the butanolic fraction of the extract from the fermentation of the endophytic fungus *Gibberella moniliformis* 99(3) in order to identify new bioactive metabolites. The endophyte isolated from of mangrove plant *Laguncularia racemosa*, was submitted to the fermentation process in Czapek broth and later the fermented broth was partitioned with different solvents resulting in the butanolic fraction (FBuOH). The chemical composition of the FBuOH fraction was analyzed by thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC-DAD), as well as its total phenol content (15.85 mg GAE/g). Chromatographic study of the FBuOH fraction suggested the presence of chromophore groups (revealed in UV light 254 nm), terpenes, saponins and flavonoids (positive for sulfuric anisaldehyde), alkaloids (reactive Dragendorff) and primary amines (ninhydrin positive). The biological potential of the FBuOH fraction was investigated by different *in vitro* assays. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicide (MMC) against different microorganisms were evaluated in the antimicrobial assay, in which FBuOH fraction showed strong antifungal potential against *Candida albicans* ATCC 10231, with MIC of 25-50 $\mu\text{g/mL}$ and MMC of 50 $\mu\text{g/mL}$, moderate activity against *Escherichia coli* ATCC 25922 (MIC: 100-200 $\mu\text{g/mL}$ and MMC > 400 $\mu\text{g/mL}$) and was inactive against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 at the concentrations tested. Synergistic effect was observed in the combination of the FBuOH fraction with fluconazole (ICIF = 0.375), with eight times potentiation of the action of the drug against *C. albicans*. The antioxidant activity of the FBuOH fraction was evaluated by the DPPH, ABTS, ORAC and FRAP methods, with results of 39.03; 152.16; 213.72 $\mu\text{mol Trolox/g}$ of fraction and 182.28 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ respectively, and also by HPLC-DAD-ABTS *on-line*, showing no compounds with expressive activity. The antiproliferative activity was tested by the sulforhodamine B (SRB) method against ten human tumor cell lines and one non-tumoral line and it was found that FBuOH did not inhibit cellular proliferation of any of the tested lines at the tested concentrations (TGI > 250 $\mu\text{g/mL}$), being relevant to highlight that presented TGI > 250 $\mu\text{g/mL}$ also for the non-tumoral HaCaT (keratinocyte) line. The FBuOH fraction did not show activity against *Leishmania amazonensis* promastigotes in the tested concentrations (IC₅₀ > 100 $\mu\text{g/mL}$). In the cytotoxicity assay the cytotoxic concentration of the FBuOH fraction which inhibited 50% Vero cells was 449 $\mu\text{g/mL}$, with selectivity index of 8.98. It is concluded that the fungus *G. moniliformis* 99 (3) is promising in the production of compounds antifungal, encouraging the continuity of studies with the FBuOH fraction both for a possible isolation of the compound responsible for the activity and for future *in vivo* tests.

Keywords: *Gibberella moniliformis*. Fermentation. Antifungal potential. Synergism. Biological assays.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de um micro-organismo endofítico nos tecidos vegetais. Hifas do fungo endofítico <i>Epichloë coenophiala</i> na folha (A) e na semente (B) de <i>Festuca arundinacea</i> . enh = hifas endofíticas. Barra = 10 µm	17
Figura 2 - Manguezal de Bertioga, São Paulo	22
Figura 3 - Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com a fração FBuOH associada com os antifúngicos comerciais fluconazol e anfotericina B e o micro-organismo <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	34
Figura 4 - Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com a fração FBuOH associada com antifúngico comercial nistatina e o micro-organismo <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	34
Figura 5 - Cromatografia em camada delgada da fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3) revelada com luz UV-254 nm (A), anisaldeído sulfúrico (B), ninhidrina (C) e reagente Dragendorff (D). Fase móvel (orgânica): clorofórmio, metanol, n-propanol e água (5:6:1:4). As setas indicam as principais bandas reveladas	45
Figura 6 - Cromatograma da fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3) obtido por HPLC-DAD a 350 nm	46
Figura 7 - Uma abordagem racional para exploração de culturas axênicas de endófitos para a produção de metabólitos secundários	53
Figura 8 - Cromatogramas da fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3), detectados a 350 nm (pico positivo) (A) e 734 nm (pico negativo) (B) por HPLC-DAD <i>on-line</i> (sequestro do radical ABTS ^{•+})	60
Figura 9 - Atividade antiproliferativa da doxorubicina (superior) e da fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3) (inferior) contra células humanas tumorais. U251: glioma; UACC-62: melanoma; MCF7: mama; NCI-ADR/RES: ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; 786-0: rim; NCI-H460: pulmão, tipo não pequenas células; PC-3: próstata; OVCAR- 3: ovário; HT29: cólon; K-562: leucemia; HaCat: queratinócito imortalizado, célula não tumoral humana. Doxorubicina: quimioterápico de referência – controle positivo	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Linhagens celulares utilizadas na avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> da fração butanólica (FBuOH) obtida da fermentação do fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3)	39
Tabela 2 -	Concentrações inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM) em µg/mL observadas para as frações acetato de etila (FAcOEt) e butanólica (FBuOH) provenientes da fermentação do fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3) contra diferentes micro-organismos	49
Tabela 3 -	Teste de <i>Checkerboard</i> com a fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3) em associação com antifúngicos de uso comercial contra <i>Candida albicans</i> , em µg/mL	55
Tabela 4 -	Atividade antioxidante da fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3) determinada pelos métodos DPPH, ABTS, ORAC e FRAP	57
Tabela 5 -	Concentração necessária para inibir completamente a proliferação celular (TGI) para doxorubicina e para a fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3) em µg/mL	64
Tabela 6 -	Citotoxicidade e índice de seletividade da fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3) frente a células Vero	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAPH	- Dicloridrato de 2,2-azobis (2-amidino-propano)
ABD	- Ágar batata-dextrose
ABTS	- 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AcOEt	- Acetato de etila
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
AUC	- Área sob a curva (do inglês <i>Area Under Curve</i>)
BuOH	- <i>n</i> -butanol
CC ₅₀	- Concentração citotóxica para 50% do crescimento celular
CC ₉₀	- Concentração citotóxica para 90% do crescimento celular
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CIF	- Concentração inibitória fracionária
CIM	- Concentração inibitória mínima
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMH	- Caldo Mueller Hinton
CMM	- Concentração microbicida mínima
CPQBA	- Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CSab	- Caldo Sabouraud
DAD	- Detector de Arranjo de Diodos (do inglês <i>Diode Array detector</i>)
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPPH	- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
ERO	- Espécie reativa de oxigênio
ESALQ	- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
FRAP	- Poder de redução do ferro (do inglês <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>)
GAE	- Equivalentes em ácido gálico (do inglês <i>Gallic Acid Equivalent</i>)
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)

HaCaT	- Linhagem celular não tumoral humana (queratinócito)
HT 144	- Linhagem derivada de melanona humano
HT29	- Linhagem de adenocarcinoma de cólon
IC ₅₀	- Concentração necessária para 50% de inibição
ICIF	- Índice de concentração inibitória fracionária
IS	- Índice de seletividade
K-562	- Linhagem celular de leucemia mieloide crônica
KB	- Linhagem celular de carcinoma epidermóide humano
KBv200	- Linhagem celular de carcinoma epidermóide humano
LAMIB	- Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas
LIT	- <i>Liver Infusion Triptose</i>
MCF7	- Linhagem celular de adenocarcinoma de mama
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (do inglês <i>Methicillin resistant Staphylococcus aureus</i>)
MTT	- brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NCI-H460	- Linhagem celular de carcinoma de pulmão
ORAC	- Capacidade de absorção do radical oxigênio (do inglês <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>)
OVACAR-3	- Linhagem celular de adecarcinoma de ovário
PC-3	- Linhagem celular de adenocarcinoma de próstata
rpm	- Rotações por minuto
SFB	- Soro fetal bovino
SNC	- Sistema nervoso central
SRB	- Sulforodamina B
TCA	- Ácido tricloroacético
TGI	- Inibição total do crescimento (do inglês <i>Total Growth Inhibition</i>)
TPTZ	- Tripiridiltriazina
U251	- Linhagem celular derivada de glioma humano
UACC-62	- Linhagem celular derivada de melanoma humano

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

UV - Ultravioleta

WHO - *World Health Organization*

786-0 - Linhagem celular de adenocarcinoma de rim

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Micro-organismos endofíticos	17
2.2	Fungos endofíticos	19
2.3	Fungos endofíticos de mangues	21
2.4	Fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i>	23
2.5	Atividades biológicas dos fungos endofíticos	23
2.5.1	Atividade Antimicrobiana	24
2.5.2	Atividade Antioxidante	24
2.5.3	Atividade Antiproliferativa	25
2.5.4	Atividade Leishmanicida	26
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Fungo endofítico estudado	29
4.2	Processo de fermentação e obtenção do extrato fúngico	29
4.3	Caracterização química	30
4.3.1	Cromatografia em camada delgada (CCD)	30
4.3.2	<i>High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector</i> (HPLC-DAD)	30
4.3.3	Determinação quantitativa de compostos fenólicos	31
4.4	Avaliação das Atividades Biológicas	31
4.4.1	Avaliação da atividade antimicrobiana	31
4.4.2	Avaliação do potencial sinérgico	33
4.4.3	Avaliação da atividade antioxidante	35

4.4.3.1	<i>Sequestro do radical livre DPPH*</i>	35
4.4.3.2	<i>Sequestro do radical livre ABTS^{•+}</i>	36
4.4.3.3	<i>Poder de redução do ferro (FRAP)</i>	37
4.4.3.4	<i>Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)</i>	37
4.4.3.5	<i>Atividade antioxidante on-line por HPLC-ABTS^{•+}</i>	38
4.4.4	<i>Avaliação da atividade antiproliferativa</i>	39
4.4.5	<i>Avaliação da atividade leishmanicida</i>	41
4.4.6	<i>Avaliação da citotoxicidade</i>	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	Caracterização química	44
5.1.1	<i>Cromatografia em camada delgada (CCD)</i>	44
5.1.2	<i>High Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector (HPLC-DAD)</i>	46
5.1.3	<i>Determinação quantitativa de compostos fenólicos</i>	47
5.2	Atividades Biológicas	49
5.2.1	<i>Atividade Antimicrobiana</i>	49
5.2.2	<i>Potencial Sinérgico</i>	54
5.2.3	<i>Atividade Antioxidante</i>	57
5.2.4	<i>Atividade Antiproliferativa</i>	62
5.2.5	<i>Atividade Leishmanicida</i>	66
5.2.6	<i>Citotoxicidade</i>	67
6	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A busca por novos compostos que sejam eficazes, possuam baixa toxicidade e apresentem menor impacto ambiental está em constante crescimento para uso tanto em indústrias farmacêuticas quanto agroquímicas. Esta busca é impulsionada pelo desenvolvimento de resistência em micro-organismos infecciosos (BROWN; WRIGHT, 2016), pela necessidade de drogas mais eficientes contra infecções fúngicas, virais e parasitárias (STROBEL; DAISY, 2003), pelo aumento alarmante na incidência de câncer (BRASIL, 2015), pelas inúmeras patologias associadas ao excesso de radicais livres (FIRUZI et al., 2011) e, também, pela segurança ambiental no controle de pragas e patógenos agrícolas (FLORES et al., 2013).

Uma fonte estratégica para obtenção desses novos compostos são os produtos naturais, os quais apresentam uma ampla diversidade química, mesmo quando comparados a outras fontes fornecedoras de protótipos de novos fármacos como a química combinatória, as bibliotecas virtuais e a robótica (GOUDA et al., 2016; HARVEY, 2000; MORRISON; HERGENROTHER, 2014). A diversidade química dos produtos naturais tem sido amplamente discutida na literatura, demonstrando sua importância na descoberta e desenvolvimento de fármacos (BARNES; KUMAR; DAVIS, 2016; BUTLER, 2004; CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016; WRIGHT, 2017).

Produtos naturais com aplicações industriais podem ser produzidos a partir do metabolismo primário ou secundário de organismos vivos, sejam eles plantas, animais ou micro-organismos (DEMAIN; SANCHEZ, 2009). No entanto, mesmo apresentando uma ampla diversidade em espécies e sendo reportados na literatura com inúmeras aplicações biológicas (AZEVEDO, 2014; BUATONG et al., 2011; MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA; SÁNCHEZ, 2016), os micro-organismos constituem um dos grupos menos estudados do ponto de vista do metabolismo secundário (HAWKSWORTH, 2001; QADRI et al., 2013; STROBEL; DAISY, 2003). Newman e Cragg (2016) chamam a atenção de pesquisadores para o reconhecimento da rápida e significativa evolução de fármacos produzidos por micro-organismos e/ou pela interação microbiana com o hospedeiro de onde são isolados, e ressaltam que esta área de pesquisa de produto natural deve ser investigada e expandida, pois pode proporcionar uma ampla oportunidade para a descoberta de novas moléculas.

Dentre os micro-organismos, os fungos são sabidamente uma fonte rica de metabólitos secundários (BILLS; GLOER, 2016), no entanto, é a classe de fungos endofíticos que tem

atraído a atenção de pesquisadores de produtos naturais. Fungos endofíticos são definidos como micro-organismos que colonizam os tecidos internos das plantas, ou cumprem parte de seu ciclo de vida dentro delas, sem causar quaisquer prejuízos aparentes no hospedeiro (STONE; BACON; WHITE, 2000), e tornam-se interessantes pela grande diversidade química e ineditismo de moléculas que possuem, apresentando variada atividade biológica, além de potencial para produzirem compostos iguais aos de suas plantas hospedeiras (CARVALHO et al., 2012; DESHMUKH; VEREKAR; BHAVE, 2015; FERNANDES et al., 2009).

Acredita-se que não exista nenhuma espécie vegetal sem associação a um micro-organismo endofítico (NISA et al., 2015). Considerando a enorme biodiversidade que existe na Terra, é grande a oportunidade de descobrir novos e interessantes fungos endofíticos de plantas de diferentes ecossistemas. A literatura sugere que plantas de habitat único, endêmicas e com histórico etnobotânico são fontes potenciais de novas moléculas, bem como, aqueles micro-organismos oriundos de nichos que requeiram alta atividade metabólica, isso porque, condições ambientais extremas tendem a induzir a produção de compostos diversos, o que pode nos levar a descobrir uma substância química inovadora (ARNOLD et al., 2003; STROBEL; DAISY, 2003; STROBEL et al., 2004; TAN; ZOU, 2001). Levando essas sugestões em consideração, ambientes como mangues, tornam-se atrativos para a pesquisa de novas moléculas.

O manguezal é uma região com alta biodiversidade que compreende uma zona de transição entre terra e mar e é considerado um ambiente único, sendo caracterizado por árvores com raízes aéreas, alta salinidade, altas temperaturas, ventos fortes, flutuações das marés e ainda solo lodoso e com baixos teores de oxigênio. Estas condições ambientais resultam em uma comunidade microbiana bastante ativa, que pode atuar como um seletor efetivo para adaptações de vias metabólicas através da geração de metabólitos bioativos únicos de interesse para a humanidade (SEBASTIANES; AZEVEDO; LACAVA, 2017; SEBASTIANES et al., 2013a; XU, 2015).

Diante deste contexto, estudos de bioprospecção com fungos endofíticos obtidos de mangues tornam-se relevantes, pois são uma fonte promissora para a descoberta de metabólitos bioativos que possam suprir a necessidade mundial crescente de novos compostos para aplicações terapêuticas, agrícolas e biotecnológicas. Além disso, este trabalho é uma continuação de estudos conduzidos por Carvalho (2016) com o fungo *Gibberella moniliformis* 99(3), proveniente de um mangue brasileiro, que mostraram que este endófito é promissor na produção de compostos bioativos, incentivando a continuidade de estudos com os compostos produzidos por este fungo e de suas possíveis atividades biológicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão do presente estudo está embasada em definições e exemplos encontrados na literatura que denotam a importância de fungos endofíticos de mangues e dos compostos bioativos produzidos por estes micro-organismos.

2.1 Micro-organismos endofíticos

Os micro-organismos endofíticos, geralmente chamados de endófitos, foram descritos pela primeira vez por De Bary em 1866, referindo-se a qualquer micro-organismo que vive no interior de tecidos vegetais, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície (WILSON, 1995). Atualmente são encontradas diferentes definições de endófitos na literatura, sendo a de Stone, Bacon e White (2000) amplamente aceita e utilizada, a qual define os endófitos como micro-organismos que colonizam os tecidos internos das plantas, ou cumprem parte do seu ciclo de vida dentro delas, sem causar quaisquer prejuízos aparentes no hospedeiro (FIGURA 1).

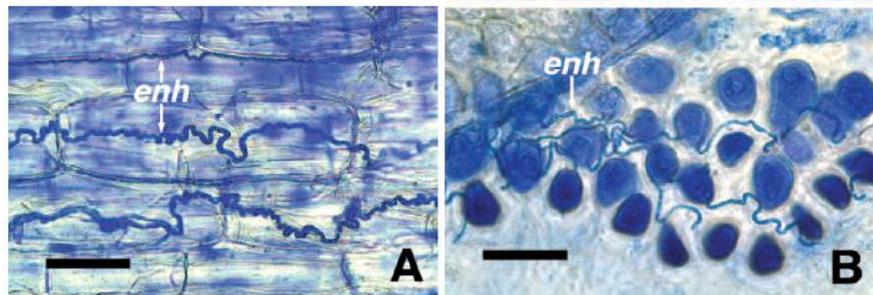


Figura 1 - Exemplo de um micro-organismo endofítico nos tecidos vegetais. Hifas do fungo endofítico *Epichloë coenophiala* na folha (A) e na semente (B) de *Festuca arundinacea*. enh = hifas endofíticas. Barra = 10 μ m.

Fonte: TADYCH; BERGEN; WHITE JR, 2014.

Micro-organismos endofíticos podem penetrar em seus hospedeiros de duas maneiras diferentes: horizontalmente, através de aberturas naturais ou artificiais, tais como estômatos, regiões de emissão de raízes secundárias e ferimentos causados por instrumentos agrícolas; ou verticalmente através das sementes do hospedeiro, de forma que podem ser transmitidos para as próximas gerações (HARTLEY; GANGE, 2009). Uma vez dentro da planta, os endófitos podem estabelecer relações com seus hospedeiros.

A relação mais comum é a simbiose, um tipo de associação interespecífica de forma mutuamente vantajosa em que os endófitos recebem nutrientes e proteção da planta, enquanto produzem metabólitos bioativos que oferecem vantagens ao hospedeiro como maior resistência

a estresses bióticos e abióticos, auxílio no crescimento, além de defesa contra herbivoria e ataque de patógenos (JIA et al., 2016; OWNLEY; GWINN; VEGA, 2010; SAIKKONEN et al., 2004).

O aumento no número de estudos sobre as interações endófito-planta hospedeira (CHANDRA, 2012; GUNATILAKA, 2006; KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014; WANI et al., 2015) tem contribuído para o entendimento dos processos ecológicos envolvidos nessa relação, o que pode resultar na descoberta de fontes alternativas de substâncias de interesse para a humanidade, visto que é bastante provável que os produtos naturais resultem de interações dos organismos entre si e destes com o ambiente, e que estes produtos desempenhem funções nas relações simbióticas representando vantagens adaptativas e evolutivas (MORAIS et al., 2014; SANTOS et al., 2013; SEBASTIANES et al., 2012a).

Sugere-se ainda, que nesta relação simbiótica os micro-organismos endofíticos coevoluam com seus hospedeiros, levando os fungos a sintetizarem compostos bioativos originalmente conhecidos como exclusivos de plantas (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2013; JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2011; JIA et al., 2016; KUMARA et al., 2014; SAIKKONEN et al., 2004). O exemplo mais marcante é a produção do Taxol® (paclitaxel), potente agente antitumoral que anteriormente era obtido apenas da exploração da planta *Taxus brevifolia*, mas hoje pode ser obtido pela fermentação do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* que é isolado da casca desta planta (STIERLE et al., 1995; STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Mais recentemente, os agentes antitumorais vincristina, vimblastina (KUMAR et al., 2013) e a camptotecina (PURI et al., 2005) também foram isolados de fungos endofíticos associados aos respectivos hospedeiros vegetais produtores desses compostos. Exemplo semelhante foi relatado para a planta de mangue *Hibiscus tiliaceus*, no qual tanto o exame químico da planta como o caldo de fermentação do seu endófito *Phomopsis* sp. revelaram a presença de triterpenos do tipo oleanano, sugerindo uma possível transferência da maquinaria biossintética do esqueleto de oleanano durante a evolução (LI et al., 2006, 2008).

Estas incríveis descobertas levantaram questões quanto à transferência horizontal de genes entre planta hospedeira e endófito, e vice-versa (JANSO; CARTER, 2010; KUSARI et al., 2009; KUSARI; ZÜHLKE; SPITELLER, 2009; STIERLE et al., 1995), e enfatizam o potencial de usar tais micro-organismos como fonte dos metabólitos produzidos pelas plantas (KUMARA et al., 2014; KUSARI; PANDEY; SPITELLER, 2012; LUDWIG-MÜLLER, 2015; PRITI et al., 2009), aumentando assim a perspectiva de usar os endófitos como fontes alternativas e sustentáveis para obtenção de compostos de interesse, proporcionando um fornecimento inesgotável, reproduzível e rentável destes compostos, além de evitar a extinção

das plantas produtoras (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2013; JIA et al., 2016; STROBEL et al., 2004). Isto se reforça, por exemplo, ao analisar os métodos tradicionais de extração do paclitaxel a partir da casca de *Taxus* spp., uma vez que são necessárias 10 toneladas de casca de *Taxus*, o que representa aproximadamente 300 árvores, para a produção de um quilo de taxol que é suficiente para o tratamento de apenas 500 pacientes (ELAVARASI; RATHNA; KALAISELVAM, 2012; MALIK et al., 2011), ou seja, é imprescindível a busca e otimização de novas alternativas mais viáveis econômica e ecologicamente para obtenção deste e de outros compostos bioativos.

Existem na Terra aproximadamente 300 mil espécies de plantas superiores e cada planta individual, das bilhões que existem, é hospedeira de pelo menos um micro-organismo endofítico, sendo que poucas espécies dessas plantas foram completamente estudadas em relação a sua biologia endofítica (JIA et al., 2016). Segundo Nisa e colaboradores (2015), ainda não existe estudo na literatura que descreva a existência de uma espécie vegetal sem associação a um endófito. Sendo assim, a oportunidade de se descobrir novos e interessantes micro-organismos endofíticos a partir de plantas de diferentes ecossistemas é enorme, atraindo ainda mais a atenção de pesquisadores de produtos naturais.

