

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

MARINA MIRANDA POLONI

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS
POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DO MANGUE**

Alfenas/MG
2014

MARINA MIRANDA POLONI

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS
POR FUNGOS ENDOFÍTICOS DO MANGUE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Alfenas/MG
2014

Poloni, Marina Miranda.

Estudo da produção de substâncias bioativas por fungos endofíticos do mangue. / Marina Miranda Poloni. - 2014.

57 f. -

Orientador: Masaharu Ikegaki.

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

Bibliografia.

1. Mangue. 2. Endofíticos. 3. Ensaio biológico. 4. Antimicrobianos.
I. Ikegaki, Masaharu. II. Título.

CDD: 615.32

Marina Miranda Poloni

**Estudo da produção de substâncias bioativas por fungos
endofíticos do mangue**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Aprovada em: 21/02/14

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

Instituição: Universidade Federal de São Carlos

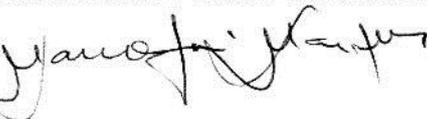
Assinatura:



Prof. Dr. Marcos José Marques

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

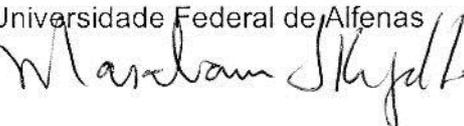
Assinatura:



Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Dedico este trabalho com gratidão e amor:

*Aos meus pais, Cleusa e Elson e
à minha irmã, Marília.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador Prof. Dr. Masaharu Ikegaki, que me acolheu na universidade e acreditou no meu potencial. Pelos conhecimentos transmitidos e pela oportunidade de execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava e a Dra. Fernanda L. S. Sebastianes por ter gentilmente concedido os fungos endofíticos do mangue que geraram os resultados da pesquisa.

À Universidade Federal de Alfenas e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelo apoio necessário para a realização deste e a Capes pela bolsa auxílio.

Ao grupo do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola (CPQBA-Unicamp), em especial Dra. Ana Lúcia T.G. Ruiz e Sirlene Tinti, pelos ensaios antiproliferativos e por ter me recebido no laboratório para acompanhar os testes realizados.

Ao Prof. Dr. Marcos José Marques e a discente Raissa Prado pela realização do teste leishmanicida.

Aos meus pais, Cleusa e Elson, por serem a base de tudo na minha vida, por terem me passado seus valores e morais e construído a pessoa que hoje sou.

À minha irmã, Marília, companheira fiel, meu outro eu.

À Prof. Dra. Ana Lúcia L. Moraes por sempre me estimular, confiar e torcer por mim. Assim como a Prof. Dra. Cristiane M. Grasseli que sempre guardarei no coração.

À grande amiga que conheci e que certamente será para a vida inteira, Patrícia L. N. Carvalho pela paciência, ensinamentos, conversas, desabafos, de imensa ajuda durante o curso do mestrado.

A amiga Taciane M. M. Hipólito, pela amizade, conhecimentos passados e momentos que passamos juntas no laboratório.

Ao técnico Gustavo Silveira pelas muitas conversas filosóficas e tantas outras não, mas que me fizeram crescer como pessoa.

Aos colegas de mestrado, em especial à Valéria M. L. Naves e Luis Felipe Cunha que se tornaram grandes amigos.

E a todos que participaram e me apoiaram mesmo que indiretamente durante estes dois anos, agradeço imensamente.

*“Não é o mais forte da espécie que sobrevive,
nem mesmo o mais inteligente, mas sim aquele
que responder melhor às mudanças”.*

Charles Darwin

RESUMO

Os micro-organismos endofíticos são aqueles que habitam o interior de um tecido vegetal, intra ou extracelularmente sem causar-lhe nenhum prejuízo. Eles possuem uma relação de simbiose (relação interespecífica de forma mutuamente vantajosa) com a planta e podem, por isto, sintetizar substâncias com alto potencial biotecnológico. Neste trabalho, objetivou-se a avaliação da capacidade dos fungos endofíticos isolados do mangue do litoral sul do estado de São Paulo, em produzirem compostos com atividade biológica: antimicrobiana, antiproliferativa, antioxidante e leishmanicida. Os extratos brutos de doze fungos endofíticos foram avaliados quanto a sua capacidade antimicrobiana contra uma bactéria Gram-positiva, uma bactéria Gram-negativa e uma levedura patogênica pelo método de microdiluição em placa. Três dos doze fungos endofíticos testados, *Diaporthe phaseolorum* 41.1(1), *Diaporthe sp.* 54(4) e *Gibberella moniliformis* 99(3), destacaram-se neste teste (CIM de 62,500 a 125,000µg/mL) e posteriormente, foram realizadas as demais avaliações de atividade biológica com eles. Verificou-se atividade antioxidante pelo método DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) abaixo dos valores encontrados para os padrões butil hidroxi tolueno (BHT) (66,310% ±0,019) e ácido ascórbico (96,047% ±0,005) para os extratos dos fungos testados: *D. phaseolorum* 41.1(1) (8,357% ±0,005), *Diaporthe sp.* 54(4) (8,747% ±0,018) e *G. moniliformis* 99(3) (29,640% ±0,011). Somente o extrato bruto do fungo *Diaporthe sp.* 54(4) apresentou atividade antiproliferativa contra as linhagens de células tumorais testadas. Foram necessários 2,700µg/mL para inibir 50% do crescimento de células de leucemia K562 e 7,200µg/mL para inibir a mesma porcentagem de células tumorais de glioma K51, sendo considerado um extrato com atividade moderada contra estas linhagens tumorais. O extrato do endófito *D. phaseolorum* 41.1(1) demonstrou melhor atividade leishmanicida, sendo que a concentração de 7,197µg/mL inibe o crescimento de cinquenta por cento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Estes resultados destacam a importância do estudo destes micro-organismos do mangue, pois eles podem ser uma fonte de várias substâncias com atividade de interesse farmacológico.

Palavras-chave: *Diaporthe phaseolorum*. *Diaporthe* sp. *Gibberella moniliformis*.
Mangue. Endófitos. Compostos Bioativos. Ensaios Biológicos.

ABSTRACT

Endophytic microorganisms are those that inhabit the interior of plant tissues, intra-or extracellularly without causing any damages. They have a symbiotic relation with the plant and they can synthesize substances with high biotechnological potential. This study aimed to review the capacity of mangrove endophytic fungi isolated from the southern coast of São Paulo state in producing compounds with biological activity: antimicrobial, antiproliferative and antioxidant. Twelve endophytic fungi extracts were screened for their antimicrobial properties against Gram-positive bacteria, a Gram-negative bacteria and pathogenic yeast by microdilution plate method. Three of them, *Diaporthe phaseolorum* 41.1 (1), *Diaporthe sp.* 54 (4) and *Gibberella moniliformis* 99 (3), stood out in this test (MIC 62.500 to 125.000 μ g/mL) and then were held other biological activities assays with them. The scavenging capacity (average sequestrant capacity \pm standard deviation), at 90 ppm was measured by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilidrazyl) method and it was found values found for BHT (butil hydroxi toluen) patterns (66.310% \pm 0.019) and ascorbic acid (96.047% \pm 0.005) and for the extracts of fungi tested which were below than the patterns: *D. phaseolorum* 41.1(1) (8.357% \pm 0.005), *Diaporthe sp.* 54(4) (8.747% \pm 0.018) and *G.moniliformis* 99(3) (29.640% \pm 0.011). Only the *Diaporthe sp.* 54(4) crude extract presented antiproliferative activity against tumor cell lines tested wich 2.7 μ g/mL of the crude extract were required for 50% growth inhibition of leukemia cells K562 and 7.2 μ g/mL to inhibit the same percentage of K51 glioma tumor cells, this extract can be considered moderately active against these tumor cell lines. The extract of the endophytic *D. phaseolorum* 41.1 (1) showed better leishmanicidal activity, whereas the concentration of 7.197 μ g/mL inhibits 50% of the growth of *Leishmania amazonensis* promastigote forms. These results highlight the importance of these mangrove microorganisms study and show that they can be a source of various substances with pharmacological interest activity.