Os micro-organismos endofíticos podem ser encontrados nos mais diversos ambientes, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, desertos, solos geotérmicos, oceanos, florestas costeiras, florestas tropicais e mangues (ARNOLD, 2007; JALGAONWALA; MOHITE; MAHAJAN, 2011). Geralmente, centenas de espécies de endófitos podem ser isoladas de uma única planta, sendo que pelo menos um endófito é específico ao hospedeiro (TAN; ZOU, 2001). Fungos e bactérias são os micro-organismos mais comuns existentes como endófitos, sendo os fungos mais frequentemente isolados (MARTINEZ-KLIMOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA; SÁNCHEZ, 2016; STROBEL; DAISY, 2003).

2.2 Fungos endofíticos

Os fungos constituem uma rica fonte de metabólitos secundários e, desde que Alexander Fleming em 1928 inaugurou a era dos antibióticos pela descoberta da penicilina isolada do fungo *Penicillium notatum*, deu-se início aos estudos investigativos desses micro-organismos (STROBEL et al., 2004), o que gerou um grande avanço nas indústrias farmacêuticas e agroquímicas.

Alguns fármacos bem conhecidos derivados de fungos incluem: antibióticos da classe das penicilinas e cefalosporinas, agentes redutores de colesterol como a mevastatina e

lovastatina, imunossupressores como a ciclosporina e rapamicina (CRAGG; NEWMAN, 2005), agentes antitumorais como antraciclinas, bleomicinas, actinomicinas, mitomicinas e ácidos aureólicos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2000), entre outros. Segundo Demain (2013), dos 23.000 compostos biologicamente ativos obtidos de micro-organismos até 2013, 42% são produzidos por fungos.

No entanto, dentre as várias classes desses micro-organismos, o grupo dos fungos endofíticos têm ganhado atenção especial de pesquisadores de produtos naturais devido à enorme diversidade química, ineditismo de moléculas e atividades biológicas que este grupo apresenta (ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2013; CARVALHO et al., 2012; GUO et al., 2008; SEBASTIANES et al., 2012b; SEBASTIANES et al., 2017 SHIONO et al., 2016). Na última década, aproximadamente metade dos metabólitos fúngicos descobertos, cerca de 5000 compostos, foram isolados de fungos endofíticos (BÉRDY, 2012).

O reconhecimento dos fungos endofíticos como uma fonte importante para obtenção de compostos bioativos se deu com a descoberta de *T. andreanae*, um endófito isolado da casca de *T. brevifolia*, capaz de produzir o agente antitumoral paclitaxel (Taxol®) (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Desde então, vários outros fungos endofíticos isolados de diferentes espécies vegetais foram detectados como produtores de paclitaxel, entre eles: *Pestalotia*, *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Pithomyces*, *Monochaetia* (STROBEL et al., 1996).

O impacto dos endófitos pode ser visto nas mais variadas áreas, do controle biológico de pragas (ESQUEDA et al., 2017) à síntese de biocombustível (STROBEL, 2015; STROBEL et al., 2008). Entre esses extremos, ainda são capazes de produzir uma série de metabólitos bioativos com aplicações potenciais nas indústrias farmacêuticas, agrícolas, alimentícias, biotecnológicas e de cosméticos (DESHMUKH; VEREKAR; BHAVE, 2015; GOUDA et al., 2016; NAIR; PADMAVATHY, 2014). Estes metabólitos podem ser categorizados em vários grupos funcionais como alcaloides, esteroides, terpenos, compostos fenólicos, taninos, quinonas, flavonoides, saponinas, lactonas, dentre outros, o que confere a esses micro-organismos um amplo espectro de atividades biológicas como antimicrobiana, antiparasitária, neuroprotetiva, antioxidante, antidiabética, imunossupressora, antiviral, antitumoral, inseticida, etc. (BORGES et al., 2009; GOUDA et al., 2016; MARTINEZ-KLIKOVA; RODRÍGUEZ-PEÑA; SÁNCHEZ, 2016; PIMENTEL et al., 2011; TAN; ZOU, 2001). De acordo Nisa e colaboradores (2015), os endófitos são um grupo com imenso impacto na medicina moderna, uma vez que cerca de 40% dos fármacos prescritos atualmente são baseados nesses micro-organismos.

Logo, os fungos endofíticos tornam-se uma fonte promissora para exploração de compostos bioativos, representando uma fonte fácil e econômica de novas moléculas, além de contribuírem com a preservação da biodiversidade mundial por sua característica não predatória.

2.3 Fungos endofíticos de mangues

Acredita-se que todas as espécies de plantas sejam potenciais hospedeiras para diversos fungos, e que cada espécie vegetal possua um ou vários micro-organismos endofíticos ainda não descobertos ou descritos (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Considerando a imensa diversidade da flora brasileira, há uma grande fonte desses fungos e, conseqüentemente de estruturas químicas únicas, ainda inexploradas. Sendo assim, é importante compreender os métodos usados para otimizar a busca por novos micro-organismos endofíticos produtores de compostos bioativos (STROBEL; DAISY; CASTILLO, 2005). Uma vez que o número de espécies de plantas no mundo é tão grande, estratégias devem ser utilizadas para otimizar a busca por endófitos.

Segundo Kusari e colaboradores (2014), os metabólitos secundários produzidos por endófitos estão relacionados a seu respectivo nicho ecológico e as interações metabólicas podem aumentar a síntese dessas substâncias. Sendo assim, plantas de habitat único, endêmicas e com histórico etnobotânico são fontes potenciais de endófitos produtores de novas moléculas (STROBEL; DAISY, 2003), bem como aqueles micro-organismos provenientes de nichos que requeiram alta atividade metabólica, isso porque, condições ambientais extremas tendem a induzir novas estratégias de sobrevivência, levando a produção de compostos diversos (RAVINDRAN et al., 2012; STROBEL et al., 2004), o que pode conduzir a descoberta de uma substância química inovadora. Observando essas considerações, os mangues tornam-se cenários ecológicos atrativos para a pesquisa de novas moléculas.

Os manguezais são ecossistemas tropicais e subtropicais situados em regiões de transição entre o ambiente terrestre e marinho, apresentam alta diversidade e riqueza de espécies e são altamente produtivos (DAS; LYLE; KHAN, 2006; HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). São caracterizados pelas inundações periódicas das marés, o que torna os fatores ambientais, como salinidade e disponibilidade de nutrientes altamente variáveis, resultando em características únicas e específicas (THATOI et al., 2012). Além disso, apresentam árvores com raízes aéreas, altas temperaturas, ventos fortes, solo lodoso e com baixos teores de oxigênio (FIGURA 2). Sendo assim, as diversas espécies vegetais e micro-organismos encontrados nesse ambiente, apresentam adaptações morfológica, fisiológica, biológica e ecológica para

sobreviverem neste ambiente tão inóspito (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; SEBASTIANES et al., 2013b; WALTERS et al., 2008). Essas adaptações resultam em constante inovação química, porque nesse tipo de ecossistema a corrida evolutiva para sobreviver é mais ativa, pois a competição é grande, os recursos são limitados e a pressão de seleção está em seu ponto máximo (RAVINDRAN et al., 2012; STROBEL; DAISY, 2003; XU, 2015).



Figura 2 - Manguezal de Bertioga, São Paulo.

Fonte: SEBASTIANES, 2010a.

Nota: Retirada de <www.esalq.usp.br>.

Os mangues apresentam uma enorme diversidade fúngica, influenciada tanto pela idade do mangue quanto pelas suas características peculiares, sendo que estes micro-organismos desempenham importante papel na manutenção desse ecossistema (THATOI; BEHERA; MISHRA, 2013). As aplicações práticas de endófitos de mangues são múltiplas, desde potenciais agentes de controle biológico até fontes de metabólitos que são utilizados em indústrias farmacêuticas na produção de antibióticos, antidiabéticos, anti-inflamatórios, antivirais, antitumorais, antioxidantes e imunossupressores (CAI et al., 2017; DEBBAB; ALY; PROKSCH, 2013; DEZAM et al., 2017; EL-GENDY; EL-BONDKLY, YAHYA, 2014; MAROLDI et al., 2018; SEBASTIANES et al., 2017; WANG et al., 2015, 2013).

Os manguezais cobrem, aproximadamente 60 – 70% da costa tropical e subtropical do planeta, tendo Brasil, Indonésia e Austrália a maior abundância desse tipo de ecossistema (GIRI et al., 2011), entretanto, o conhecimento da diversidade microbiana de manguezais ainda é muito limitado. Diante da imensa biodiversidade desse ecossistema e de sua contínua

degradação, é de extrema importância o estudo do potencial biotecnológico dos microorganismos que habitam os manguezais.

2.4 Fungo endofítico *Gibberella moniliformis*

Gibberella moniliformis é um fungo endofítico pertencente ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes (SEBASTIANES, 2010b). *G. moniliformis* é uma designação atribuída a fase teleomorfa (fase sexuada) do fungo, sendo a fase anamorfa (assexuada) atribuída a *Fusarium verticillioides* (JURGENSON; ZELLER; LESLIE, 2002).

Fungos do gênero *Fusarium* têm sido isolados como endofíticos de vários hospedeiros (BRITZ et al., 2002; ELAVARASI; RATHNA; KALAISELVAM, 2012; LODGE; FISHER; SUTTON, 1996; SHWETA et al., 2010), sendo descrito como um dos gêneros de fungos endofíticos mais frequentemente isolados em mangues (CHENG et al., 2009; SEBASTIANES et al., 2013b). Algumas espécies desse gênero são utilizadas para obtenção de compostos antitumorais (SHWETA et al., 2010), de hormônios de plantas, como giberelinas (TSAVKELOVA et al., 2008), bem como agentes de controle biológico (BENHAMOU; GARAND; GOULET, 2002).

Carvalho (2016) estudou os produtos da fermentação do fungo endofítico *G. moniliformis* 99(3) e a partir da fração extraída com acetato de etila o autor identificou um alcaloide piridínico denominado ácido fusárico, o qual apresentou amplo espectro de ação antimicrobiana, além de atividade antiproliferativa contra linhagens tumorais de câncer de mama e melanoma. Neste mesmo estudo foi realizado um ensaio preliminar com a fração extraída com *n*-butanol e a mesma apresentou forte potencial antifúngico, instigando a continuidade de estudos mais aprofundados a respeito dos compostos presentes nesta fração e de suas possíveis atividades biológicas.

2.5 Atividades biológicas dos fungos endofíticos

A atividade biológica de compostos produzidos por fungos endofíticos tem sido amplamente discutida na literatura sendo relatado enorme potencial antimicrobiano, antioxidante, antiproliferativo, antiviral, antiparasitário, dentre outros (ALY et al., 2010; CARVALHO et al., 2016; DEBBAB; ALY; PROKSCH, 2011; NISA et al., 2015). O relato dessas atividades biológicas tem sido frequente também para compostos provenientes de endofitos de manguezais, como descrito nas revisões de Kumaresan (2017), Thatoi, Behera e Mishra (2013) e Xu (2015).

2.5.1 Atividade Antimicrobiana

Antibióticos são definidos como substâncias naturais produzidas por micro-organismos que, em baixas concentrações, são ativas contra outros micro-organismos (DEMAIN, 1981). No entanto, devido ao uso incorreto e indiscriminado de antibióticos, a resistência microbiana se tornou uma ameaça global à saúde pública e está se espalhando mais rapidamente do que a introdução de novos compostos na prática clínica (LING et al., 2015). Com isso, tem sido constatado grande avanço nas pesquisas de compostos naturais com atividade antimicrobiana (NEWMAN; CRAGG, 2016; WRIGHT, 2017).

Os fungos endofíticos têm sido reportados na literatura por diversos autores como fontes alternativas para a obtenção de compostos antimicrobianos (BUATONG et al., 2011; GOUDA et al., 2016; GUO et al., 2008; MADHUSUDHAN; BHARATHI; PRAKASH, 2015). Deshmukh e colaboradores (2015) publicaram uma revisão na qual listam mais de 100 compostos produzidos por diferentes fungos endofíticos que possuem ação antimicrobiana, incluindo atividades contra *Mycobacterium tuberculosis* e *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA).

Estudando o fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum* isolado de *Laguncularia racemosa*, uma espécie arbórea proveniente do mangue brasileiro, Sebastianes et al. (2012b) identificaram o ácido 3-hidroxi propiônico (3-APA) que apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Salmonella typhi*. Song e colaboradores (2015), durante o rastreamento dos metabólitos antimicrobianos do endófito *Penicillium* sp., isolado de planta de mangue, identificaram um novo glicosídeo, o qual apresentou atividade antifúngica contra *Candida* sp. com potencial comparável à anfotericina B e superior ao fluconazol. Um estudo conduzido por Buatong et al. (2011) testou extratos brutos de 150 fungos endofíticos isolados de espécies vegetais de mangues do sul da Tailândia, dos quais 92 produziram compostos com atividade antimicrobiana.

2.5.2 Atividade Antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos de maneira geral como qualquer substância que atrasa, previne ou repara os danos oxidativos a uma molécula (MOON; SHIBAMOTO, 2009). A oxidação constitui parte fundamental da vida aeróbica, entretanto resulta na produção de radicais livres, moléculas muito instáveis e altamente reativas como as espécies reativas de oxigênio (ERO) (GÜLÇIN, 2012).

A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico essencial para os processos metabólicos e o excesso deles tende a ser combatido por antioxidantes produzidos

pelo próprio organismo ou absorvidos da dieta. No entanto, além da produção fisiológica, fatores como poluição ambiental, radiação ultravioleta, tabagismo e estresse aumentam significativamente o nível de ERO no corpo humano, o que pode gerar um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e o combate pelos antioxidantes, resultando num processo denominado estresse oxidativo (PRIOR, 2015). O estresse oxidativo está associado a uma série de doenças como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos e envelhecimento (FIRUZI et al., 2011; PRIOR, 2015); sendo a terapia com antioxidante uma abordagem para prevenir ou atenuar doenças associadas a ele (PRIOR, 2015; YE et al., 2013).

Antioxidantes são comumente encontrados em plantas medicinais, frutas e vegetais. No entanto, alguns estudos têm relatado a produção de substâncias antioxidantes por fungos endofíticos (CUI et al., 2015; HAMILTON et al., 2012; RAVINDRAN et al., 2012). Atiphasaworn e colaboradores (2017) evidenciaram a atividade antioxidante de endófitos isolados de folhas de *Ocimum basilicum var. thyrsoiflor*, sendo que *Nigospora* sp. se destacou por apresentar atividade comparável ao padrão ácido gálico. Dois compostos, pestacina e isopestacina, foram obtidos a partir do fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora* e ambos apresentaram propriedades antifúngica e antioxidante, sendo que a pestacina apresentou uma atividade antioxidante onze vezes maior que a vitamina E (HARPER et al., 2003; STROBEL et al., 2002). Chen et al. (2011) caracterizaram a estrutura e avaliaram o potencial antioxidante do exopolissacarídeo As1-1 produzido por *Aspergillus* sp. Y16, um fungo endofítico isolado de uma planta de mangue. A investigação demonstrou que As1-1 possui uma potente atividade antioxidante, sendo maior que a dos polissacarídeos produzidos por outros micro-organismos marinhos, apresentando potencial para uso como suplemento alimentar.

2.5.3 Atividade Antiproliferativa

O câncer é um grupo de doenças caracterizado pelo crescimento desregulado e pela proliferação de células anormais e invasão do tecido normal (KHARWAR et al., 2011). Devido ao alto índice de morbidade e mortalidade, o câncer tem se tornado um problema de saúde pública (ZHANG et al., 2010). Além disso, grande parte dos fármacos antitumorais utilizados atualmente se mostram inespecíficos, apresentam muitos efeitos colaterais e não são eficazes contra muitas linhagens de câncer (GANGADEVI; MUTHUMARY, 2008; PASUT; VERONESE, 2009), o que torna fundamental a pesquisa por novos agentes antiproliferativos.

A descoberta de que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* era capaz de produzir o antitumoral Taxol® (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993), que até então era obtido apenas pela exploração da planta *Taxus brevifolia* (WANI et al., 1971), estimulou o interesse de

pesquisadores por metabólitos de fungos endofíticos como fonte alternativa para obtenção de compostos com ação antiproliferativa (KHARWAR et al., 2011). Kharwar et al. (2011) realizaram um levantamento de agentes antiproliferativos isolados de fungos endofíticos entre 1990 e 2010 e relataram 100 compostos antitumorais pertencentes a 19 classes químicas diferentes com atividade contra 45 linhagens celulares distintas os quais foram isolados de mais de 50 fungos endofíticos diferentes.

Elavarasi e colaboradores (2012) identificaram o fungo endofítico *Fusarium oxysporum*, isolado de *Rhizophora annamalayana* de um mangue indiano, como produtor de Taxol® (paclitaxel), o potente agente antitumoral que já movimentou bilhões de dólares, sugerindo que os endófitos sejam uma alternativa à extração predatória de *T. brevifolia*, bem como de outras plantas (VENUGOPALAN; SRIVASTAVA, 2015). Zhang et al. (2010), descreveram a atividade antitumoral de 14 derivados de antracenediona produzidos pelos fungos endofíticos *Halorosellinia* sp. e *Guignardia* sp., provenientes de um mangue. Alguns deles inibiram fortemente o crescimento de células KB e KBv200, linhagens celulares de carcinoma epidermóide humano, entre os quais, um composto exibiu forte toxicidade para as mesmas linhagens, encorajando mais esforços para a obtenção de possíveis candidatos para o desenvolvimento de agentes antiproliferativos provenientes de mangues.

2.5.4 Atividade Leishmanicida

Leishmaniose é uma doença infecciosa negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania* (TORRES-GUERRERO et al., 2017). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, são identificados todos os anos aproximadamente 1,3 milhão de casos de diferentes formas clínicas da doença (WHO, 2016).

Atualmente, não existe uma vacina eficaz contra a leishmaniose e além disso, apesar das drogas disponíveis, a leishmaniose enfrenta o desafio das preocupações de resistência, toxicidade e baixa eficiência com os fármacos atuais (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). Sendo assim, existe uma necessidade crescente de drogas novas e mais eficazes para substituir ou complementar aquelas em uso na prática clínica. A urgência por novos tratamentos para leishmaniose levou a um programa de seleção de produtos naturais contra a doença (SOOSARAEI et al., 2017) e os fungos endofíticos têm sido relatados por produzirem compostos com atividade leishmanicida (BRISSOW et al., 2017; CAMPOS et al., 2015; ELKHAYAT et al., 2016).

Nascimento e colaboradores (2015) isolaram 16 espécies de endófitos das folhas de *Vernonia polyanthes*, dos quais três apresentaram atividade significativa contra formas

promastigotas de *L. amazonensis*. Os autores continuaram os estudos com o isolado que apresentou a melhor atividade, o qual foi identificado como *Cochliobolus sativus* P2-F3, e os compostos cochlioquinona A, isocochlioquinona A e anidrocochlioquinona A foram isolados do extrato produzido pelo endófito e demonstraram inibir os parasitas.

Martínez-Luis et al. (2012) isolaram cinco compostos (pseurotina A, 14-norpseurotina A, FD-838, pseurotina D e fumoquinona B) a partir do extrato produzido pelo fungo endofítico *Aspergillus* sp. F1544, e todos eles apresentaram forte atividade contra *L. donovani*, mostrando que os metabólitos deste endófito podem ser promissores para o desenvolvimento de drogas contra leishmaniose.

3 OBJETIVOS

Os objetivos traçados para o estudo são descritos a seguir.

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a composição química e a atividade biológica da fração butanólica do extrato da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) associado à *Laguncularia racemosa* proveniente do mangue brasileiro.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Obter o extrato fúngico e a respectiva fração butanólica a partir da fermentação de *G. moniliformis* 99(3);
- b) Realizar a caracterização química da fração butanólica;
- c) Avaliar a fração butanólica em relação as atividades:
 - Antimicrobiana;
 - Antioxidante;
 - Antiproliferativa e
 - Leishmanicida.
- d) Avaliar o efeito da associação da fração butanólica com antimicrobianos comerciais.
- e) Avaliar a citotoxicidade da fração butanólica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para o cumprimento dos objetivos propostos foram utilizados os materiais e métodos descritos a seguir.

4.1 Fungo endofítico estudado

Para a condução dos estudos foi utilizado o fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) isolado da folha de *Laguncularia racemosa* coletado em Bertioga/SP, Brasil (SEBASTIANES, 2010b). O isolado foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Paulo Teixeira Lacava e encontra-se armazenado na coleção do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LAMIB) do Departamento de Morfologia e Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O isolado também se encontra estocado no Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL - MG) em água estéril (CASTELLANI, 1939) e em 90% de glicerol.

4.2 Processo de fermentação e obtenção do extrato fúngico

Este estudo foi realizado nos laboratórios de Bioprocessos e Multidisciplinar I da UNIFAL - MG. Para obtenção dos metabólitos secundários do fungo endofítico *G. moniliformis* 99(3) foram usadas as orientações metodológicas descritas por Carvalho et al. (2012).

O isolado foi cultivado em meio de cultura ABD (ágar batata-dextrose) por sete dias a temperatura de 28°C. Posteriormente, foram cortados oito discos (5 mm) de micélio das culturas em ABD e inoculados em cinco Erlenmeyers de 1000 mL, contendo 250 mL de caldo Czapek [Glicose: 30,0 g; NaNO₃: 2,0 g; K₂HPO₄: 1,0 g; MgSO₄.7H₂O: 0,5 g; KCl: 0,5 g; FeSO₄.7H₂O: 0,01 g; extrato de levedura: 1,0 g; água destilada: q.s.p. 1000 mL] (RAPER; FENNELL, 1965), que foram incubados a 28°C por 20 dias em condições estáticas e na ausência de luz.

Após o período de fermentação, foi realizada filtração à vácuo do caldo fermentado para a retirada do micélio fúngico e, posteriormente, o filtrado foi submetido a extração líquido-líquido utilizando-se solventes de polaridades crescentes, sendo hexano, acetato de etila e *n*-butanol. Ao final, as frações acetato de etila (F_{AcOEt}) e butanólica (F_{BuOH}) foram concentradas em rotaevaporador à vácuo e concentrador SpeedVac, respectivamente).

A partir da fração F_{BuOH} (401,4 mg) foram conduzidos os ensaios de caracterização química e avaliação das atividades biológicas.

4.3 Caracterização química

Para a caracterização química da fração FBuOH foram utilizadas diferentes técnicas, as quais seguem descritas abaixo.

4.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A fração FBuOH obtida a partir da fermentação do fungo endofítico *G. moniliformis* 99(3) foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD) com diferentes sistemas de solventes e reveladores com a finalidade de avaliar os compostos presentes na amostra em estudo.

Para as análises qualitativas em CCD foram usadas cromatofolhas de Sílica-gel 60 sobre alumínio com indicador de ultravioleta F₂₅₄ (7 x 3 cm). Diferentes misturas de eluentes foram testadas como fase móvel, sendo a fase orgânica da mistura quartenária de clorofórmio/metanol/n-Propanol/água (5:6:1:4) a que melhor separou os compostos presente na fração FBuOH.

As placas cromatográficas foram reveladas sob inspeção por luz ultravioleta (UV) em 254 nm, além de serem usados os seguintes reveladores químicos: ninhidrina, anisaldeído sulfúrico, reagente Dragendorff e DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hidrazila).

4.3.2 *High Performance Liquid Chromatography – Diode Array detector* (HPLC-DAD)

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Severino Matias Alencar no Departamento de Agro-Indústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ – USP, Piracicaba/SP.

A fração FBuOH foi analisada por HPLC-DAD visando avaliar o perfil químico da amostra. Uma alíquota de 15 µL da fração diluída em etanol grau HPLC a 0,05% foi injetada em uma coluna de fase reversa Agilent Zorbax C-18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel utilizada foi água/ácido acético (99,5/0,5; v/v) (solvente A) e metanol (100%) (solvente B), com vazão constante de 1,0 mL/min. O gradiente iniciou com 95% do solvente B até 5 minutos; alterando para 100% de B, e permaneceu nesta concentração até 40 minutos, retornando para 95% de B em 50 minutos. O tempo total de corrida foi de 55 minutos. A coluna foi mantida a uma temperatura constante de 30°C. Foi utilizado um detector de arranjo de diodos (SPD-M10AVp, Shimadzu Co) e os cromatogramas foram processados utilizando o *software* Class-vp.

4.3.3 Determinação quantitativa de compostos fenólicos

Este ensaio foi realizado em colaboração com o Prof. Dr. Severino Matias Alencar no Departamento de Agro-Indústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ – USP, Piracicaba/SP.

A quantificação de compostos fenólicos totais da fração FBUOH foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), com modificações. Uma curva de calibração com o padrão ácido gálico foi preparada em diferentes concentrações (20 a 120 µg/mL). A amostra foi preparada solubilizando a fração FBUOH em álcool etílico absoluto na concentração de 30 mg/mL e, posteriormente, a mesma foi diluída em água destilada em diferentes proporções. Como controle negativo, a amostra foi substituída por igual volume de álcool etílico absoluto e para o branco utilizou-se álcool etílico e água destilada. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, a qual foram adicionados 20 µL/poço da amostra, do padrão ou do controle, 100 µL/poço da solução de Folin Ciocalteu 10% e, após 5 minutos, 75 µL/poço de solução de carbonato de sódio 7,5%. A placa foi inserida na leitora de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices) para agitação e posteriormente retirada e mantida por 40 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz para que ocorresse a reação. Após o período de incubação, a leitura foi realizada a 740 nm na leitora supracitada. O resultado foi dado como uma média das medidas em triplicata e foi expresso em equivalentes de ácido gálico (mg de GAE/g de fração).

4.4 Avaliação das Atividades Biológicas

Para avaliar o potencial biológico da fração FBUOH, a mesma foi submetida a ensaios de atividades antimicrobiana, antioxidante, antiproliferativa e leishmanicida, além dos ensaios de sinergismo e citotoxicidade. Estes experimentos seguem descritos abaixo.

4.4.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

Este ensaio foi realizado por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM) das frações FAcOET e FBUOH frente aos micro-organismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231, sendo adotados os procedimentos descritos nos documentos M07-A10 (CLSI, 2015) para as bactérias e M27-A3 (CLSI, 2008) para a levedura, com algumas modificações.

Os inóculos foram preparados transferindo-se culturas de 24 horas dos micro-organismos citados, que se encontravam em caldo Mueller Hinton (CMH) no caso das bactérias

e em caldo Sabouraud (CSab) no caso da levedura, para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina 0,9% esterilizada, gerando uma suspensão que foi padronizada em espectrofotômetro a 75% transmitância/660 nm correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Foi, então, transferido 1 mL de cada suspensão para 9 mL de solução salina 0,9%, da qual foram retirados 2 mL e transferidos para 10 mL de CMH ou CSab. A amostra foi preparada solubilizando 1 mg da fração FBUOH em 125 μ L de álcool etílico absoluto, sendo a concentração final de 8 mg/mL.

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) das frações FAcOEt e FBUOH utilizou-se microplacas de 96 poços, na qual foram adicionados 100 μ L/poço de meio CMH ou CSab. Posteriormente, 20 μ L das amostras e 80 μ L de meio foram adicionados ao primeiro poço. A diluição das frações na microplaca começou a partir da transferência de 100 μ L do primeiro poço para os poços consecutivos até o último poço, onde 100 μ L foram desprezados para que todos os poços contivessem 100 μ L. Após a diluição, 80 μ L de meio CMH ou CSab e 20 μ L do inóculo previamente preparado foram transferidos para todos os poços, exceto para os poços de controle do meio. O volume final em cada poço foi de 200 μ L e a maior concentração testada, no 1º poço da diluição seriada, foi de 400 μ g/mL.

Alguns poços da placa foram utilizados para controles do crescimento do inóculo, de esterilidade do meio de cultura, do solvente utilizado na solubilização da amostra e de sensibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos padrões. Nos poços para controle de crescimento dos micro-organismos avaliados foram adicionados 180 μ L de meio CMH ou CSab e 20 μ L do inóculo previamente preparado. Nos poços de controle de esterilidade foram adicionados apenas 200 μ L de meio CMH ou CSab. Nos poços de controle do solvente foram adicionados 20 μ L de álcool etílico absoluto no lugar da amostra. Nos poços referentes ao controle de sensibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos foram adicionados ao 1º poço 200 μ L da solução antimicrobiana e nos demais poços, 100 μ L de meio CMH ou CSab para diluição seriada, como realizado com as amostras, sendo utilizado os fármacos amoxicilina (para *S. aureus*), estreptomicina (para *E. coli*) e nistatina (para *C. albicans*).

As microplacas foram seladas com plástico filme e incubadas a 37°C por 22-24 horas. Posteriormente foram adicionados 40 μ L/poço do revelador resazurina 0,2%, e a leitura realizada após 2 horas. Este revelador consiste em um corante indicador de viabilidade celular de cor inicialmente azul. Após a incubação das microplacas, a permanência de coloração azul é indicativa de amostra com ação bacteriostática/fungistática frente ao micro-organismo testado. Coloração púrpura, rosa ou incolor, evidenciam resistência do micro-organismo ao

extrato em estudo (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007). O ensaio foi conduzido em triplicata.

Após a determinação de CIM, para determinar a concentração microbicida mínima (CMM), alíquotas de 25 µL foram retiradas dos poços que apresentaram coloração azul e do primeiro poço que apresentou coloração rosa/púrpura e aplicadas sobre a superfície de placas contendo ágar Mueller Hinton (para bactérias) ou ágar Sabouraud (para levedura). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente a leitura foi realizada.

A concentração em que houve crescimento sobre a placa indicou que as frações não exerceram ação microbicida, enquanto a concentração com ausência de crescimento foi indicativa da ação bactericida ou fungicida sobre o micro-organismo testado.

4.4.2 Avaliação do potencial sinérgico

Para avaliar se a combinação da fração FBUOH com agentes antifúngicos comerciais produz ação sinérgica foi utilizado o método de microdiluição *Checkerboard*, descrito por White et al. (1996), com modificações.

Após a determinação da CIM da amostra e da CIM do antifúngico para o micro-organismo teste (*C. albicans*), foram realizadas diluições em série associando a fração FBUOH com o agente antimicrobiano e a suspensão microbiana. Foram testadas combinações de diferentes concentrações da fração FBUOH com os antifúngicos fluconazol, anfotericina B e nistatina, conforme esquemas metodológicos apresentados nas Figuras 3 e 4.

Teste de <i>Checkerboard</i> com <i>Candida albicans</i>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Fr 100 Flu 64 Anf 4	Fr 100 Flu 64 Anf 4	Fr 100 Flu 32 Anf 2	Fr 100 Flu 32 Anf 2	Fr 100 Flu 16 Anf 1	Fr 100 Flu 16 Anf 1	Fr 100 Flu 8 Anf 0,5	Fr 100 Flu 8 Anf 0,5	CIM _{Fr} 400	CIM _{Ant} Flu 128 Anf 64	CTRL mcg	CTRL meio
B	Fr 50 Flu 64 Anf 4	Fr 50 Flu 64 Anf 4	Fr 50 Flu 32 Anf 2	Fr 50 Flu 32 Anf 2	Fr 50 Flu 16 Anf 1	Fr 50 Flu 16 Anf 1	Fr 50 Flu 8 Anf 0,5	Fr 50 Flu 8 Anf 0,5	CIM _{Fr} 200	CIM _{Ant} Flu 64 Anf 32	CTRL mcg	CTRL meio
C	Fr 25 Flu 64 Anf 4	Fr 25 Flu 64 Anf 4	Fr 25 Flu 32 Anf 2	Fr 25 Flu 32 Anf 2	Fr 25 Flu 16 Anf 1	Fr 25 Flu 16 Anf 1	Fr 25 Flu 8 Anf 0,5	Fr 25 Flu 8 Anf 0,5	CIM _{Fr} 100	CIM _{Ant} Flu 32 Anf 16	CTRL mcg	CTRL meio
D	Fr 12,5 Flu 64 Anf 4	Fr 12,5 Flu 64 Anf 4	Fr 12,5 Flu 32 Anf 2	Fr 12,5 Flu 32 Anf 2	Fr 12,5 Flu 16 Anf 1	Fr 12,5 Flu 16 Anf 1	Fr 12,5 Flu 8 Anf 0,5	Fr 12,5 Flu 8 Anf 0,5	CIM _{Fr} 50	CIM _{Ant} Flu 16 Anf 8	CTRL mcg	CTRL meio
E	Fr 6,25 Flu 64 Anf 4	Fr 6,25 Flu 64 Anf 4	Fr 6,25 Flu 32 Anf 2	Fr 6,25 Flu 32 Anf 2	Fr 6,25 Flu 16 Anf 1	Fr 6,25 Flu 16 Anf 1	Fr 6,25 Flu 8 Anf 0,5	Fr 6,25 Flu 8 Anf 0,5	CIM _{Fr} 25	CIM _{Ant} Flu 8 Anf 4	CTRL mcg	CTRL meio
F	Fr 3,12 Flu 64 Anf 4	Fr 3,12 Flu 64 Anf 4	Fr 3,12 Flu 32 Anf 2	Fr 3,12 Flu 32 Anf 2	Fr 3,12 Flu 16 Anf 1	Fr 3,12 Flu 16 Anf 1	Fr 3,12 Flu 8 Anf 0,5	Fr 3,12 Flu 8 Anf 0,5	CIM _{Fr} 12,5	CIM _{Ant} Flu 4 Anf 2	CTRL mcg	CTRL meio
G	Fr 1,56 Flu 64 Anf 4	Fr 1,56 Flu 64 Anf 4	Fr 1,56 Flu 32 Anf 2	Fr 1,56 Flu 32 Anf 2	Fr 1,56 Flu 16 Anf 1	Fr 1,56 Flu 16 Anf 1	Fr 1,56 Flu 8 Anf 0,5	Fr 1,56 Flu 8 Anf 0,5	CIM _{Fr} 6,25	CIM _{Ant} Flu 2 Anf 1	CTRL mcg	CTRL meio
H	Fr 0,78 Flu 64 Anf 4	Fr 0,78 Flu 64 Anf 4	Fr 0,78 Flu 32 Anf 2	Fr 0,78 Flu 32 Anf 2	Fr 0,78 Flu 16 Anf 1	Fr 0,78 Flu 16 Anf 1	Fr 0,78 Flu 8 Anf 0,5	Fr 0,78 Flu 8 Anf 0,5	CIM _{Fr} 3,12	CIM _{Ant} Flu 1 Anf 0,5	CTRL mcg	CTRL meio

Figura 3 - Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com a fração FBUOH associada com os antifúngicos comerciais fluconazol e anfotericina B e o micro-organismo *Candida albicans* ATCC 10231.

Nota: Os antifúngicos foram testados isoladamente. Fr: fração butanólica; Flu: fluconazol; Anf: anfotericina B; Ant: antifúngico; CIM: concentração inibitória mínima; CTRL mcg: controle de crescimento do micro-organismo teste; CTRL meio: controle de esterilidade do meio de cultura.

Fonte: Da autora.

Teste de <i>Checkerboard</i> com <i>Candida albicans</i>												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Fr 100 Nis 1	Fr 100 Nis 1	Fr 100 Nis 1	Fr 100 Nis 0,5	Fr 100 Nis 0,5	Fr 100 Nis 0,5	Fr 100 Nis 0,25	Fr 100 Nis 0,25	Fr 100 Nis 0,25	CIM _{Fr} 400	CIM _{Nis} 64	CTRL mcg
B	Fr 50 Nis 1	Fr 50 Nis 1	Fr 50 Nis 1	Fr 50 Nis 0,5	Fr 50 Nis 0,5	Fr 50 Nis 0,5	Fr 50 Nis 0,25	Fr 50 Nis 0,25	Fr 50 Nis 0,25	CIM _{Fr} 200	CIM _{Nis} 32	CTRL mcg
C	Fr 25 Nis 1	Fr 25 Nis 1	Fr 25 Nis 1	Fr 25 Nis 0,5	Fr 25 Nis 0,5	Fr 25 Nis 0,5	Fr 25 Nis 0,25	Fr 25 Nis 0,25	Fr 25 Nis 0,25	CIM _{Fr} 100	CIM _{Nis} 16	CTRL mcg
D	Fr 12,5 Nis 1	Fr 12,5 Nis 1	Fr 12,5 Nis 1	Fr 12,5 Nis 0,5	Fr 12,5 Nis 0,5	Fr 12,5 Nis 0,5	Fr 12,5 Nis 0,25	Fr 12,5 Nis 0,25	Fr 12,5 Nis 0,25	CIM _{Fr} 50	CIM _{Nis} 8	CTRL mcg
E	Fr 6,25 Nis 1	Fr 6,25 Nis 1	Fr 6,25 Nis 1	Fr 6,25 Nis 0,5	Fr 6,25 Nis 0,5	Fr 6,25 Nis 0,5	Fr 6,25 Nis 0,25	Fr 6,25 Nis 0,25	Fr 6,25 Nis 0,25	CIM _{Fr} 25	CIM _{Nis} 4	CTRL meio
F	Fr 3,12 Nis 1	Fr 3,12 Nis 1	Fr 3,12 Nis 1	Fr 3,12 Nis 0,5	Fr 3,12 Nis 0,5	Fr 3,12 Nis 0,5	Fr 3,12 Nis 0,25	Fr 3,12 Nis 0,25	Fr 3,12 Nis 0,25	CIM _{Fr} 12,5	CIM _{Nis} 2	CTRL meio
G	Fr 1,56 Nis 1	Fr 1,56 Nis 1	Fr 1,56 Nis 1	Fr 1,56 Nis 0,5	Fr 1,56 Nis 0,5	Fr 1,56 Nis 0,5	Fr 1,56 Nis 0,25	Fr 1,56 Nis 0,25	Fr 1,56 Nis 0,25	CIM _{Fr} 6,25	CIM _{Nis} 1	CTRL meio
H	Fr 0,78 Nis 1	Fr 0,78 Nis 1	Fr 0,78 Nis 1	Fr 0,78 Nis 0,5	Fr 0,78 Nis 0,5	Fr 0,78 Nis 0,5	Fr 0,78 Nis 0,25	Fr 0,78 Nis 0,25	Fr 0,78 Nis 0,25	CIM _{Fr} 3,12	CIM _{Nis} 0,5	CTRL meio

Figura 4 - Esquema metodológico desenvolvido para o ensaio sinérgico com a fração FBUOH associada com antifúngico comercial nistatina e o micro-organismo *Candida albicans* ATCC 10231.

Nota: Fr: fração butanólica; Nis: nistatina; CIM: concentração inibitória mínima; CTRL mcg: controle de crescimento do micro-organismo teste; CTRL meio: controle de esterilidade do meio de cultura.

Fonte: Da autora.

O efeito das combinações foi obtido a partir do cálculo da concentração inibitória fracionária (CIF) da amostra e do antimicrobiano nas concentrações utilizadas de acordo com as equações 1, 2 e 3 a seguir:

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_F + \text{CIF}_A \quad (\text{Equação 1})$$

$$\text{CIF}_F \text{ (concentração inibitória fracionária da fração)} = \frac{\text{CIM da fração com o antimicrobiano}}{\text{CIM da fração sozinha}} \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{CIF}_A \text{ (concentração inibitória fracionária do antimicrobiano)} = \frac{\text{CIM do antimicrobiano com a fração}}{\text{CIM do antimicrobiano sozinho}} \quad (\text{Equação 3})$$

Os índices obtidos foram interpretados como sinérgico ($\text{ICIF} \leq 0,5$); parcialmente sinérgico ($0,5 < \text{ICIF} < 1,0$), indiferente ($1,0 \leq \text{ICIF} < 4,0$) e antagônico ($\text{ICIF} \geq 4,0$) de acordo com Timurkaynak et al. (2006).

4.4.3 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante da fração FBUOH foi avaliada por diferentes ensaios, os quais foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Severino Matias Alencar no Departamento de Agro-Indústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ – USP, Piracicaba/SP.

4.4.3.1 Sequestro do radical livre DPPH^{*}

Este método de quantificação de antioxidantes é baseado no princípio do DPPH^{*} (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), um radical estável de coloração púrpura/violeta, ser reduzido a um composto de coloração amarela (difenil-picril-hidrazina) quando recebe a doação de hidrogênio ou elétron advindos de um composto antioxidante. O DPPH^{*} apresenta absorção máxima na faixa de 515-529 nm e sua redução é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação com um composto antirradicalar (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

O teste foi realizado segundo a metodologia descrita por Brand-Williams; Cuvelier; Bersset (1995), com modificações. A amostra foi testada em diferentes diluições feitas em álcool etílico a partir de uma solução etanólica preparada com a fração FBUOH na concentração de 7,5 mg/mL. A solução de DPPH^{*} foi preparada com álcool etílico absoluto. Para fins de comparação com a atividade antioxidante do extrato fúngico, foi preparada uma curva analítica em diferentes concentrações (20 a 160 μM) do padrão Trolox, um antioxidante sintético análogo a vitamina E. O controle negativo foi feito substituindo-se o volume da amostra por

igual volume de álcool etílico absoluto e para o branco utilizou-se apenas álcool etílico absoluto. Em tubos de ensaio foram adicionados 500 µL da amostra ou da curva padrão, 300 µL de DPPH[•] e 3 mL de etanol. Os tubos foram agitados e mantidos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 45 minutos para que ocorresse a reação e posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 515 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. O resultado foi expresso em equivalentes ao Trolox (µmol de Trolox/g de fração) e em porcentagem de atividade antioxidante (AA%), calculada pela equação: $AA\% = [(A-B)/A] \times 100$, onde A e B são as absorbâncias do controle negativo e da amostra, respectivamente.

4.4.3.2 Sequestro do radical livre ABTS^{•+}

A avaliação da atividade antioxidante pelo método ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] fundamenta-se na geração do radical ABTS^{•+}, de cor azul esverdeado, por meio da reação com o persulfato de potássio. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do ABTS^{•+} a ABTS, promovendo a perda da cor do meio reacional. Com a extensão da perda de cor, a redução do ABTS^{•+} é determinada em função do Trolox, padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante (RE et al., 1999).

Este ensaio foi realizado conforme metodologia descrita por Al-Duais et al. (2009), com algumas modificações. A amostra foi preparada solubilizando a fração FBUOH em álcool etílico absoluto a uma concentração de 30 mg/mL e, posteriormente, a mesma foi diluída em tampão fosfato de potássio em diferentes proporções para análise. Utilizou-se o padrão Trolox e os pontos da curva analítica foram preparados a partir de diferentes concentrações do mesmo (12,5 a 200 µM) para posterior comparação com a atividade antioxidante do extrato fúngico. O controle negativo foi feito substituindo-se o volume da amostra por igual volume de álcool etílico absoluto. Para o branco utilizou-se apenas tampão fosfato. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços, sendo adicionados 20 µL/poço da amostra ou do padrão e 220 µL/poço de solução do radical ABTS^{•+} (produzido pela reação aquosa de ABTS a 7 mM com persulfato de potássio a 140 mM, armazenada em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 16 horas e ajustada na absorbância de $0,7 \pm 0,02$ antes do uso). A placa foi agitada na leitora de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices) e mantida ao abrigo da luz por 6 minutos para que ocorresse a reação. Posteriormente realizou-se a leitura a 734 nm na leitora supracitada. O teste foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em equivalentes ao Trolox (µmol de Trolox/g de fração).

4.4.3.3 Poder de redução do ferro (FRAP)

Este método é baseado na medida direta da habilidade de um antioxidante reduzir, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ), inicialmente de cor amarelo ferrugem, em Fe^{2+} /TPTZ, de intensa cor azul (BENZIE; STRAIN, 1996).

Para este ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Müller et al. (2010) com algumas modificações. A amostra foi preparada solubilizando a fração FBUOH em álcool etílico absoluto na concentração de 30 mg/mL e posteriormente diluída em água destilada em diferentes concentrações para análise. Como padrão foi utilizado uma solução de sulfato ferroso 2,5 mM, a partir da qual foi preparado os pontos da curva analítica em diferentes concentrações (100 a 700 μM). O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, através da mistura de 50 mL de tampão acetato de potássio (0,3M, pH 3,6), 5 mL de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 5 mL de cloreto férrico (20 mM) em solução aquosa. O controle negativo foi feito substituindo-se o volume da amostra por igual volume de álcool etílico absoluto. Para o branco utilizou-se água destilada no lugar da amostra. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, nos quais foram adicionados 20 μL /poço da amostra, do padrão, de água (branco) ou de álcool etílico absoluto (controle), 30 μL /poço de água destilada e 200 μL /poço do reagente FRAP. A placa foi inserida em equipamento para agitação e incubação a 37°C por 8 minutos e realizou-se a leitura a 595 nm na leitora de microplacas (SpectraMax-M3, Molecular Devices). O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos em equivalentes ao sulfato ferroso ($\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /g de fração).

4.4.3.4 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

Este ensaio mede a degradação oxidativa da molécula fluorescente “fluoresceína”, após ser misturada com geradores de radicais livres como o AAPH (dicloridrato de 2,2-azobis (2-amidino-propano)). O AAPH produz radicais peroxila por aquecimento, os quais oxidam a sonda fluorescente. Assim, a intensidade de fluorescência decresce com o processo oxidativo. Na presença de antioxidantes a taxa de oxidação da fluoresceína é retardada. Logo, quanto maior a atividade antioxidante, menor a oxidação e maior a fluorescência (CAO; ALESSIO; CUTLER, 1993).

O método ORAC utilizado foi uma adaptação ao descrito por Chisté et al. (2011). A amostra foi preparada solubilizando a fração FBUOH em álcool etílico absoluto na concentração de 30 mg/mL e posteriormente diluída em tampão fosfato de potássio em diferentes concentrações. Utilizou-se o padrão Trolox e os pontos da curva analítica foram preparados a

partir de diferentes concentrações (12,5 a 400 μM) do padrão para fins de comparação com a atividade antioxidante do extrato fúngico. O controle negativo foi feito substituindo-se o volume da amostra por igual volume de álcool etílico absoluto. Para o branco utilizou-se apenas tampão fosfato de potássio. O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços, nos quais foram adicionados 30 μL /poço da amostra, do padrão ou do controle, 60 μL /poço de fluoresceína (508,25 nM) e 110 μL /poço da solução de AAPH na concentração de 76 nM. A placa foi inserida na leitora (SpectraMax-M3, Molecular Devices) para agitação e incubação a 37°C, e a mesma foi programada para realizar a leitura a cada minuto durante duas horas, no comprimento de onda de emissão de 528 nm e excitação de 485 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

A proteção fornecida pela amostra ou padrão foi calculada usando a diferença entre a área sob a curva de decaimento de fluorescência na presença da amostra (AUC amostra) e na sua ausência (AUC branco). Por meio de equações de regressão e cálculos fornecidos pelo *software*, os resultados finais foram lançados na reta obtida pela curva analítica, sendo expressos em equivalentes ao Trolox (μmol de Trolox/g de fração).

4.4.3.5 Determinação da atividade antioxidante *on-line* por HPLC-ABTS^{•+}

Simultaneamente ao ensaio de HPLC-DAD (Ver seção 4.3.2), a fração FBuOH foi avaliada pelo método *on-line* para determinar a atividade antioxidante individual de cada um dos compostos separados na coluna de acordo com o método proposto por Koleva, Niederländer e Van Beek (2001), com modificações.

A análise da fração FBuOH quanto ao sequestro do radical livre ABTS^{•+} por HPLC-DAD *on-line* foi realizada utilizando a solução metanólica do radical livre ABTS^{•+} 7mM, ajustada para absorvância de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm, a qual foi preparada 16 horas antes do ensaio pela mistura da solução metanólica de 7 mM de ABTS (5mL) com solução de 140 mM (88 μL) de persulfato de potássio. Os eluatos separados por HPLC, conforme metodologia citada na seção 4.3.2, foram primeiramente detectados usando detector de arranjo de diodos (SPD-M10AVp, Shimadzu Co) e, após eluição da coluna, ocorreu a reação com o radical ABTS^{•+} no *coil* (15 m x 0,25 mm d.i. PEEK). A vazão do reagente ABTS foi de 0,8 mL/min e a perda de cor foi detectada por picos negativos à 734 nm, através de um detector UV (Shimadzu SPD-20AV).

4.4.4 Avaliação da atividade antiproliferativa

Este ensaio foi realizado com a colaboração da Prof. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) – Unicamp, Paulínia/SP.

A fração FBuOH foi avaliada quanto a sua atividade antiproliferativa em células humanas utilizando-se o ensaio da sulforodamina B (SRB) para avaliação do crescimento celular de acordo com Monks et al. (1991). Foram utilizadas dez linhagens de células tumorais humanas e uma linhagem de célula humana não tumoral (TABELA 1), gentilmente cedidas pelo *National Cancer Institute/EUA*. As células foram mantidas no laboratório de cultura de células do Centro de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola – CPQBA, em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e uma mistura de penicilina:estreptomicina (1000 UI/mL:1000 µg/mL), incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Tabela 1 - Linhagens celulares utilizadas na avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* da fração butanólica (FBuOH) obtida da fermentação do fungo endófito *Gibberella moniliformis* 99(3).

Linhagem	Órgão/Doença	Origem embrionária
U251	SNC; glioma	Ectoderme
UACC-62	Pele; melanoma	Ectoderme
MCF7	Mama; adenocarcinoma	Ectoderme
NCI-ADR/RES*	Ovário; adenocarcinoma	Ectoderme
786-0	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme
OVACAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme
HT29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme
K-562	Medula óssea; leucemia mielóide crônica	Mesênquima
HaCaT	Pele (queratinócito); não tumoral	Ectoderme

Nota: * esta linhagem representa resistência a múltiplos fármacos.

Fonte: Da autora.

Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 100 µL/poço de uma suspensão celular com densidade de inoculação entre 3×10^4 e $6,5 \times 10^4$ células/mL em meio RPMI/SFB e

incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 24 horas de incubação, adicionou-se 100 µL/poço da amostra em quatro concentrações (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL), e as células foram novamente incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

A amostra foi preparada utilizando-se 10 mg da fração FBUOH dissolvida em 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 µL desta solução – mãe foi dispersa em 950 µL de meio RPMI/5% SFB para preparação da solução de trabalho. Esta foi diluída sucessivamente em meio de cultura para a obtenção das concentrações finais de 0,25 µg/mL; 2,5 µg/mL; 25 µg/mL e 250 µg/mL. A concentração final de DMSO não interferiu no crescimento celular.

Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025 µg/mL; 0,25 µg/mL; 2,5 µg/mL e 25 µg/mL. Para determinar a quantidade de células existentes logo após a adição das amostras foi feita uma placa controle denominada T₀. Para isto, uma placa foi fixada com uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 50%.

Depois de adicionadas as amostras, ao final de 48 horas de incubação, as células foram fixadas com 50 µL/poço de TCA a 50% e as placas foram incubadas por uma hora a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas em água corrente quatro vezes consecutivas para remoção de resíduos de TCA, meio de cultura, SFB e metabólitos secundários. O TCA atua como um fixador precipitando proteínas permitindo que células viáveis se mantenham fixas na placa enquanto os resíduos se desprendem com a lavagem em água corrente.

Após serem secas à temperatura ambiente, as células foram coradas com 50 µL/poço de sulforodamina B 0,4% (p/v) dissolvida em ácido acético 1%, e mantidas por 60 minutos a 4°C. Em seguida, foram lavadas quatro vezes com ácido acético a 1% e secas à temperatura ambiente. Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/poço de Trizma Base (10 µM e pH 10,5). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi em 540 nm em leitor de microplacas. Gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração da amostra foram gerados para cada uma das linhagens testadas.

A concentração que provocou a inibição do crescimento total (TGI) foi determinada por análise de regressão não linear usando a curva de concentração – resposta para cada linhagem celular no *software* Origin 8.0® (OriginLab Corporation).

4.4.5 Avaliação da atividade leishmanicida

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos da Universidade Federal de Alfenas (Unifal/MG) em colaboração com o Prof. Dr. Marcos José Marques e a doutoranda Juliana Barbosa Nunes, segundo metodologia descrita por Pereira et al. (2010).

Para a realização deste teste, foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) cultivadas em meio LIT (Liver Infusion Triptose) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As cepas foram mantidas em estufa BOD, a 28°C. Para o crescimento exponencial foi adicionado o meio de cultura, e estas foram submetidas a repiques a cada 5 dias. A contagem de formas promastigotas foi feita em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para $1,0 \times 10^7$ parasitos/mL. A amostra foi preparada solubilizando a fração FBuOH em álcool etílico absoluto.

Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100 µL/poço de meio LIT. Posteriormente, 96 µL/poço de meio LIT e 4 µL/poço da amostra previamente preparada foram adicionados ao primeiro poço e então realizada diluição seriada da amostra transferindo-se 100 µL do primeiro poço para os poços consecutivos até o último poço, no qual foi descartado 100 µL para que todos os poços contivessem 100 µL. Após a diluição foram adicionados 100 µL/poço de meio contendo os parasitas (10^7 promastigotas/mL). O volume final em cada poço foi de 200 µL e a maior concentração testada da amostra, no 1º poço da diluição seriada, foi de 100 µg/mL.

Alguns poços da placa foram utilizados para controle de crescimento dos parasitas, do solvente usado na solubilização da amostra e do fármaco utilizado como padrão. Este último refere-se a anfotericina B, usado nas concentrações de 0,156 µg/mL a 10 µg/mL.

Após 72 horas de incubação, as microplacas foram centrifugadas a 3000 rpm, 4°C por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram efetuadas três lavagens com 200 µL/poço de PBS para garantir a retirada das substâncias dos poços, procedendo com o teste de viabilidade celular. Para isto, foram adicionados 200 µL/poço de uma solução estéril contendo 10% de alamarBlue® (indicador de viabilidade celular a base de resazurina) em meio LIT. Após 4 horas de reação, a leitura foi realizada em leitor de microplacas (Anthos Zenith 200rt) a 570 nm e 600 nm. O ensaio foi realizado em duplicata.

A porcentagem de inibição da proliferação foi calculada a partir da fórmula: % inibição = $100 - [A_{570} - (A_{600} \times R_0) \text{ Tratado} / A_{570} - (A_{600} \times R_0) \text{ Controle positivo}] \times 100$, em que A_{570} é a absorbância a 570 nm, A_{600} é a absorbância a 600 nm e R_0 é o fator de correção, calculado a partir dos valores de absorbância do controle negativo, ou seja, apenas meio de cultura e resazurina, na ausência de parasitos [$R_0 = (A_{570} / A_{600})$]. O resultado foi expresso em concentração inibitória para 50% dos parasitos (IC_{50}).

4.4.6 Avaliação da citotoxicidade

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Vacinas, Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas (Unifal/MG) em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho e o mestrando Gabriel Augusto Pires de Souza.

A citotoxicidade da fração butanólica (FBuOH) foi avaliada através do teste de viabilidade celular usando o método MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] segundo metodologia proposta por Brandão et al. 2010. Este método mede a atividade das desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, em clivarem o anel de tetrazólio do MTT, transformando-o de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan, que são cristais insolúveis em soluções aquosas (ABREU, 2008). Dessa forma, a produção de formazan reflete a atividade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular.

Células Vero (célula epitelial de rim de macaco-verde) foram cultivadas em meio DMEM contendo 5% de Soro Fetal Bovino (SFB) durante 48 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, estas células foram semeadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 6×10^3 células/poço e incubadas por mais 24 horas. Após este período, foram adicionados 50 µL da amostra FBuOH solubilizada em água estéril e 150 µL de meio de cultura ao primeiro poço da microplaca e então realizada a diluição seriada da amostra. A diluição da amostra começou a partir da transferência de 100 µL do primeiro poço para os poços consecutivos, até o último poço, onde 100 µL foram desprezados para que todos os poços contivessem 100 µL de solução como volume final. A maior concentração testada, no 1º poço da diluição seriada, foi de 1000 µg/mL. Alguns poços foram reservados para controle de crescimento celular, os quais continham apenas as células e 100 µL de meio de cultura.

Após a montagem da microplaca, esta foi incubada por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂. Passado este período, foram adicionados 10 µL de solução de MTT (1 mg/mL) em todos os poços, e as microplacas foram novamente incubadas nas condições supracitadas por 4 horas. Findo este tempo, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e 100 µL/poço de DMSO foram adicionados para solubilização dos cristais de formazan. As microplacas foram agitadas durante 10 minutos em agitador orbital e a absorbância foi medida a 570 nm em leitor de microplacas (Anthos Zenith 200rt). O ensaio foi realizado em duplicata.

A porcentagem de citotoxicidade foi calculada como $[(A-B)/A] \times 100$, onde A e B são as absorbâncias das células controle e tratadas, respectivamente. Os dados foram analisados

usando regressão linear para obter valores para CC_{50} e CC_{90} (concentração citotóxica para 50% e 90% das células, respectivamente).

O índice de seletividade (IS) da fração FBUOH foi calculado pela razão entre os valores de CC_{50} e CIM (NGUTA et al., 2016). Neste caso, como o valor de CIM no presente trabalho foi dado em intervalo, o maior valor do intervalo foi considerado para o cálculo de IS.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises da fração butanólica (FBuOH) e as discussões acerca dos mesmos podem ser conferidos nas subseções seguintes.

5.2 Caracterização química

5.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A fração FBuOH foi analisada por técnicas de cromatografia com objetivo de avaliar o perfil químico da mesma. A cromatografia é um método físico-químico de separação, fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Dentre as várias técnicas de cromatografia, a cromatografia em camada delgada (CCD) é uma das mais utilizadas devido a simplicidade, rapidez e baixo custo, sendo a técnica escolhida para dar início ao estudo químico da fração FBuOH e a qual permitiu verificar o comportamento da mesma em diferentes misturas de eluentes e avaliar a presença de classes de compostos com o uso de reveladores distintos. O perfil cromatográfico observado para a fração FBuOH foi analisado através da comparação das colorações das bandas observadas nas placas, quando reveladas, com as colorações das classes descritas na literatura (SIMÕES et al., 2007; WAGNER; BLADT, 1996; WALL, 2005).

Dentre os vários sistemas de eluentes testados, o que melhor distinguiu e separou os compostos presentes na amostra foi a fase orgânica da mistura clorofórmio, metanol, n-propanol e água (5:6:1:4). Dentre os reveladores empregados, a luz UV-254 nm, anisaldeído sulfúrico, ninhidrina e reagente de Dragendorff se apresentaram apropriados para a detecção dos compostos presentes na fração em estudo. As placas cromatográficas resultantes desta triagem química podem ser observadas na Figura 5.

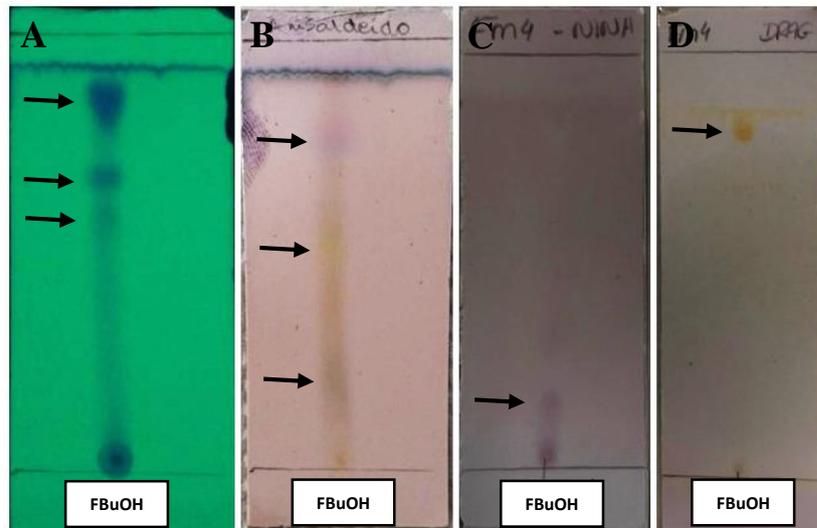


Figura 5 - Cromatografia em camada delgada da fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) revelada com luz UV-254 nm (A), anisaldeído sulfúrico (B), ninhidrina (C) e reagente Dragendorff (D). Fase móvel (orgânica): clorofórmio, metanol, n-propanol e água (5:6:1:4). As setas indicam as principais bandas reveladas.

Fonte: Da autora.

A luz UV-254 nm revelou três bandas principais, indicando a presença de grupos cromóforos que apresentam ligações duplas conjugadas (FIGURA 5A), em que as zonas cromatográficas aparecem escuras em um fundo mais claro. A revelação por anisaldeído sulfúrico resultou em uma discreta banda de coloração lilás sugerindo a presença de compostos pertencentes à classe dos terpenos (FIGURA 5B). Inicialmente conhecidos por serem produzidos essencialmente por plantas, hoje sabe-se que fungos endofíticos produzem um grande número de terpenos estruturalmente diversos (DE SOUZA et al., 2011; XU, 2015; ZHANG; WEI; TAN, 2015), apresentando variadas atividades biológicas, incluindo atividade antitumoral, representada principalmente pelo composto Taxol® (paclitaxel), um diterpeno produzido pelo endófito *T. andreanae* (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993); atividade antifúngica, como a descrita por Pongcharoen et al. (2008), na qual um diterpeno denominado sordaricina, obtido do endófito *Xylaria* sp., apresentou potente atividade contra *Candida albicans*; além de atividades antiviral (PANG et al., 2017) e anti-inflamatória (LIU et al., 2017; CHEN et al., 2018).

A aplicação de anisaldeído sulfúrico revelou ainda duas manchas difusas, uma de coloração amarela, sugestiva da presença de flavonoides e uma de coloração esverdeada que pode sugerir a presença de saponinas (FIGURA 5B). Flavonoides e saponinas têm sido relatados como produto do metabolismo secundário de fungos endofíticos com destaque para

atividades antioxidante (LI et al., 2015a; PAN et al., 2017; QIU et al., 2010; YAN et al., 2013) e antimicrobiana (JIN et al., 2017; WU et al., 2012, 2013), respectivamente.

A revelação por ninhidrina mostrou uma banda de coloração rosa sugerindo a presença de aminas primárias (FIGURA 5C), as quais são encontradas, por vezes, em compostos produzidos por fungos endofíticos de mangues (XU, 2015). A partir dos extratos de cultura do endófito *Xylaria* sp. isolado de *Ginkgo biloba*, Liu et al. (2008) identificaram um composto bioativo, 7-amino-4-metilcoumarina, que possui aminas primárias em sua estrutura, tendo o mesmo apresentado forte atividade antibacteriana e antifúngica contra diferentes patógenos.

Por fim, a presença de alcaloides na fração FBUOH foi sugerida pela revelação com reagente Dragendorff que mostrou uma banda de coloração castanha (FIGURA 5D). Os fungos endofíticos foram relatados na revisão de Zhang e colaboradores (2012) como excelente fonte de novos alcaloides bioativos, apresentando variada atividade biológica com potencial para serem explorados pela indústria farmacêutica, além de auxiliarem na proteção da planta hospedeira. Carvalho (2016) identificou um alcaloide piridínico, denominado ácido fusárico, a partir da fração acetato de etila obtida da fermentação do fungo *G. moniliformis* 99(3), mesmo endófito utilizado no presente estudo, e esse alcaloide apresentou amplo espectro de ação antimicrobiana, além de atividade antiproliferativa contra linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama e melanoma.

5.2.2 High Performance Liquid Chromatography – Diode Array detector (HPLC-DAD)

Visando caracterizar o perfil químico da amostra em estudo, a fração FBUOH também foi avaliada por HPLC-DAD. O cromatograma obtido pode ser observado na Figura 6.

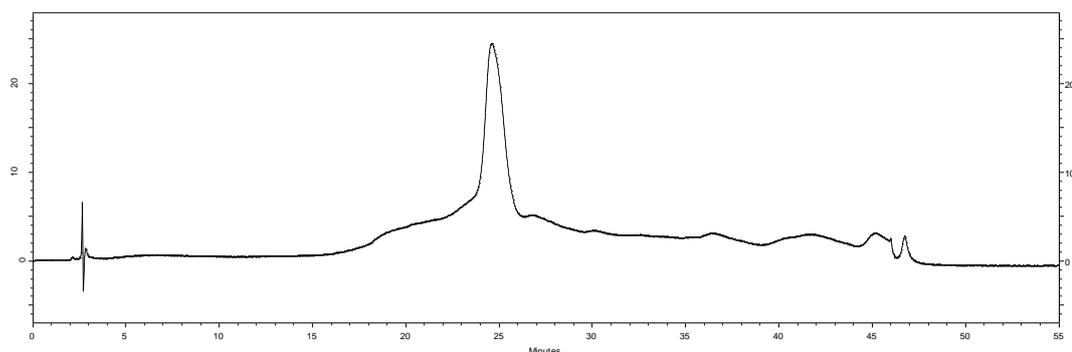


Figura 6 - Cromatograma da fração butanólica (FBUOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) obtido por HPLC-DAD a 350 nm.

Fonte: Da autora.

A partir de uma varredura em diferentes comprimentos de onda, a Figura 6 apresenta o cromatograma no comprimento de onda que melhor revelou os compostos presentes na fração FBuOH. É possível observar, no comprimento de onda analisado (350 nm), a presença de um pico majoritário no tempo de retenção de aproximadamente 25 minutos. Este tempo de retenção caracteriza um comportamento de caráter mais apolar da fração FBuOH, uma vez que se trata de um HPLC com coluna de fase reversa. Além disso, nas condições analisadas, aparentemente a fração FBuOH apresentou pouca variedade de substâncias, o que pode ser explicado pela amostra se tratar de uma fração, ou seja, já é uma parte isolada de uma matriz complexa.

Alguns compostos pertencentes à classe dos flavonoides têm sido descritos por apresentarem máximo de absorção na região de 350 nm (COOMAN; EVERAERT; KEUKELEIRE, 1998; DUBBER; KANFER, 2004), além do que, devido seu caráter polar, os flavonoides são substâncias preferencialmente extraídas com solventes polares como *n*-butanol (SIMÕES et al., 2007), o mesmo solvente utilizado na extração da amostra em estudo, sugerindo que o pico apresentado pela fração FBuOH possa pertencer a esta classe química.

Patil e colaboradores (2015) identificaram por HPLC a presença de bioflavonoides rutina no extrato do endófito *Aspergillus flavus* L7, o qual apresentou potente atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante. Pan et al. (2017) relataram a presença de compostos fenólicos, flavonoides e saponinas em extratos de fungos endofíticos isolados de *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*, dentre os flavonoides foi relatada a presença de rutina, cianidina, luteolina e apigenina. Zhao e colaboradores (2014) descreveram pela primeira vez a produção de luteolina por um endófito isolado de raízes de guandu [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.], composto que, segundo os autores, contribuiu para a atividade antioxidante apresentada pelo extrato fúngico.

Entretanto, este ensaio carece de um estudo mais aprofundado em relação as condições cromatográficas utilizadas para uma melhor resolução dos compostos presentes na fração FBuOH, bem como do uso de alguns padrões da classe de flavonoides que permita comparar com o resultado obtido.

5.2.3 Determinação quantitativa de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino vegetal e em microorganismos e, de maneira geral, são definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila. No entanto, são extremamente diversos e abrangem um grande número de substâncias tais como ácidos fenólicos, benzoquinonas, flavonoides, fenilpropanoides, ligninas e taninos, dentre outras (ROBARDS et al., 1999).

Como parte da caracterização química, a fração FBUOH foi submetida a um ensaio para determinar a quantidade de fenólicos totais, e o resultado foi de 15,85 miligramas de ácido gálico por grama de fração, com desvio padrão de $\pm 0,22$; valor relativamente baixo quando comparado a outros dados na literatura. Yadav e colaboradores (2014) avaliaram a quantidade de fenólicos totais em extratos acetato de etila de 21 fungos endofíticos isolados de *Eugenia jambolana* e encontraram valores que chegaram a 60,13 mg GAE/g. Quando comparada a outras fontes de produtos naturais, a diferença no teor de compostos fenólicos se torna ainda maior. Nina et al. (2015) relataram para própolis chilena um total de 208 mg GAE/g de conteúdo fenólico.

A baixa quantidade de compostos fenólicos encontrada na fração FBUOH pode estar relacionada ao método e as condições de extração que foram empregados para obtenção dos metabólitos fúngicos, bem como à polaridade do solvente utilizado. Corroborando com esta hipótese, Garcia-Salas e colaboradores (2010) relataram que o processo de extração líquido-líquido, o mesmo utilizado no presente estudo, pode provocar a degradação de compostos fenólicos em decorrência do tempo de extração que este método exige. Os autores acrescentam ainda que a luz, juntamente com o ar e a temperatura, são fatores importantes que facilitam as reações de degradação. Além disso, segundo Rodríguez-Pérez et al. (2015), dependendo dos solventes utilizados na extração, a quantidade de compostos fenólicos extraídos de uma matriz pode diferir muito, principalmente em decorrência da polaridade destes compostos.

A influência que o solvente utilizado na extração de metabólitos exerce sobre a quantificação de compostos fenólicos totais de uma amostra tem sido extensamente relatada na literatura, uma vez que a polaridade destes compostos varia significativamente. Sulaiman et al. (2011), Alothman et al. (2009) e Abozed et al. (2014) avaliaram o efeito de diferentes solventes sobre o conteúdo de fenólicos totais em vegetais, frutas e trigo, respectivamente, e concluíram que o teor de fenólicos varia tanto em função da matriz avaliada quanto do solvente utilizado. Gautham e Onkarappa (2013) relataram um total de 1,23 mg GAE/g de extrato de conteúdo fenólico na fração *n*-butanólica, mesmo solvente utilizado no presente trabalho, extraída do metabolismo do actinomiceto *Streptomyces fradiae* GOS₁.

Contrastando com os resultados aqui obtidos, diversos autores relatam a produção de compostos fenólicos pelos endófitos. De acordo com o levantamento realizado por Carvalho e colaboradores (2016), os fungos endofíticos são uma fonte não convencional de novos compostos fenólicos, os quais mostram interessantes bioatividades e ampla aplicação, como antifúngicos, antibacterianos, antivirais e antioxidantes. Singh et al. (2016) documentaram que o endófito *Cladosporium velox* TN-9S isolado de *Tinospora cordifolia*, uma planta medicinal,

pode ser explorado pela indústria farmacêutica como fonte de compostos fenólicos com atividade antioxidante e genoprotetora, uma vez que esses compostos também mostraram natureza não-mutagênica e não-citotóxica.

Investigando a planta *Aegiceras corniculatum* de um mangue chinês, Sun e colaboradores (2014) isolaram o endófito *Pestalotiopsis* sp. AcBC2 e a fermentação deste fungo levou ao isolamento de cinco novos compostos fenólicos denominados Pestalol A-E, além de outros compostos já conhecidos. Os compostos Pestalol B e C mostraram atividade antiproliferativa contra um painel de 10 linhagens de células tumorais humanas, entre elas células de pulmão, próstata, mama e melanoma. Pestalol B mostrou, ainda, atividade inibitória contra *Mycobacterium tuberculosis*.

5.3 Atividades Biológicas

5.3.1 Atividade Antimicrobiana

As frações FAcOEt e FBuOH provenientes da fermentação do fungo *G. moniliformis* 99(3) foram avaliadas quanto a sua ação antimicrobiana contra cepas ATCC de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa e de uma levedura. Os resultados podem ser verificados na Tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações inibitória mínima (CIM) e microbicida mínima (CMM) em µg/mL observadas para as frações acetato de etila (FAcOEt) e butanólica (FBuOH) provenientes da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) contra diferentes micro-organismos.

Fração	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)		<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)		<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	
	CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
FAcOEt	100-200	200	200-400	N.A.	200-400	N.A.
FBuOH	25-50	50	100-200	N.A.	N.A.	N.A.

Nota: N.A.: não ativo para as concentrações testadas (3,125 a 400 µg/mL).

Fonte: Da autora.

A fração FAcOEt foi avaliada com o intuito de verificar se o fungo *G. moniliformis* 99(3) permanecia viável e capaz de reproduzir a atividade antimicrobiana encontrada nos estudos conduzidos por Carvalho (2016), não sendo objeto de estudo deste trabalho. A fração acetato de etila obtida por este autor apresentou CIM entre 125-250 µg/mL contra *C. albicans* e entre 250-500 µg/mL para ambas bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Observando a Tabela 2 é possível verificar que o endófito em questão se manteve viável e apresentou atividade similar a relatada por Carvalho (2016), com CIM entre 100-200 µg/mL contra *C. albicans* e entre 200-

400 µg/mL contra *E. coli* e *S. aureus*. Sendo assim, prosseguiu-se com o estudo do produto de fermentação de *G. moniliformis* 99(3).

Os resultados obtidos para a fração FBUOH foram avaliados de acordo com o critério de Holetz et al. (2002), em que é possível classificar a ação antimicrobiana de extratos naturais como forte quando apresentam atividade em concentrações menores que 100 µg/mL; moderada em concentrações entre 100 e 500 µg/mL; fraca entre 500 e 1000 µg/mL e inativa quando maior ou igual a 1000 µg/mL. Sendo assim, é possível observar na Tabela 2 que a fração FBUOH se destacou por apresentar forte atividade antimicrobiana contra *C. albicans*, com ação fungistática nas concentrações entre 25-50 µg/mL e ação fungicida na concentração de 50 µg/mL.

Este resultado é extremamente relevante uma vez que infecções causadas por *Candida* spp. apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade e estão associadas a uma ampla variedade de manifestações clínicas que vão desde infecções superficiais e mucosas até disseminadas e infecções sanguíneas (KULLBERG; ARENDRUP, 2015). Considerando ainda, o contexto de terapias imunossupressoras cada vez mais invasivas, as infecções fúngicas tornam-se uma ameaça para a saúde humana (DORSAZ et al., 2017). Além disso, embora menos frequente que a resistência bacteriana, o uso repetido e prolongado de agentes antifúngicos tem facilitado o desenvolvimento de resistência em espécies fúngicas relevantes clinicamente (ARENDRUP; PATTERSON, 2017; DENNING; HOPE, 2010; KONTOYIANNIS, 2017; MORIO et al., 2017). Quando ocorre, a resistência antifúngica pode ser um problema clínico grave devido ao número limitado de agentes disponíveis.

Em um levantamento realizado por Newman e Cragg (2016), apenas 32 fármacos antifúngicos foram introduzidos na clínica médica entre 1981 e 2014, dos quais mais de 78% eram de origem sintética. Isso é problemático porque os agentes atuais não são suficientemente ativos, não podem ser administrados por via oral, trazem toxicidades específicas de drogas ou de classe, ou ainda podem apresentar grandes interações medicamentosas (DENNING; BROMLEY, 2015). Tomados em conjunto, o pequeno número de agentes antifúngicos disponíveis e o desenvolvimento de resistência aos mesmos revelam a necessidade urgente de novos compostos ativos para melhorar os resultados terapêuticos associados às infecções fúngicas e a fração FBUOH se mostrou promissora para esta finalidade.

Além disso, cabe ressaltar que, segundo o critério de Holetz et al. (2002), a fração FBUOH apresentou forte ação fungicida. Considerando que a maioria dos antifúngicos são fungistáticos em vez de fungicidas (BERMAN; SUDBERY, 2002), o presente resultado reforça o potencial bioativo dos produtos de fermentação do fungo endofítico *G. moniliformis* 99(3).

Relacionando a caracterização química da fração FBUOH com a atividade antifúngica apresentada pela mesma, é possível propor que os compostos sugeridos nas análises cromatográficas sejam os responsáveis pela ação contra *C. albicans*, uma vez que alcaloides, terpenos, saponinas e flavonoides já foram descritos na literatura por possuírem atividade antifúngica. Como citado na discussão da caracterização química (Seção 5.1.1), um alcaloide piridínico foi identificado nos metabólitos produzidos pelo endófito *G. moniliformis* 99(3) e o mesmo apresentou forte atividade fungistática e fungicida contra isolados de *C. albicans* provenientes de lençóis e jalecos de hospital, além de moderada atividade contra a cepa proveniente de ponta de cateter (CARVALHO, 2016). Yuan e colaboradores (2009) identificaram vários compostos diterpênicos da cultura do endófito *Botryosphaeria* sp. MHF isolado de *Maytenus hookeri*, sendo que um deles exibiu atividade contra os fungos oportunistas *C. albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Penicillium avellaneum* comparável ao fármaco padrão nistatina. Uma nova flavona prenilada, metabólito da classe dos flavonoides, foi isolada de um endófito proveniente de uma planta de mangue e a mesma apresentou atividade contra três fungos patogênicos de plantas: *Colletotrichum musae*, *Gibberella zeae* e *P. citrinum* (DING et al., 2013). Por fim, Jin et al. (2017) relataram a produção de saponinas com atividade contra *C. albicans* pelos fungos endofíticos *Fusarium oxysporum* PN8 e *Aspergillus niger* PN17 isolados de *Panax notoginseng*.

Entretanto, devido ao teste químico ter sido preliminar e sugestivo, não refinado a ponto de determinar os exatos compostos presentes na fração FBUOH, mais estudos são necessários para inferir qual composto é responsável pela atividade antifúngica ou mesmo se mais de um composto presente na amostra está agindo em sinergismo para conferir esta bioatividade à fração FBUOH.

Em relação a atividade antibacteriana da fração FBUOH é possível observar na Tabela 2, considerando o critério de Holetz et al. (2002) descrito no início desta seção, que a mesma exibiu moderada ação bacteriostática contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*, mas não apresentou ação bactericida nas concentrações testadas (CIM: 100-200 µg/mL; CMM > 400 µg/mL). Em geral, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação de antibióticos devido à natureza mais complexa de suas paredes celulares que são envolvidas por uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídeos, o que pode limitar a difusão efetiva de drogas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; LEE; JANG; CHA, 2012; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Apesar disso, o ácido fusárico identificado a partir da fração acetato de etila obtida da fermentação do fungo endofítico *G. moniliformis*

99(3), apresentou forte ação bacteriostática e moderada ação bactericida contra *E. coli* ATCC 25922 (CARVALHO, 2016).

Embora sejam encontrados na literatura relatos frequentes de compostos com ação contra bactérias Gram-positivas (CAI et al., 2017; EPSTEIN; GOLAN, 2012; LIM et al., 2010), a fração FBUOH avaliada no presente estudo não mostrou atividade contra *S. aureus* nas concentrações testadas (CIM e CMM > 400 µg/mL, TABELA 2). No entanto, Carvalho (2016) relatou atividade moderada do ácido fusárico identificado na fração acetato de etila proveniente do mesmo endófito avaliado no presente trabalho contra *S. aureus*. Ratnaweera et al. (2015) em estudo com o fungo endofítico *Fusarium* sp. identificou o composto equisetina, o qual possui propriedades antibacterianas seletivas, sendo ativo contra *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. aureus* resistente à metilina (MRSA).

Comparando o comportamento da fração FBUOH frente aos três micro-organismos testados, é relevante destacar que a mesma apresentou ação microbiana seletiva, sendo efetiva apenas contra a levedura, o que é uma característica interessante na busca por um novo agente terapêutico. Isso se reforça uma vez que é crescente a valorização por agentes de espectro estreito na descoberta de novas drogas (BROWN; WRIGHT, 2016; WRIGHT, 2017).

No entanto, cabe ressaltar que embora o fungo *G. moniliformis* 99(3) num primeiro momento tenha se mostrado viável ao produzir metabólitos com as atividades encontradas por Carvalho (2016), uma segunda fermentação foi realizada e o extrato resultante não apresentou a mesma atividade antifúngica. De fato, a atenuação ou perda da produção de metabólitos por meio da geração de subculturas de fungos endofíticos tem sido extensamente relatada na literatura (GURUDATT et al., 2010; KUSARI; PANDEY; SPITELLER, 2012; KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014; LUDWIG-MÜLLER, 2015). Por exemplo, a produção de camptotecina (agente antineoplásico) por endófitos isolados de *Camptotheca acuminata* foi significativamente diminuída da primeira para a sétima geração de subcultura do fungo *F. solani* (KUSARI; ZÜHLKE; SPITELLER, 2009) ou até mesmo completamente perdida após repetição da subcultura de duas cepas de *Aspergillus* sp., como observado por Pu et al. (2013). No entanto, isso pode ser dependente da espécie, uma vez que os mesmos autores relataram que uma espécie de *Trichoderma* produziu camptotecina mesmo após a oitava geração com apenas uma pequena redução na produtividade (PU et al., 2013).

As razões para essa atenuação podem ser atribuídas a fatores que resultam da perda de interações com a planta hospedeira e com outros endófitos coexistentes e/ou ao silenciamento de genes em culturas axênicas (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012; KUSARI; SPITELLER, 2011). Segundo Madhusudhan e colaboradores (2015), a redução na produção

de metabólitos secundários em subculturas sob condições de cultura axênica é o principal obstáculo na produção em larga escala dos compostos oriundos de micro-organismos endofíticos, além do que pequenas variações nas condições de cultivo *in vitro* podem afetar o tipo e a variedade de metabólitos secundários que produzem.

Dessa forma, Venugopalan e Srivastava (2015) sugerem algumas estratégias para sustentar e aumentar a produção de metabólitos secundários de alto valor de fungos endofíticos. Além de técnicas de melhoramento de linhagens para desenvolvimento de cepas de alto rendimento adicionadas a otimização dos processos de fermentação, que poderiam melhorar o rendimento e a produtividade do metabólito de interesse; os autores acrescentam, ainda, a importância de estratégias para reduzir a instabilidade genômica ou o silenciamento de genes biossintéticos nas culturas axênicas de endófitos através de técnicas de co-cultivo e/ou adição de modificadores epigenéticos. A Figura 7 descreve uma abordagem racional para explorar culturas axênicas de endófitos para produção de metabólitos secundários.

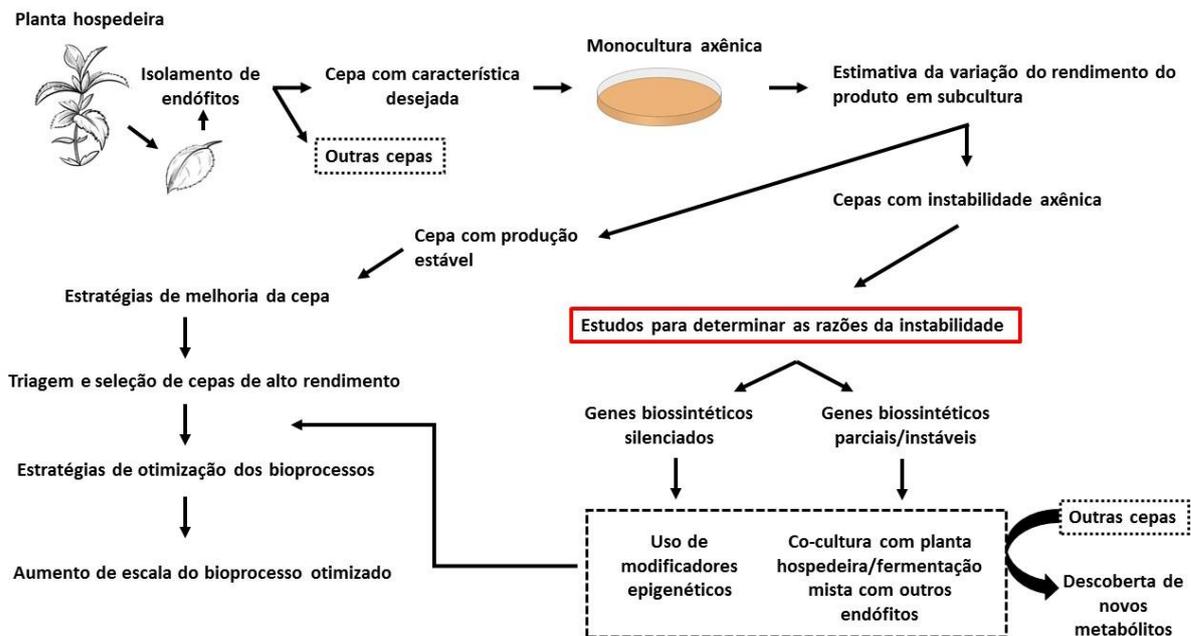


Figura 7 - Uma abordagem racional para exploração de culturas axênicas de endófitos para produção de metabólitos secundários.

Fonte: VENUGOPALAN; SRIVASTAVA, 2015; com modificações.

Algumas dessas abordagens têm sido relatadas na literatura com sucesso. El-Elimat e colaboradores (2014) observaram atenuação da produção de flavonolignanas pelo endófito *Aspergillus iizukae* isolado de *Silybum marianum* após subcultura, no entanto a produção foi retomada quando o fungo foi previamente cultivado em um meio contendo folhas autoclavadas da planta hospedeira; sendo importante salientar que não foram detectadas flavonolignanas nos

extratos da folha de *S. marianum*. Já os pesquisadores Chagas, Dias e Pupo (2013) conseguiram aumentar a produção de policetídeos antifúngicos a partir da cultura mista dos fungos endofíticos *Alternaria tenuissima* e *Nigrospora sphaerica* isolados da mesma planta hospedeira (*Smallanthus sonchifolius*).

No entanto, também há relatos de autores que falharam ao tentar reverter a atenuação da produção em culturas endofíticas (GURUDATT et al., 2010), revelando a necessidade de estudos sobre a complexa interação entre endófito, planta hospedeira e outros endófitos. Segundo Suryanarayanan (2013), visualizar os endófitos não apenas como um subconjunto de fungos, mas como parte integrante da comunidade vegetal, e estudar os diferentes aspectos de sua biologia irá nos ajudar a compreender a evolução do endofitismo. De fato, a falta de compreensão dessa dinâmica interação é uma das razões pela qual não foi possível até agora manter a estabilidade biossintética de endófitos capazes de produzir compostos em subculturas sucessivas (KUSARI; SPITELLER, 2011).

Dito isso e diante da forte atividade antifúngica apresentada pela fração FBUOH, ressalta-se a importância de estudos mais aprofundados sobre a biologia de *G. moniliformis*, bem como da relação com sua planta hospedeira e da otimização do processo fermentativo, a fim de fornecer um ambiente de cultura propício para restaurar e sustentar seu potencial biossintético.

5.3.2 Potencial Sinérgico

Considerando o cenário mundial da necessidade por novos fármacos, a combinação de drogas representa uma estratégia promissora para controlar a evolução de resistência, aumentar a eficácia dos tratamentos, minimizar efeitos tóxicos, bem como para resgatar o potencial de antigas drogas (BOLLENBACH, 2015; KUMAR et al., 2012). Diante disso, foi realizado o teste de *Checkerboard* para determinar o efeito da associação da fração FBUOH com os antifúngicos fluconazol, anfotericina B e nistatina contra *Candida albicans*. Os resultados obtidos podem ser conferidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Teste de *Checkerboard* com a fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) em associação com antifúngicos de uso comercial contra *Candida albicans*, em µg/mL.

Antifúngico	CIM _{Fr}	CIM _{Ant}	CIM _{CFr}	CIM _{CAnt}	CIF _F	CIF _A	ICIF*
Fluconazol	100	64	25	8	0,25	0,125	0,375 sinérgico
Anfotericina B	100	4	100	4	1	1	2 indiferente
Nistatina	100	1	50	1	0,5	1	1,5 indiferente

Nota: CIM_{Fr}: concentração inibitória mínima da fração. CIM_{Ant}: concentração inibitória mínima do antifúngico. CIM_{CFr}: concentração inibitória mínima da fração combinada com o antifúngico. CIM_{CAnt}: concentração inibitória mínima do antifúngico combinado com a fração. CIF_F: concentração inibitória fracionária da fração. CIF_A: concentração inibitória fracionária do antifúngico. ICIF: índice da concentração inibitória fracionária. *Classificação de Timurkaynak et al. (2006).

Fonte: Da autora.

Analisando a Tabela 3 é possível verificar efeito sinérgico entre a fração FBuOH e o fluconazol (ICIF = 0,375) cuja ação foi potencializada em 8 vezes, sendo a CIM do antifúngico reduzida de 64 para 8 µg/mL. Este resultado pode se tornar uma opção promissora dentro do panorama de resistência ao fluconazol que vem sendo observado em espécies de *Candida* (DOS SANTOS et al., 2005; VIEIRA; DOS SANTOS, 2017), uma vez que a terapia combinatória pode evitar ou retardar a resistência dessas leveduras ao antifúngico, bem como pode reduzir as limitações do tratamento convencional, como efeitos adversos e toxicidade através da possibilidade da administração de doses menores do fármaco (CAMPITELLI et al., 2017; CUENCA-ESTRELLA, 2004).

O estudo de Li et al. (2015b), corrobora com os achados do presente trabalho. Estes pesquisadores avaliaram o potencial sinérgico de 17 compostos oriundos do metabolismo fúngico do endófito *Guignardia* sp. isolado de *Euphorbia sieboldiana* contra *C. albicans* e observaram efeito sinérgico na associação de fluconazol com os compostos 13-hidroxilado guignardona A, guignardona N, guignardona O, guignardona B e ácido guignárdico. Os autores também constataram ação sinérgica dessas associações contra o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans*.

No entanto, considerando a classificação de Timurkaynak et al. (2006), o efeito da associação da fração FBuOH com a nistatina e a anfotericina B se mostrou indiferente (TABELA 3), ou seja, a CIM obtida na associação foi muito próxima ou igual ao valor da CIM encontrada para os compostos isolados. Resultado semelhante foi encontrado por Oliveira e colaboradores (2016) ao avaliarem o efeito modulador da associação do óleo essencial extraído de folhas de *Ocimum gratissimum* com antifúngicos de uso clínico. Também utilizando o

método de *Checkerboard*, estes autores combinaram o óleo essencial à nistatina, ao cetoconazol e ao miconazol e testaram contra diferentes espécies de *Candida* observando efeito sinérgico apenas na associação do óleo essencial com o cetoconazol e somente sobre *C. tropicalis* ATCC 13803, sendo indiferente na combinação com nistatina.

As divergências nos resultados entre as associações da fração FBUOH com os antifúngicos testados podem estar relacionadas aos diferentes mecanismos de ação dos mesmos. O fluconazol é um antifúngico agrupado na classe dos azólicos e tem como alvo principal a via de biossíntese do ergosterol (principal esteroide da membrana plasmática do fungo) no retículo endoplasmático, ou seja, seu mecanismo de ação é baseado na inibição da síntese de ergosterol exercendo ação fungistática (DOS SANTOS et al., 2005; MAUBON et al., 2014). Por outro lado, a nistatina e a anfotericina B pertencem a classe dos polienos, que se ligam ao ergosterol e alteram a permeabilidade da membrana fúngica permitindo a perda de conteúdo celular, levando à morte do fungo (GHANNOUM; RICE, 1999; MAUBON et al., 2014).

Dito isso, podemos especular que a fração FBUOH possa agir na permeabilidade da membrana plasmática do fungo aumentando assim o poder de penetração do fluconazol na célula e conseqüentemente potencializando sua ação. O mesmo não aconteceu com os polienos, possivelmente por esta classe de antifúngicos já agirem na permeabilidade da membrana. É importante ressaltar que embora a associação da fração FBUOH com a nistatina e a anfotericina B não tenha sido sinérgica, a mesma não foi antagônica, ou seja, a amostra em estudo não interferiu no mecanismo de ação destes antifúngicos.

No entanto, existem outros mecanismos que podem estar envolvidos na atividade sinérgica com a combinação de antifúngicos, por exemplo: inibição de diferentes estágios da mesma via bioquímica intracelular essencial a sobrevivência do fungo; inibição de proteínas carreadoras na membrana plasmática que teriam a função de promover a extrusão do antifúngico, que por sua vez permanece no interior da célula e exerce seu efeito; ou ainda, inibição de diferentes alvos celulares simultaneamente, efeito observado, por exemplo, em drogas que agem sobre a parede celular enquanto a outra atua sobre a membrana plasmática (JOHNSON et al., 2004). Sendo assim, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação da fração FBUOH e então esclarecer o mecanismo responsável pela ação sinérgica com o fluconazol.

A literatura reporta com sucesso algumas associações de compostos provenientes do metabolismo endofítico com antimicrobianos convencionais, como é o caso do trabalho de Pereira e colaboradores (2016) que avaliaram dois ácidos eicosanóicos produzidos pelo endófito *Mycosphaerella* sp. isolado de *Eugenia bimarginata* e ambos mostraram efeito

sinérgico quando associados a anfotericina B contra *Cryptococcus gattii*. Zin et al. (2017) estudando os produtos de fermentação de *Eurotium chevalieri*, um endófito isolado de uma planta de mangue, relataram forte sinergismo na associação da emodina, composto produzido pelo fungo, e do antimicrobiano oxícilina contra MRSA.

5.3.3 Atividade Antioxidante

A avaliação *in vitro* da atividade antioxidante de produtos naturais é uma prática bastante comum em laboratórios de pesquisa, no entanto, em função dos diferentes mecanismos de reações que ocorrem entre o radical (ou agente oxidante) e os compostos antioxidantes, um único ensaio não é capaz de refletir a eficácia antioxidante de um determinado composto, sendo que a maneira mais eficaz de estimar a atividade antioxidante de uma amostra é pela combinação de ensaios, abrangendo mecanismos antioxidantes e radicais diferentes (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; TAN; LIM, 2015; ZHAO et al., 2014). Sendo assim, para que a atividade antioxidante da fração FBUOH obtida da fermentação do fungo endofítico *G. monilliformis* 99(3) fosse determinada com maior rigor, métodos baseados em diferentes mecanismos de ação foram utilizados e os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Atividade antioxidante da fração butanólica (FBUOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) determinada pelos métodos DPPH, ABTS, ORAC e FRAP.

Amostra	DPPH*	ABTS*	ORAC*	FRAP**	AA%***
FBUOH	39,03 ± 2,94	152,16 ± 9,34	213,72 ± 51,45	182,28 ± 19,04	13,01

Nota: Os valores representam a média das medidas em triplicata ± o desvio padrão. *Atividade antioxidante equivalente em Trolox (µmol de Trolox/g de fração). **Atividade antioxidante equivalente em sulfato ferroso (µmol Fe²⁺/g de fração). ***AA%: porcentagem de atividade antioxidante calculada pelo método DPPH.

Fonte: Da autora.

O método DPPH avalia a capacidade de um composto antioxidante sequestrar o radical livre sintético DPPH[•] formando um composto estável. Fundamenta-se na transferência de elétrons ou de átomos de hidrogênio de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). A fração FBUOH apresentou 13,01% de capacidade antioxidante pelo método DPPH na concentração testada, valor consideravelmente baixo quando comparado a dados na literatura para outros fungos endofíticos. Utilizando o mesmo método, Carvalho et al. (2012) observaram para o extrato acetato de etila do endófito *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 atividade antioxidante de 58,92%, enquanto Zhao e colaboradores (2012) relataram 80% de capacidade de sequestro do DPPH[•] para o ácido

cajaninstilbeno identificado a partir do extrato acetato de etila do endófito *Fusarium proliferatum* ERP-13.

Comparando o resultado obtido para a fração FBUOH no ensaio DPPH com a atividade antioxidante de outros produtos naturais como a própolis, por exemplo, a diferença se torna ainda mais significativa. Socha et al. (2014) avaliaram a atividade antioxidante de nove amostras de própolis polonesa e encontraram valores que variaram entre 1920 – 2690 $\mu\text{mol Trolox/g}$ para o ensaio de DPPH, enquanto a fração FBUOH apresentou 39,03 $\mu\text{mol de Trolox/g}$ para o mesmo ensaio.

O método ABTS, assim como o DPPH, também avalia a capacidade de sequestro de um radical livre sintético, no caso o $\text{ABTS}^{*\cdot}$, envolvendo a transferência de elétrons ou de átomos de hidrogênio, no entanto, a atividade apresentada pela fração FBUOH no ensaio ABTS (152,16 $\mu\text{mol de Trolox/g}$) foi maior que no método DPPH (39,03 $\mu\text{mol de Trolox/g}$). Além da diferença na concentração da amostra utilizada para cada ensaio, outra provável explicação para este fato é a limitação que o método DPPH apresenta na avaliação da atividade antioxidante de compostos hidrofílicos, uma vez que este radical é dissolvido apenas em solventes orgânicos. Ao contrário, o radical $\text{ABTS}^{*\cdot}$, solúvel em meio aquoso e orgânico, permite determinar o potencial antioxidante tanto de compostos hidrofílicos quanto lipofílicos (MAGALHÃES et al., 2008). A mesma diferença entre os dois ensaios foi relatada por Tiveron e colaboradores (2016) na avaliação da atividade antioxidante de sete amostras de própolis orgânica, sendo a capacidade de sequestrar radicais $\text{ABTS}^{*\cdot}$ maior do que DPPH^{\cdot} para todas as variantes de própolis analisadas, neste caso foram utilizadas amostras nas mesmas concentrações. Arnao (2000) e Gülçin (2012) também descreveram a solubilidade destes radicais como fator limitante na avaliação do potencial antioxidante de amostras naturais.

A fração FBUOH apresentou atividade antioxidante de 152,16 $\mu\text{mol de Trolox/g}$ pelo método ABTS, sendo possível observar diferença expressiva quando comparada a outros relatos na literatura. Zeng e colaboradores (2011) a partir de uma triagem da atividade antioxidante de extratos acetato de etila de 49 fungos endofíticos isolados de *Scapania verrucosa*, relataram resultados que variaram de 16,58 – 1248,10 $\mu\text{mol Trolox/g}$ pelo método ABTS, sendo que 20 endófitos apresentaram atividade superior à da fração FBUOH.

O método FRAP é uma análise que envolve exclusivamente reações de transferência de elétrons e se fundamenta na capacidade dos antioxidantes presentes na amostra em reduzir o íon férrico. Ainda que este ensaio não seja relevante para a atividade antioxidante de forma fisiológica, uma vez que é necessário um pH ácido (pH 3,6) para a condução das análises, a combinação com outros ensaios pode ser importante para distinguir os mecanismos dominantes

para diferentes compostos antioxidantes (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Para este ensaio, a fração FBUOH apresentou atividade antioxidante de 182,28 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, valor consideravelmente inferior aos encontrados por Socha et al. (2014) para amostras de própolis polonesa, em que os valores variaram entre 6230 – 9190 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$, para o mesmo método.

Por fim, o método ORAC envolve apenas reações de transferência de átomos de hidrogênio e, em contraste com os ensaios acima citados, envolve uma espécie reativa de oxigênio (ERO) de relevância fisiológica, o radical livre peroxila, sendo o ensaio que apresenta a melhor correlação com a atividade antioxidante que ocorre *in vivo* (PRIOR, 2015). No entanto, comparando a atividade apresentada pela fração FBUOH neste ensaio (213,72 $\mu\text{mol Trolox/g}$) com valores encontrados na literatura, a diferença continua considerável. Tiveron e colaboradores (2016) relataram uma variação de 500 a 1950 $\mu\text{mol Trolox/g}$ de extrato na atividade antioxidante de sete amostras de própolis orgânica do sul do Brasil pelo método ORAC. Ainda utilizando o mesmo método, Silva (2017) avaliou a atividade de oito extratos de méis orgânicos brasileiros e os mesmos apresentaram valores entre 835,54 e 1785,35 $\mu\text{mol de Trolox/g}$ de extrato.

As divergências entre os resultados de atividade antioxidante obtidos para a fração FBUOH através das quatro metodologias utilizadas, podem estar relacionadas às diferenças na natureza dos radicais utilizados, na forma como são gerados em cada ensaio, bem como aos seus mecanismos de ação. Além disso, embora os resultados das diferentes metodologias não possam ser comparados, a menor atividade apresentada pela fração FBUOH no ensaio de DPPH pode ainda ser devido a concentração utilizada no preparo da amostra, uma vez que para os outros ensaios partiu-se de uma solução-mãe na concentração de 30 mg/mL, e para o DPPH a concentração inicial foi de 7,5 mg/mL. Cabe ressaltar ainda, que devido à falta de uma padronização na forma de expressar resultados de atividade antioxidante houve dificuldade na comparação dos resultados com dados apresentados na literatura para outros fungos endofíticos.

A atividade antioxidante da fração FBUOH foi avaliada também pela técnica de HPLC *on-line* (sequestro do radical ABTS^{•+}), a qual permite identificar e quantificar, individualmente, quais constituintes de uma matriz possuem atividade antioxidante (PÉREZ-BONILLA et al., 2011). O procedimento inicia com a separação dos constituintes da amostra por HPLC gerando um cromatograma. Após a passagem do eluente pelo detector, contendo os analitos separados, o mesmo é introduzido em uma bobina de reação. Com o auxílio de uma bomba, um fluxo constante da solução contendo o radical ABTS^{•+} é adicionado à bobina para interagir com os analitos. Após a bobina de reação, existe um segundo detector UV/visível, o qual monitora o eluente no comprimento de onda de máxima absorção do radical envolvido (734 nm), gerando

um segundo cromatograma. Quando não há compostos antioxidantes no eluente, uma linha de base é formada. Por outro lado, se o analito previamente separado possuir a capacidade de sequestrar os radicais envolvidos, a absorção do eluente neste comprimento de onda específico sofre alteração, gerando um sinal negativo (LI et al., 2016). Os cromatogramas obtidos para a fração FBUOH estão apresentados na Figura 8.

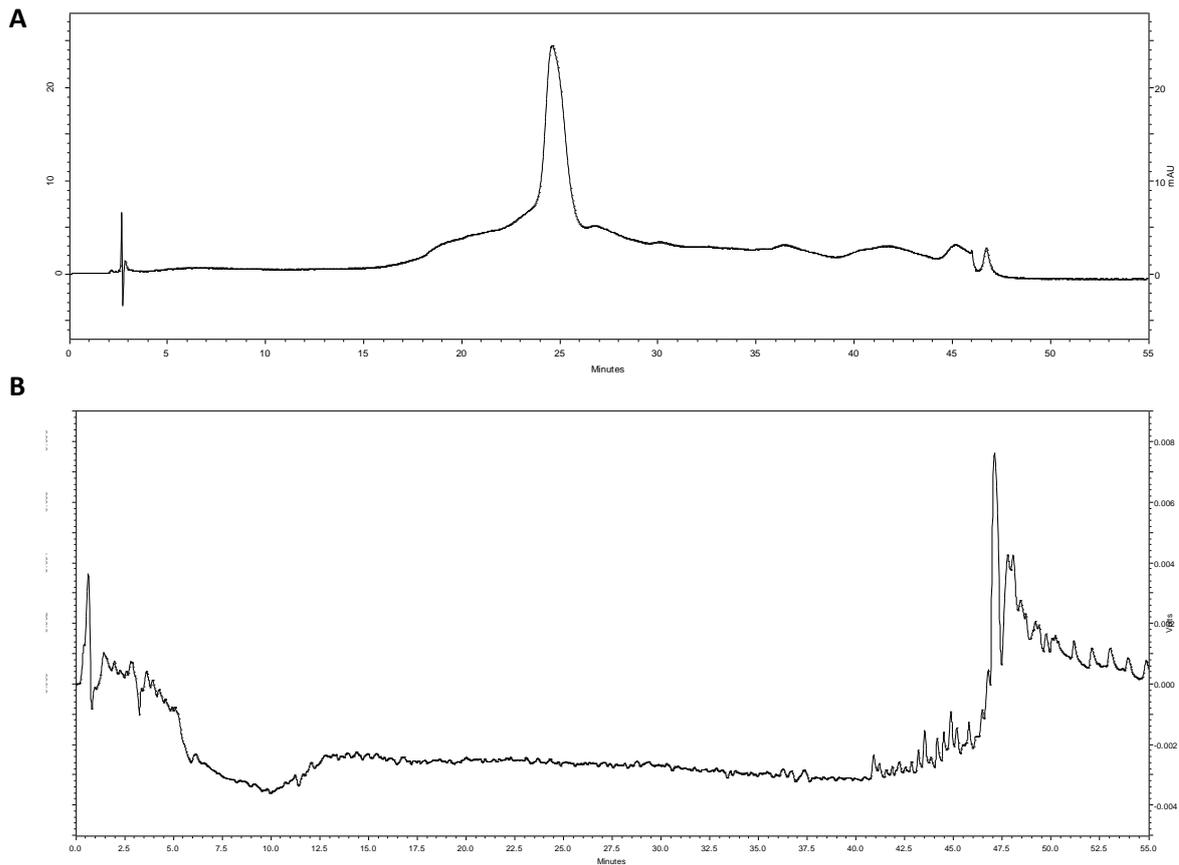


Figura 8 - Cromatogramas da fração butanólica (FBUOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3), detectados a 350 nm (pico positivo) (A) e 734 nm (pico negativo) (B) por HPLC-DAD *on-line* (sequestro do radical ABTS^{•+}).

Fonte: Da autora.

Observando os cromatogramas é possível verificar que a fração FBUOH não apresentou compostos com atividade antioxidante detectáveis nas condições analisadas, uma vez que não foram detectados sinais negativos (FIGURA 8B).

Analisando a composição química da fração FBUOH, é possível que a baixa atividade antioxidante apresentada pela mesma seja devido ao baixo teor de compostos fenólicos em sua composição (15,85 mg GAE/g, seção 5.1.3), uma vez que a atividade antioxidante de uma amostra é frequentemente correlacionada com o seu conteúdo de fenólicos totais (DUDONNÉ et al., 2009; HUANG et al., 2007; SINGH et al., 2016; WU et al., 2004). Corroborando com

esta hipótese, os autores Sharma e Kumar (2013) relataram para o endófito *Aspergillus terreus*, isolado de *Ocimum sanctum*, atividade antioxidante de 34,83% com um total de 14,96 mg GAE/g de conteúdo fenólico, enquanto Yadav e colaboradores (2014) relataram para a mesma espécie, isolada de *Eugenia jambolana*, atividade antioxidante de 63%, porém com um conteúdo fenólico de 41,2 mg GAE/g; ambos os trabalhos avaliaram a atividade antioxidante pelo método DPPH. Ainda associando o estudo química da fração FBUOH com sua atividade biológica, é relevante destacar que a mesma não revelou para o reagente DPPH nos ensaios de cromatografia em camada delgada.

No entanto, estes resultados não implicam, necessariamente que o fungo *G. moniliformis* deva ser desconsiderado como potencial produtor de compostos antioxidantes, uma vez que as condições de cultivo utilizadas neste trabalho podem não ter promovido a biossíntese satisfatória de moléculas antioxidantes. Além disso nem sempre é possível reproduzir em laboratório todos os compostos produzidos por endófitos. Como já discutido anteriormente, a interação entre endófito, planta hospedeira, outros endófitos e ambiente resulta em uma diversidade significativamente maior de compostos do que o observado em culturas axênicas individuais em condições laboratoriais (KUSARI; PANDEY; SPITELLER, 2012; KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014).

Estudos conduzidos por Selim et al. (2015) reforçam essa hipótese, uma vez que estes autores avaliaram as condições de cultivo do fungo endófito *Chaetomium globosum* JN711454 de forma a maximizar a produção de compostos antioxidante e concluíram que a produção de metabólitos antioxidantes se mostrou variável dependendo das condições utilizadas. Os autores primeiro otimizaram as condições do meio de cultura e, então, consideraram alterações nas condições físicas de agitação, pH, temperatura, tamanho do inóculo e período de incubação, sendo que a agitação mostrou maior influência na produção de metabólitos antioxidantes em comparação com outros fatores, seguida da concentração do extrato batata no meio de cultura e do período de incubação.

Devido à variedade de compostos antioxidantes com diferentes polaridades, a baixa atividade antioxidante expressada pela fração FBUOH também pode estar relacionada ao processo de extração, não tendo sido possível extrair com o solvente *n*-butanol todas as moléculas antioxidantes produzidas pelo endófito em estudo. Diversos autores relataram diferenças significativas na atividade antioxidante em extratos de mesma origem, extraídos com diferentes solventes (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009; DUTRA; LEITE; BARBOSA, 2008; XU; CHANG, 2007; ZHAO et al., 2014). Ou seja, a atividade antioxidante depende tanto das condições de cultivo quanto do sistema de solventes utilizado na extração, refletindo assim,

a necessidade de otimizar os parâmetros de fermentação a fim de melhorar a produção de compostos antioxidantes, bem como extrair frações com outros solventes na tentativa de encontrar metabólitos antioxidantes produzidos pelo endófito *G. moniliformis* 99(3).

Embora os resultados da atividade antioxidante no presente estudo não tenham sido expressivos, a literatura reporta trabalhos abordando o potencial antioxidante de compostos obtidos a partir do metabolismo secundário de fungos endofíticos. Ravindran et al. (2012) elucidaram os possíveis papéis de antioxidantes na associação simbiótica entre fungos endofíticos e plantas de manguezais. Os autores demonstraram através de vários ensaios *in vitro* o potencial antioxidante dos extratos dos endófitos isolados das plantas de mangues, e concluíram que a produção de agentes antioxidantes por estes micro-organismos pode beneficiar o hospedeiro em condições adversas do ambiente, bem como ser explorada por indústrias alimentícias e farmacêuticas.

Carvalho e colaboradores (2012) destacaram a potencialidade do extrato do endófito *Paraconiothyrium* sp P83F4/1 pela sua capacidade de sequestro de radicais livres associada a uma inibição seletiva do crescimento celular de queratinócitos humanos imortalizados (células HaCat), sugerindo que este endófito pode ser promissor na luta contra a psoríase por reduzir os radicais livres envolvidos nesta patologia. Cui et al. (2015) verificaram a existência de potente atividade antioxidante em extratos de fungos endofíticos isolados de *Rhodiola* spp., espécies de plantas medicinais usadas desde os tempos antigos por suas propriedades antioxidantes, demonstrando o potencial de obtenção destes compostos utilizando endófitos.

5.3.4 Atividade Antiproliferativa

A fração FBUOH obtida da fermentação do fungo endofítico *G. moniliformis* 99(3) foi avaliada quanto a sua ação antiproliferativa contra um painel de linhagens tumorais humanas (glioma, melanoma, mama, ovário com fenótipo resistente a múltiplos fármacos, rim, pulmão, próstata, ovário, cólon e leucemia) e uma linhagem não tumoral humana (queratinócito). Os resultados podem ser observados na Figura 9 e na Tabela 5.

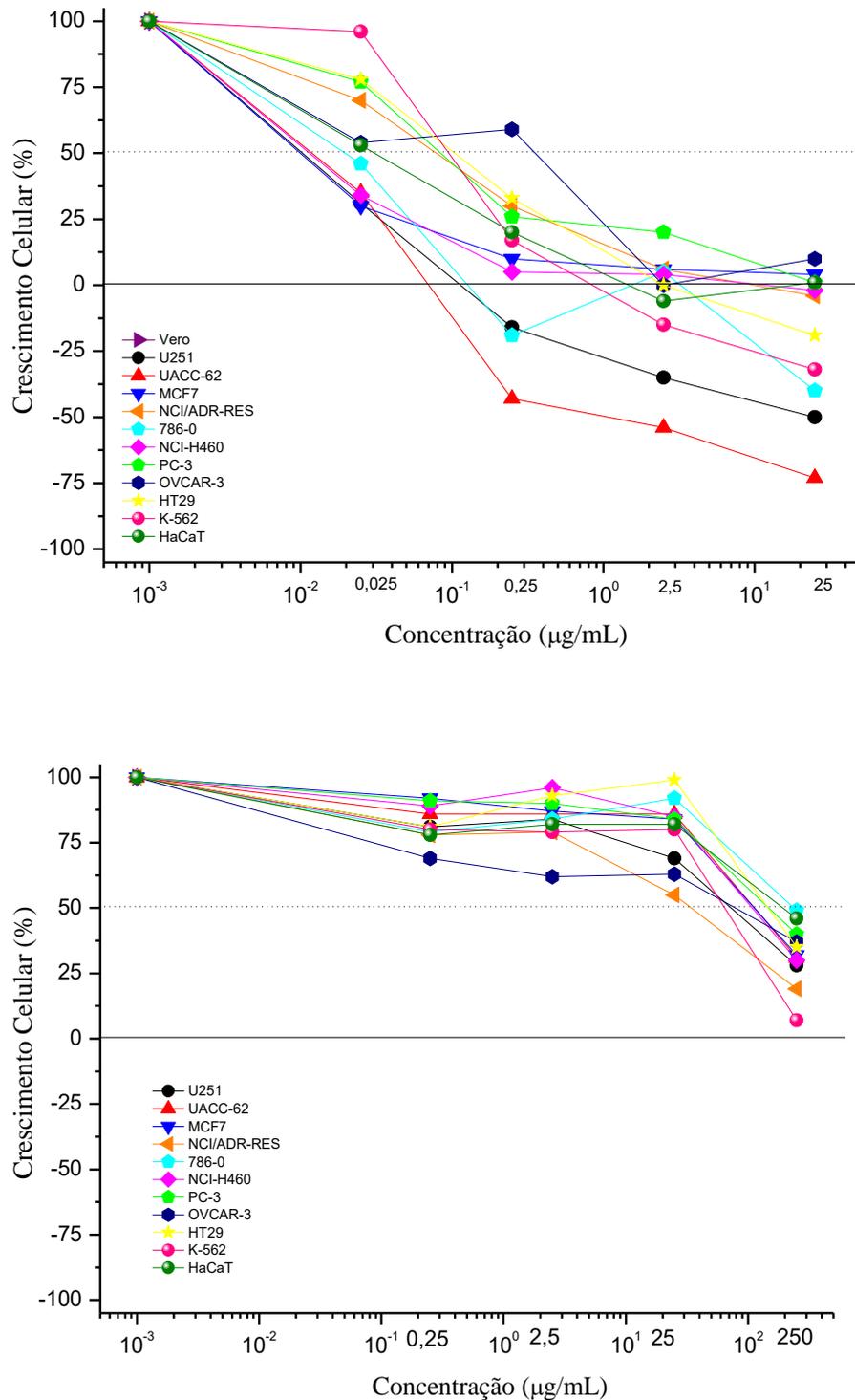


Figura 9 - Atividade antiproliferativa da doxorubicina (superior) e da fração butanólica (FBUOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) (inferior) contra células humanas tumorais. U251: glioma; UACC-62: melanoma; MCF7: mama; NCI-ADR/RES: ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos; 786-0: rim; NCI-H460: pulmão, tipo não pequenas células; PC-3: próstata; OVCAR-3: ovário; HT29: cólon; K-562: leucemia; HaCaT: queratinócito imortalizado, célula não tumoral humana. Doxorubicina: quimioterápico de referência – controle positivo.

Fonte: Da autora.

Tabela 5 - Concentração necessária para inibir completamente a proliferação celular (TGI) para doxorubicina e para a fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) em µg/mL.

Linhagem celular	TGI (µg/mL)	
	Doxo ^a	FBuOH
U251 (glioma)	0,16	*
UACC-62 (melanoma)	0,079	*
MCF7 (mama)	> 25	*
NCI-ADR/RES (ovário) ^b	8,7	*
786-0 (rim)	0,62	*
NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células)	6,9	*
PC-3 (próstata)	> 25	*
OVCAR-3 (ovário)	> 25	*
HT29 (côlon)	4,1	*
K-562 (leucemia)	1,8	*
HaCaT (queratinócito imortalizado) ^c	6,8	*

Nota: ^aDoxo: Doxorubicina (quimioterápico de referência – controle positivo). ^bFenótipo de resistência a múltiplos fármacos. ^cLinhagem não tumoral humana. TGI: *Total Growth Inhibition* – concentração necessária para inibir totalmente a proliferação celular. * TGI > 250 µg/mL.

Fonte: Da autora.

Analisando o comportamento da fração FBuOH frente a todo painel de células (FIGURA 9, TABELA 5), verifica-se que não houve inibição da proliferação celular de nenhuma das linhagens avaliadas nas concentrações testadas (TGI > 250 µg/mL). É possível que as substâncias antiproliferativas presentes na fração FBuOH sejam encontradas em baixa concentração ou mesmo que os compostos ativos não foram solúveis no solvente extrator utilizado. Corroborando com isso, o ácido fusárico identificado por Carvalho (2016) na fração acetato de etila obtida da fermentação de *G. moniliformis* 99(3) apresentou seletividade moderada sobre linhagens de adecarcinoma de mama (MCF 7) e melanoma (HT 144), indicando que a polaridade do solvente *n*-butanol possa ter influenciado na extração de compostos com ação antiproliferativa. Estes resultados também podem ter sido influenciados por fatores externos intrínsecos ao processo de extração como a degradação dos compostos com atividade antiproliferativa durante o processo de extração.

Outro ponto a ser considerado é a influência dos parâmetros de fermentação na produção de metabólitos secundários. A exemplo disso, Venugopalan et al. (2016) conseguiram aumentar a produtividade de camptotecina pelo endófito *Fusarium solani* em 152 vezes sob condições de

fermentação otimizadas, incluindo pH (6,0), temperatura (32°C), velocidade de agitação (80 rpm) e adição de etanol como componente do meio (5%), além da adição exógena de precursores e elicitores para maximizar a produção.

No entanto, se considerarmos que estes resultados refletem a real atividade da fração FBuOH, é relevante destacar sua atuação frente à linhagem humana normal HaCat (queratinócito imortalizado) pois, segundo Cardoso et al. (2013), extratos com valor de TGI > 250 µg/mL mostram baixa citotoxicidade. Sendo assim, este dado pode ser interessante por minimizar eventuais efeitos tóxicos da fração FBuOH sobre a pele, uma vez que a mesma apresentou potente atividade antifúngica.

A segurança é um dos parâmetros cruciais no desenvolvimento de qualquer composto com potencial terapêutico, sendo que muitas moléculas promissoras são descartadas logo no início devido à toxicidade celular. Segundo Wright (2017), é difícil conciliar eficácia e baixa toxicidade para novos compostos, e daí advém a dificuldade no desenvolvimento de novas drogas para atender a demanda mundial crescente. Sendo assim, considerando a atividade antifúngica apresentada pela fração FBuOH contra *C. albicans* no presente estudo (CIM: 25-50 µg/mL, CMM: 50 µg/mL, ver TABELA 2), pode-se observar que a concentração que inibiu o crescimento do fungo, bem como a que exerceu ação fungicida, estiveram bem abaixo de uma possível concentração tóxica para queratinócitos humanos (linhagem HaCat, TGI > 250 µg/mL) sugerindo a possibilidade de um tratamento tópico seguro contra doenças causadas por este patógeno oportunista e incentivando a continuidade de estudos com a fração FBuOH para um possível isolamento do composto responsável por esta atividade antifúngica.

O potencial inibitório de metabólitos produzidos por fungos endofíticos frente a linhagens tumorais humanas tem sido relatado com frequência na literatura. De acordo com Wang et al. (2011), mais de 140 produtos naturais com diferentes níveis de atividade antitumoral já foram isolados de fungos endófitos, os quais podem ser agrupados em várias categorias, como terpenoides, alcaloides, quinonas, flavonoides, isocumarinas, lactonas, ésteres e peptídeos.

Contrastando com os resultados obtidos no presente estudo, a literatura reporta o gênero *Gibberella* como produtor de compostos com atividade antiproliferativa. Jia et al. (2014) relataram forte atividade antitumoral do extrato do endófito *G. moniliformis* AH13, isolado de folhas da erva medicinal Adlay (*Coix lacryma-jobi*), contra quatro tipos de linhagens tumorais humanas (adenocarcinoma pulmonar, câncer de cólon, mama e pâncreas). Rosa e colaboradores (2010) isolaram 121 fungos endofíticos de quatro plantas brasileiras conhecidas por suas

atividades biológicas (*Ageratum myriadenia*, *Palicourea tetraphylla*, *Piptadenia adiantoides* e *Trixis vauthieri*). Os endófitos deste mesmo estudo foram identificados como pertencentes aos gêneros *Alternaria*, *Arthrinium*, *Cochliobolus*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Gibberella* e testados contra três linhagens celulares de câncer humano (melanoma, mama e rim), sendo que duas cepas do gênero *Gibberella* inibiram o crescimento de todas as linhagens tumorais avaliadas.

5.3.5 Atividade Leishmanicida

A fração FBuOH foi avaliada quanto a sua ação contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, no entanto não apresentou atividade leishmanicida nas concentrações testadas ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$).

Além da baixa concentração da fração FBuOH utilizada para conduzir este ensaio, o resultado obtido também pode estar relacionado a polaridade dos compostos presentes na fração, uma vez que compostos obtidos de frações mais apolares, como a hexânica e a clorofórmica, têm se mostrado mais ativas na ação *in vitro* contra *Leishmania* sp. (NAKAMURA et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2015; PEREIRA et al., 2010; REIS et al., 2012), possivelmente pela maior facilidade desses compostos em transpor as membranas do parasita. Além disso, o gênero *Leishmania* é dimórfico, possuindo as formas promastigota (extracelular) e amastigota (intracelular), sendo que a baixa atividade da fração FBuOH contra as formas promastigotas não implica, necessariamente, que a mesma deva ser descartada como possível potencial terapêutico para o tratamento da leishmaniose, uma vez que os compostos presentes nesta fração podem agir de maneira indireta, por exemplo, necessitando serem metabolizados previamente para então exercerem suas ações biológicas.

Corroborando com esta hipótese, pode-se citar o antimoniato de meglumina, fármaco de referência para o tratamento da leishmaniose, que embora seu mecanismo de ação não esteja completamente elucidado, há relatos de baixa sensibilidade de promastigotas a este composto, sendo que o mesmo precisa, primeiramente, ser transformado na sua forma ativa dentro do macrófago para então exercer sua ação contra o parasita (FRÉZARD et al., 2001). Logo, os compostos presentes na fração FBuOH podem agir por mecanismo semelhante ao antimoniato de meglumina, sendo necessário avaliar, também, a eficácia da mesma frente às formas amastigotas em macrófagos infectados.

No entanto, os fungos endófitos têm sido relatados por produzirem compostos com atividade anti-promastigota. Nascimento e colaboradores (2015) identificaram três compostos, cochlioquinona A (1), isocochlioquinona A (2) e anidrocochlioquinona A (3), a partir do extrato

produzido pelo endófito *Cochliobolus sativus* isolado de folhas de *Vernonia polyanthes*, os quais demonstraram inibir formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os compostos 1 e 2 juntos exibiram IC₅₀ de 10,16 µg/mL, enquanto o composto 3 apresentou valor de IC₅₀ de 50,53 µg/mL. Santiago et al. (2012) relataram para o extrato do fungo endofítico *Phaeosphaeria herpotrichoides* UFMGCB 2672, atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis* com IC₅₀ de 0,2 µg/mL, valor comparável a inibição por anfotericina B usada como controle positivo pelos autores.

5.3.6 Citotoxicidade

A fração FBuOH foi avaliada em relação a seu potencial citotóxico, sendo ainda calculado seu índice de seletividade e os resultados podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Citotoxicidade e índice de seletividade da fração butanólica (FBuOH) proveniente da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) frente a células Vero.

Amostra	CC₅₀ (µg/mL)	CC₉₀ (µg/mL)	IS
FBuOH	449	> 1000	8,98

Nota: CC₅₀: concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento celular. CC₉₀: concentração citotóxica que inibe 90% do crescimento celular. IS: índice de seletividade.

Fonte: Da autora.

A fração FBuOH apresentou citotoxicidade dependente de concentração, exibindo valores de CC₅₀ = 449 µg/mL e CC₉₀ > 1000 µg/mL. Considerando os resultados exibidos pela fração FBuOH no ensaio de atividade antimicrobiana (Seção 5.2.1), podemos observar que as concentrações que exerceram atividade fungistática (25 - 50 µg/mL) e fungicida (50 µg/mL) estiveram bem abaixo de uma possível concentração tóxica para células Vero (TABELA 6).

Além disso, foi calculado o índice de seletividade (IS) da fração FBuOH a partir da relação entre a toxicidade para células Vero e a atividade antifúngica para *C. albicans*. Este IS foi de 8,98; ou seja, a fração FBuOH é quase 9 vezes mais efetiva na ação antifúngica do que tóxica às células de mamífero. Segundo Bagla et al. (2014), índices de seletividade relativamente altos indicam que os compostos ou extratos correspondentes podem ser úteis no manejo de infecções bacterianas e fúngicas em animais e humanos. Kleymann e Werling (2004) propõem, ainda, o formato de ensaio de seletividade como um novo padrão na descoberta de drogas anti-infecciosas e no desenvolvimento clínico.

Tomados em conjunto, a forte atividade antifúngica e a baixa toxicidade sugerem que a fração FBuOH apresenta compostos bioativos promissores para futuros testes *in vivo*.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho evidenciou potente atividade antifúngica da fração FBuOH contra *C. albicans*, apresentando ainda efeito sinérgico na associação com o antifúngico fluconazol. Somado a isso, a fração FBuOH mostrou baixa toxicidade às células de mamíferos com alto índice de seletividade, instigando a continuidade de estudos com esta fração tanto para um possível isolamento do composto responsável por esta atividade quanto para futuros testes *in vivo*.

A fração FBuOH não apresentou atividade relevante para os ensaios antioxidantes, antiproliferativo e leishmanicida.

O estudo químico revelou que a fração FBuOH pode conter uma mistura de compostos pertencentes a diferentes classes, como flavonoides, terpenos, saponinas e alcaloides.

O fungo endofítico *G. moniliformis*, proveniente do mangue brasileiro, se mostrou promissor na produção de compostos de interesse, demonstrando o potencial que os endófitos apresentam para serem explorados na descoberta de novas e bioativas moléculas. No entanto, mais estudos são necessários para uma maior compreensão da interação entre planta hospedeira e endófito, bem como da otimização do bioprocessamento para explorar todo o potencial biossintético deste micro-organismo.

REFERÊNCIAS

- ABOZED, S. S. et al. Total phenolic contents and antioxidant activities of various solvent extracts from whole wheat and bran. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 59, n. 1, p. 63–67, 2014.
- ABREU, C. L. C. **Avaliação de citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3**. 2008. 106f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.
- AL-DUAIS, M. et al. Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, v. 228, n. 5, p. 813–821, 2009.
- ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 785–788, 2009.
- ALY, A. H. et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, n. 1, p. 1–16, 13 mar. 2010.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes - secret producers of bioactive plant metabolites. **Pharmazie**, v. 68, n. 7, p. 499–505, 2013.
- ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, p. S445–S451, 2017.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 419–421, 2000.
- ARNOLD, A. E. et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 26, p. 15649–15654, 2003.
- ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2–3, p. 51–66, 2007.
- ATIPHASAWORN, P. et al. Antibacterial and antioxidant constituents of extracts of endophytic fungi isolated from *Ocimum basilicum* var. *thyrsoiflora* leaves. **Current Microbiology**, v. 74, n. 10, p. 1–9, 2017.
- AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. In: KHARWAR, R. N. et al. **Microbial diversity and biotechnology in food security**, Springer, New Delhi, p. 17-22, 2014.
- BARNES, E. C.; KUMAR, R.; DAVIS, R. A. The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 33, n. 3, p. 372–381, 2016.
- BENHAMOU, N.; GARAND, C.; GOULET, A. Ability of nonpathogenic *Fusarium*

oxysporum strain Fo47 to induce resistance against *Pythium ultimum* infection in cucumber. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4044–4060, 2002.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BÉRDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **Journal of Antibiotics**, v. 65, n. 8, p. 385–395, 2012.

BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 12, p. 918–932, 2002.

BILLS, G. F.; GLOER, J. B. Biologically active secondary metabolites from the fungi. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 6, 2016.

BAGLA, V. P. et al. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 383, 2014.

BOLLENBACH, T. Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution. **Current Opinion in Microbiology**, v. 27, p. 1–9, 2015.

BORGES, W. DE et al. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, n. 12, p. 1137–1163, 2009.

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

BRANDAO, G.C. et al. Antimicrobial, antiviral and cytotoxic activity of extracts and constituents from *Polygonum spectabile* Mart. **Phytomedicine**, v. 17, n. 12, p. 926–929, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Estimativa Incidência de câncer no Brasil 2016**. Rio de Janeiro - INCA, 2015.

BRISSOW, E. R. et al. 18-Des-hydroxy Cytochalasin: an antiparasitic compound of *Diaporthe phaseolorum-92C*, an endophytic fungus isolated from *Combretum lanceolatum* Pohl ex Eichler. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 1823–1830, 2017.

BRITZ, H. et al. Two new species of *Fusarium* section *Liseola* associated with mango malformation. **Mycologia**, v. 94, n. 4, p. 722–730, 2002.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 336–343, 2016.

BUATONG, J. et al. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 3005–3008, 2011.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural**

Products, v. 67, n. 12, p. 2141–2153, 2004.

CAI, R. et al. A new α -pyrone from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. HNY29-2B. **Natural Product Research**, v. 31, n. 2, p. 124–130, 2017.

CAMPITELLI, M. et al. Combination antifungal therapy: a review of current data. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 9, n. 6, p. 451–456, 2017.

CAMPOS, F. F. et al. Bioactive endophytic fungi isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood) and identification of beauvericin as a trypanocidal metabolite from *Fusarium* sp. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 65–74, 2015.

CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free radical biology and medicine**, v. 14, n. 3, p. 303–311, 1993.

CARDOSO, C. A. L. et al. Avaliação das atividades antiproliferativa e antioxidante em frutos de *Campomanesia pubescens*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 4, p. 309–315, 2013.

CARVALHO, P. L. N. **Estudo químico e do potencial biológico do produto da fermentação do fungo endofítico *Gibberella moniliformis***. 2016. 133p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Alfenas, Unifal, Alfenas, 2016.

CARVALHO, P. L. N. et al. *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: antioxidant and antiproliferative activities an endophytic fungus associated with *Rheedia brasiliensis* plant. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 1, n. 3, p. 172–176, 2012.

CARVALHO, P. L. N. et al. Importance and implications of the production of phenolic secondary metabolites by endophytic fungi: a mini-review. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 16, n. 4, p. 259–71, 2016.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 225–226, 1939.

CHAGAS, F. O.; DIAS, L. G.; PUPO, M. T. A mixed culture of endophytic fungi increases production of antifungal polyketides. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, p. 1335–1342, 2013.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 47–59, 2012.

CHEN, S. et al. Anti-inflammatory meroterpenoids from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* YX1. **Phytochemistry**, v. 146, p. 8–15, 2018.

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

CHENG, Z. et al. Biodiversity and biotechnological potential of mangrove-associated fungi. **Journal of Forestry Research**, v. 20, n. 1, p. 63–72, 2009.

CHISTÉ, R. C. et al. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive

oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 419–426, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for antimicrobial susceptibility testing of aerobic bacteria**. Approved Standard, 10 ed. M07-A10. EUA, CLSI, v. 35, n. 2, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved Standard, 3 ed. M27-A3. EUA, CLSI, v. 28, n. 14, 2008.

COOMAN, L.; EVERAERT, E.; KEUKELEIRE, D. Quantitative analysis of hop acids, essential oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties. **Phytochemical Analysis**, v. 9, p. 145–150, 1998.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7–24, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 1, p. 52–60, 1997.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy – what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 854–869, 2004.

CUI, J. L. et al. Diversity and antioxidant activity of culturable endophytic fungi from alpine plants of *Rhodiola crenulata*, *R. angusta*, and *R. sachalinensis*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–16, 2015.

DAS, S.; LYLA, P. S.; KHAN, S. A. Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. **Current Science**, v. 90, n. 10, p. 1325–1335, 2006.

DE SOUZA, J. J. et al. Terpenoids from endophytic fungi. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10604–10618, 2011.

DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. **Fungal Diversity**, v. 49, n. 1, p. 1–12, 2011.

DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Mangrove derived fungal endophytes - A chemical and biological perception. **Fungal Diversity**, v. 61, n. 1, p. 1–27, 2013.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova**, v. 7, n. 7, p. 21–25, 1998.

DEMAIN, A. L. Industrial microbiology. **Science**, v. 214, n. 4524, p. 987–995, 1981.

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 185–201, 2013.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 1, p. 5–16, 2009.

DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414–1416, 2015.

- DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195–204, 2010.
- DESHMUKH, S. K.; VEREKAR, S. A.; BHAVE, S. V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–43, 2015.
- DEZAM, A. P. G. et al. Microbial production of organic acids by endophytic fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 282–287, 2017.
- DING, W. J. et al. A new di-*O*-prenylated flavone from an actinomycete *Streptomyces* sp. MA-12. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 15, n. 2, p. 209–214, 2013.
- DORSAZ, S. et al. Identification and mode of action of a plant natural product targeting human fungal pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, 2017.
- DOS SANTOS, I. D. et al. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, p. 189–197, 2005.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 2006.
- DUBBER, M. J.; KANFER, I. High-performance liquid chromatographic determination of selected flavonols in *Ginkgo biloba* solid oral dosage forms. **J. Pharm Pharmaceut Sci**, v. 7, n. 3, p. 303–309, 2004.
- DUDONNÉ, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1768–1774, 2009.
- DUTRA, R. C.; LEITE, M. N.; BARBOSA, N. R. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel Seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 606–614, 2008.
- EL-ELIMAT, T. et al. Flavonolignans from *Aspergillus iizukae*, a fungal endophyte of Milk Thistle (*Silybum marianum*). **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 193–199, 2014.
- EL-GENDY, M. M. A.; EL-BONDKLY, A. M. A.; YAHYA, S. M. M. Production and evaluation of antimycotic and antihepatitis c virus potential of Fusant MERV6270 derived from mangrove endophytic fungi using novel substrates of agroindustrial wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.174, p. 2674–2701, 2014.
- ELAVARASI, A.; RATHNA, G. S.; KALAISELVAM, M. Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2 SUPPL., p. S1081–S1085, 2012.
- ELKHAYAT, E. S. et al. Terrenolide S, a new antileishmanial butenolide from the endophytic fungus *Aspergillus terreus*. **Natural Product Research**, v. 30, n. 7, p. 814–820, 2016.
- EPSTEIN, L.; GOLAN, Y. Fidaxomicin, a new treatment for *Clostridium difficile* infections. **Drugs of Today**, v. 48, n. 2, p. 101–108, 2012.

ESQUEDA, M. K. et al. A review of Perennial ryegrass endophytes and their potential use in the management of african black beetle in perennial grazing systems in australia. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–21, 2017.

FERNANDES, M. D. R. V. et al. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 677–685, 2009.

FIRUZI, O. et al. Antioxidant therapy: current status and future prospects. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 25, p. 3871–3888, 2011.

FLORES, A. C. et al. Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans* and evaluation of biological activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 923–932, 2013.

FRÉZARD, F. et al. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 913–916, 2001.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 717–724, 2008.

GARCIA-SALAS, P. et al. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, 2010.

GAUTHAM, S. A.; ONKARAPPA, R. *In vitro* antioxidant activity of metabolite from *Streptomyces fradiae* strain GOS1. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 5, n.1, p. 235–244, 2013.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 501–517, 1999.

GIRI, C. et al. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Global Ecology and Biogeography**, v.20, p. 154–159, 2011.

GOUDA, S. et al. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–8, 2016.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of food constituents: An overview. **Archives of Toxicology**, v. 86, n. 3, p. 345–391, 2012.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509–526, 2006.

GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136–142, 2008.

GURUDATT, P. S. et al. Attenuation of camptothecin production and negative relation between hyphal biomass and camptothecin content in endophytic fungal strains isolated from *Nothapodytes nimmoniana* Grahm (Icacinaceae). **Current Science**, v. 98, n. 8, p. 1006–1010, 2010.

HAMILTON, C. E. et al. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: A review. **Fungal Diversity**, v. 54, p. 1–10, 2012.

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

HARTLEY, S. E.; GANGE, A. C. Impacts of plant symbiotic fungi on insect herbivores: mutualism in a multitrophic context. **Annual Review of Entomology**, v. 54, n. 1, p. 323–342, 2009.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p. 294–300, 2000.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 12, p. 1422–1432, 2001.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, n. 4, p. 265–278, 2001.

HUANG, W. et al. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 23, p. 1253–1263, 2007.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. A review : Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21–32, 2011.

JANSO, J. E.; CARTER, G. T. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4377–4386, 2010.

JIA, M. et al. *Gibberella moniliformis* AH13 with antitumor activity, an endophytic fungus strain producing triolein isolated from Adlay (*Coix lacryma-jobi*: Poaceae). **Current Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 381–387, 2014.

JIA, M. et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a

- systematic review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.
- JIN, Z. et al. Antimicrobial activity of saponins produced by two novel endophytic fungi from *Panax notoginseng*. **Natural Product Research**, v. 31, 2017.
- JOHNSON, M. D. et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693–715, 2004.
- JURGENSON, J. E.; ZELLER, K. A.; LESLIE, J. F. Expanded genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1972–1979, 2002.
- KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove Ecosystems. **Advances in Marine Biology**, v. 40, p. 81–251, 2001.
- KHARWAR, R. N. et al. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 7, p. 1208–1228, 2011.
- KLEYMANN, G.; WERLING, H. A generally applicable, high-throughput screening - Compatible assay to identify, evaluate, and optimize antimicrobial agents for drug therapy. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 9, n. 7, 2004.
- KOLEVA, I. I.; NIEDERLÄNDER, H. A. G.; VAN BEEK, T. A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 14, p. 3373–3381, 2001.
- KONTOYIANNIS, D. P. Antifungal resistance: an emerging reality and a global challenge. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, p. S431–S435, 2017.
- KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive candidiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 2015.
- KUMAR, A. et al. Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e71805, 2013.
- KUMAR, S. N. et al. Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 3143–3150, 2012.
- KUMARA, P. M. et al. Endophytes and plant secondary metabolite synthesis: molecular and evolutionary perspective. In: VERMA, V. C.; GANGE, A.C. **Advances in Endophytic Research**, Springer India, p. 177–190, 2014.
- KUMARESAN, V. Occurrence, distribution and bioactive potential of mangrove fungal endophytes: an appraisal. **Journal Kavaka**, v. 48, n. 1, p. 44–49, 2017.
- KUSARI, S. et al. Light-independent metabolomics of endophytic *Thielavia subthermophila* provides insight into microbial hypericin biosynthesis. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 10, p. 1825–1835, 2009.

KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, p. 792–798, 2012.

KUSARI, S.; PANDEY, S. P.; SPITELLER, M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, v. 91, p. 81–87, 2012.

KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, v. 28, p. 1203–1207, 2011.

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 297–303, 2014.

KUSARI, S.; ZÜHLKE, S.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 2–7, 2009.

LEE, Y.; JANG, K.; CHA, J. Synergistic antibacterial effect between silibinin and antibiotics in oral bacteria. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–7, 2012.

LI, D. et al. Discovery of active components in herbs using chromatographic separation coupled with online bioassay. **Journal of Chromatography B**, v. 1021, p. 81–90, 2016.

LI, L. et al. Structure elucidation of a new friedelane triterpene from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 624–628, 2006.

LI, L. et al. A-seco-oleane-type triterpenes from *Phomopsis* sp. (strain HKI0458) isolated from the mangrove plant *Hibiscus tiliaceus*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 2, p. 511–517, 2008.

LI, T. X. et al. Synergistic antifungal meroterpenes and dioxolanone derivatives from the endophytic fungus *Guignardia* sp. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 11, p. 2511–2520, 2015b.

LI, Y. et al. The endophytic fungi of *Salvia miltiorrhiza* Bge.f.alba are a potential source of natural antioxidants. **Botanical Studies**, v. 56, n. 5, 2015a.

LIM, C. et al. Identification, fermentation, and bioactivity against *Xanthomonas oryzae* of antimicrobial metabolites isolated from *Phomopsis longicolla* S1B4. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 494–500, 2010.

LING, L. L. et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 455–459, 2015.

LIU, X. et al. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, n. 2, p. 241–247, 2008.

LIU, Y. et al. Sesquiterpenes from the Endophyte *Glomerella cingulata*. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 10, p. 2609–2614, 2017.

LODGE, D. J.; FISHER, P. J.; SUTTON, B. C. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. **Mycologia**, v. 88, n. 5, p. 733–738, 1996.

LUDWIG-MÜLLER, J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 7, p. 1325–1334, 2015.

MADHUSUDHAN, M. C.; BHARATHI, T. R.; PRAKASH, H. S. Isolation and purification of bioactive metabolites from fungal endophytes - a review. **Current Biochemical Engineering**, v. 2, n. 2, p. 111–117, 2015.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1–19, 2008.

MALIK, S. et al. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 23–34, 2011.

MAROLDI, M. M. C. et al. Potential of mangrove-associated endophytic fungi for production of carbohydrases with high saccharification efficiency. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, p. 806–820, 2018.

MARTINEZ-KLIKOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, 2016.

MARTÍNEZ-LUIS, S. et al. Antiparasitic and anticancer constituents of the endophytic fungus *Aspergillus* sp. strain F1544. **Natural product communications**, v. 7, n. 2, p. 165–168, 2012.

MAUBON, D. et al. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, p. 1241–1255, 2014.

MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, p. 757–766, 1991.

MOON, J.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1655–1666, 2009.

MORAIS, J. F. et al. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Revista UNINGÁ Review**, v. 17, n. 1, p. 27–34, 2014.

MORIO, F. et al. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 5, p. 599–606, 2017.

MORRISON, K. C.; HERGENROTHER, P. J. Natural products as starting points for the synthesis of complex and diverse compounds. **Nat. Prod. Rep.**, v. 31, n. 1, p. 6–14, 2014.

MÜLLER, Lars et al. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 6, p. 992–999, 2010.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

- NAKAMURA, C. V. et al. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 61–66, 2006.
- NASCIMENTO, A. M. et al. Antileishmanial activity of compounds produced by endophytic fungi derived from medicinal plant *Vernonia polyanthes* and their potential as source of bioactive substances. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 11, p. 1793–1800, 2015.
- NETO, P. A. D. S. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos Endofíticos: interação com plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 62–77, 2002.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215–234, 2000.
- NGUTA, J. M. et al. Antimycobacterial and cytotoxic activity of selected medicinal plant extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 182, p. 10–15, 2016.
- NINA, N. et al. Antibacterial activity, antioxidant effect and chemical composition of propolis from the Región del Maule, central Chile. **Molecules**, v. 20, n. 10, p. 18144–18167, 2015.
- NISA, H. et al. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, n. April, p. 1–10, 2015.
- OLIVEIRA, L. B. S. et al. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 511–523, 2016.
- OWNLEY, B. H.; GWINN, K. D.; VEGA, F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**, v. 55, n. 1, p. 113–128, 2010.
- PAN, F. et al. Fungal endophyte-derived *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*: diversity, antioxidant capacities *in vitro* and relations to phenolic, flavonoid or saponin compounds. **Scientific Reports**, v.7, n. 42008, 2017.
- PANG, X. et al. Metabolites from the plant endophytic fungus *Aspergillus* sp. CPCC 400735 and their anti-HIV activities. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 10, p. 2595–2601, 2017.
- PASUT, G.; VERONESE, F. M. PEG conjugates in clinical development or use as anticancer agents: An overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 13, p. 1177–1188, 2009.
- PATIL, M. P.; PATIL, R. H.; MAHESHWARI, V. L. Biological activities and identification of bioactive metabolite from endophytic *Aspergillus flavus* LI7 isolated from *Aegle marmelos*. **Curr Microbiol**, v. 71, n. 7, p. 39–48, 2015.

- PEREIRA, C. B. et al. Antifungal activity of eicosanoic acids isolated from the endophytic fungus *Mycosphaerella* sp. against *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 205–212, 2016.
- PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, v. 17, n. 5, p. 339–345, 2010.
- PÉREZ-BONILLA, M. et al. Isolation of antioxidative secoiridoids from olive wood (*Olea europaea* L.) guided by on-line HPLC–DAD–radical scavenging detection. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 36–41, 2011.
- PIMENTEL, M. R. et al. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnology Research International**, v. 2011, 2011.
- PONGCHAROEN, W. et al. Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. **Phytochemistry**, v. 69, n. 9, p. 1900–1902, 2008.
- PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 797–810, 2015.
- PRIOR, R.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.
- PRITI, V. et al. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? **Current Science**, v. 97, n. 4, 2009.
- PU, X. et al. Camptothecin - producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 21, p. 9365–9375, 2013.
- PURI, S. C. et al. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1717–1719, 2005.
- QADRI, M. et al. Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 8, 2013.
- QIU, M. et al. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 143–150, 2010.
- RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus *Aspergillus***. Baltimore: The Williams and Wilkins Co., p. 56-57, 1965.
- RATNAWEERA, P. B. et al. Antimicrobial activities of endophytic fungi obtained from the arid zone invasive plant *Opuntia dillenii* and the isolation of equisetin, from endophytic *Fusarium* sp. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 220, 2015.
- RAVINDRAN, C. et al. Antioxidants in mangrove plants and endophytic fungal associations. **Botanica Marina**, v. 55, n. 3, p. 269–279, 2012.

- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231–1237, 1999.
- REIS, A. S. et al. Atividade leishmanicida *in vitro* de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista Ciências da Saúde**, v. 14, p. 119–126, 2012.
- ROBARDS, K. et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 401–436, 1999.
- RODRÍGUEZ-PÉREZ, C. et al. Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 246–254, 2015.
- ROSA, L. H. et al. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 420–430, 2010.
- SAIKKONEN, K. et al. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 6, p. 275–280, 2004.
- SANTIAGO, I. F. et al. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, v. 16, n. 1, p. 95–103, 2012.
- SANTOS, L. S. et al. A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. **Revista Saúde e Biologia**, v. 8, n. 1, p. 92–101, 2013.
- SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 321–324, 2007.
- SEBASTIANES, F.L.S. [Divulgação de pesquisa]. 2010a. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/noticia/detalhe.php?id=1074>>. Acesso em: 23 mar. 2018.
- SEBASTIANES, F.L.S. **Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo**. 2010. 150f. Tese (Doutora em Ciências), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010b.
- SEBASTIANES, F. L. S.; AZEVEDO, J. L.; LACAVALA, P. T. Diversity and biotechnological potential of endophytic microorganisms associated with tropical mangrove forests. In: AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer Nature, Switzerland, p. 37–56, 2017.
- SEBASTIANES, F. L. S. et al. Isolation of the antibacterial agent viridiol from the mangrove endophytic fungus *hypocrea virens*, as monitored by a biologic assay against *Escherichia coli* and NMR spectroscopy. **Current Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 325–332, 2017.
- SEBASTIANES, F. L. S. et al. Genetic transformation of *Diaporthe phaseolorum*, an endophytic fungus found in mangrove forests, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Genetics**, v. 58, n. 1, p. 21–33, 2012a.

SEBASTIANES, F. L. S. et al. 3-Hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Current Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 622–632, 2012b.

SEBASTIANES, F. L. S. et al. Biodiversity and biotechnological potential of endophytic fungi from mangrove forest. In: GLEASON, G.; VICTOR, T. R. **Mangrove ecosystems: biogeography, genetic diversity and conservation strategies**, Nova Science Publishers, New York, v. 1, p. 1–33, 2013a.

SEBASTIANES, F. L. S. et al. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 153–166, 2013b.

SELIM, K. A. et al. High expression level of antioxidants and pharmaceutical bioactivities of endophytic fungus *Chaetomium globosum* JN711454. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 131–140, 2015.

SHARMA, R.; KUMAR, B. S. V. Isolation characterization and antioxidant potential of endophytic fungi of *Ocimum sanctum* Linn. (Lamiaceae). **Indian Journal of Applied Research**, v. 3, n. 7, p. 5–10, 2013.

SHIONO, Y. et al. New metabolites produced by *Fusarium solani* T-13 isolated from a dead branch. **Phytochemistry Letters**, v. 17, p. 232–237, 2016.

SHWETA, S. et al. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. **Phytochemistry**, v. 71, n. 1, p. 117–122, 2010.

SILVA, C. F. **Composição química e capacidade sequestrante de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de mel orgânico brasileiro**. 2017. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

SIMÕES, C. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universitária/UFRGS/Ed. da UFSC**, p. 724, 2007.

SINGH, B. et al. Antioxidant and *in vivo* genoprotective effects of phenolic compounds identified from an endophytic *Cladosporium velox* and their relationship with its host plant *Tinospora cordifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 450–456, 2016.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, EUA, v. 299, p. 152–178, 1999.

SOCHA, R. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. **Natural Product Research**, v. 29, n. 5, p. 416–422, 2014.

SONG, Y. X.; MA, Q.; LI, J. A new aurone glycoside with antifungal activity from marine-derived fungus *Penicillium* sp. FJ-1. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 40, n. 6, p. 1097–1101, 2015.

SOOSARAEI, M. et al. Medicinal plants with promising antileishmanial activity in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 21, p. 63–80, 2017.

- STIERLE, A. et al. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the pacific yew, *Taxus brevifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 9, p. 1315–1324, 1995.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew. **Science**, v. 260, p. 214–216, 1993.
- STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. **Microbial Endophytes**, n. January 2000, p. 3–29, 2000.
- STROBEL, G. et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, p. 179–183, 2002.
- STROBEL, G. A. et al. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 417–423, 1996.
- STROBEL, G. A. et al. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257–268, 2004.
- STROBEL, G. A. et al. The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladiurn roseum* (NRRL 50072). **Microbiology**, v. 154, n. 11, p. 3319–3328, 2008.
- STROBEL, G. A. Bioprospecting - fuels from fungi. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 5, p. 973–982, 2015.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.
- STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U. The biological promise of microbial endophytes and their natural products. **Plant Pathology Journal**, v. 4, n. 2, p. 161–176, 2005.
- SULAIMAN, S. F. et al. Effect of solvents in extracting polyphenols and antioxidants of selected raw vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4, p. 506–515, 2011.
- SUN, J.-F. et al. Pestalols A–E, new alkenyl phenol and benzaldehyde derivatives from endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. AcBC2 isolated from the Chinese mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n. 10, p. 451–457, 2014.
- SURYANARAYANAN, T. S. Endophyte research: going beyond isolation and metabolite documentation. **Fungal Ecology**, v. 6, p. 561–568, 2013.
- TADYCH, M.; BERGEN, M. S.; WHITE JR, J. F. *Epichloë* ssp. associated with grasses: new insights on life cycles, dissemination and evolution. **Mycologia**, v. 106, n. 2, p. 181–201, 2014.
- TAN, J. B. L.; LIM, Y. Y. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. **Food Chemistry**, v. 172, p. 814–822, 2015.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural**

Product Reports, v. 18, n. 4, p. 448–459, 2001.

THATOI, H. et al. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Annals of Microbiology**, v. 63, n.1, p. 1–19, 2012.

THATOI, H.; BEHERA, B. C.; MISHRA, R. R. Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review. **Mycology**, v. 4, n. 1, p. 54–71, 2013.

TIMURKAYNAK, F. et al. *In vitro* activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 3, p. 224–228, 2006.

TIVERON, A. P. et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–18, 2016.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, n. 750, 2017.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TSAVKELOVA, E. A. et al. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proliferatum* strain. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 10, p. 1393–1403, 2008.

VENUGOPALAN, A. et al. Effect of fermentation parameters, elicitors and precursors on camptothecin production from the endophyte *Fusarium solani*. **Bioresource Technology**, v. 206, p. 104–111, 2016.

VENUGOPALAN, A.; SRIVASTAVA, S. Endophytes as *in vitro* production platforms of high value plant secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 873–887, 2015.

VIEIRA, A. J. H.; DOS SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, 2017.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996.

WALL, P. E. Detection and visualisation. In: **Thin-Layer Chromatography: A Modern Practical Approach**. Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2005.

WALTERS, B. B. et al. Ethnobiology, socio-economics and management of mangrove forests: A review. **Aquatic Botany**, v. 89, n. 2, p. 220–236, 2008.

WANG, J. et al. Identification and bioactivity of compounds from the mangrove endophytic fungus *Alternaria* sp. **Marine Drugs**, v. 13, n. Mic, p. 4492–4504, 2015.

WANG, L.-W. et al. Natural products with antitumor activity from endophytic fungi. **Mini**

reviews in medicinal chemistry, v. 11, n. 12, p. 1056–1074, 2011.

WANG, X. et al. Advances in the study of the structures and bioactivities of metabolites isolated from mangrove-derived fungi in the South China sea. p. 3601–3616, 2013.

WANI, M. C. et al. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325–7, 1971.

WANI, Z. A. et al. Plant-endophyte symbiosis , an ecological perspective. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2015.

WILSON, D. The evolution of a term, and classification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, n. 2, p. 274–276, 1995.

WHITE, R. L. et al. Comparison of Three Different *in vitro* Methods of Detecting Synergy: Time-Kill, Checkerboard, and E-test. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, EUA, v. 40, n. 8, p. 1914–1918, 1996.

WHO. World Health Organization. **WHO to implement online epidemiological surveillance for leishmaniasis**. 2016. Disponível em <http://www.who.int/neglected_diseases/news/WHO_implement_epidemiological_surveillance_leishmaniasis/en/>. Acesso em 24/10/2017.

WRIGHT, G. D. Opportunities for natural products in 21 st century antibiotic discovery. **Natural Product Reports**, v. 0, p. 1–8, 2017.

WU, H. et al. Isolation and characterization of saponin-producing fungal endophytes from *Aralia elata* in Northeast China. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 16255–16266, 2012.

WU, H. et al. Diversity of endophytic fungi from roots of *Panax ginseng* and their saponin yield capacities. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 107, 2013.

WU, X. et al. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 4026–4037, 2004.

XU, B. J.; CHANG, S. K. C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, 2007.

XU, J. Bioactive natural products derived from mangrove - associated microbes. **RSC Advances**, v. 5, p. 841–892, 2015.

YADAV, M.; YADAV, A.; YADAV, J. P. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. S1, p. S256–S261, 2014.

YAN, T. et al. New flavonol and diterpenoids from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. YXf3. **Planta Medica**, v. 79, n. 5, p. 348–352, 2013.

- YE, Y. et al. Flavipin in *Chaetomium globosum* CDW7, an endophytic fungus from *Ginkgo biloba*, contributes to antioxidant activity. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97, p. 7131–7139, 2013.
- YUAN, L. et al. Labdane and tetranorlabdane diterpenoids from *Botryosphaeria* sp. MHF, an endophytic fungus of *Maytenus hookeri*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 92, n. 6, p. 1118–1125, 2009.
- ZENG, P. Y. et al. In vitro antioxidant activities of endophytic fungi isolated from the liverwort *Scapania verrucosa*. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 4, p. 3169–3179, 2011.
- ZHANG, J. et al. Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1469–1481, 2010.
- ZHANG, X.; WEI, W.; TAN, R. Symbionts, a promising source of bioactive natural products. **Science China Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 1097–1109, 2015.
- ZHANG, Y. et al. Alkaloids produced by endophytic fungi: a review. **Natural product communications**, v. 7, n. 7, p. 963–968, 2012.
- ZHAO, J. T. et al. Endophytic Fungi from Pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] produce antioxidant cajanin stilbene acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4314–4319, 2012.
- ZHAO, J. T. et al. *In vitro* antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from Pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Food Research International**, v. 56, p. 243–251, 2014.
- ZIN, W. W. M. et al. Antibacterial and antibiofilm activities of the metabolites isolated from the culture of the mangrove-derived endophytic fungus *Eurotium chevalieri* KUFA 0006. **Phytochemistry**, v. 141, p. 86–97, 2017.
- ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: Recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017.