Keywords: *Diaporthe phaseolorum*. *Diaporthe sp.* *Gibberella moniliformis*. Mangrove. Endophytes. Bioactive compounds. Biological Assays.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluoxograma de obtenção do extrato bruto a partir da cultura de um fungo endofítico.....	27
Figura 2 - Esquema do teste de sinergismo realizado em microplaca de 96 poços..	31
Figura 3– Fluoxograma das etapas do teste antiproliferativo pelo corante..... Sulforrodamina B.....	35
Figura 4 – Fluoxograma das etapas do teste leishmanicida in vitro.....	36
Figura 5 - Microplaca de 96 orifícios contendo o teste concentração inibitória mínima contra a bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	40
Figura 6 - Atividade antiproliferativa de Doxorrubicina	41
Figura 7 - Atividade antiproliferativa do extrato bruto do fungo endofítico <i>Diaporthe</i> sp. 54(4)	42
Figura 8 - Atividade antiproliferativa do extrato bruto do fungo endofítico <i>Gibberella moniliformis</i> 99(3)	43
Figura 9 - Atividade antiproliferativa do extrato bruto do fungo endofítico <i>Diaporthe phaseolorum</i> 41.1(1)	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fungos endofíticos de manguezais.....	26
Tabela 2 - Fórmula do caldo czapek	27
Tabela 3 - Linhagens celulares empregadas na determinação da citotoxicidade	33
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos brutos dos fungos endofíticos do mangue e dos padrões Cloranfenicol e Anfotericina B.....	37
Tabela 5 - Atividade antibacteriana ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos brutos dos fungos endofíticos e do padrão Cloranfenicol	38
Tabela 6 – Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de Doxorubicina e extratos brutos dos fungos endofíticos do mangue capazes de inibir 50% do crescimento (GI_{50} : <i>Growth Inhibition</i>) das células tumorais e queratinócitos (q)	43
Tabela 7 - Atividade antioxidante pelo método DPPH dos padrões ácido ascórbico e BHT e extratos dos fungos endofíticos do mangue	44
Tabela 8 - Atividade leishmanicida dos extratos brutos dos fungos endofíticos do mangue contra a forma promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i>	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1.	O manguezal	16
2.2.	Micro-organismos endofíticos.....	17
2.3.	Importância dos fungos endofíticos	18
2.2.1	Fungos endofíticos do mangue	20
2.2.2	Fungos endofíticos estudados.....	20
2.3	Atividades biológicas dos fungos endofíticos	21
2.3.1	Atividade antimicrobiana	21
2.3.2	Atividade antioxidante	22
2.3.3	Atividade antiproliferativa	23
2.3.4	Atividade leishmanicida	24
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	25
3.1	Isolados fúngicos.....	25
3.2	Obtenção dos extratos fúngicos	26
3.3	Determinação da atividade antimicrobiana.....	27
3.4	Avaliação da concentração bactericida e fungicida mínima	29
3.5	Atividade sinérgica	29
3.6	Determinação da atividade antioxidante.....	32
3.7	Determinação da atividade antiproliferativa.....	32
3.8	Determinação da atividade leishmanicida	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Biodiversidade é a variedade e a variabilidade existentes de formas de vida no ecossistema em que elas vivem. Um destes ecossistemas é o mangue que compreende uma área de transição entre o ambiente terrestre e marinho, característico de regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que há no mundo aproximadamente 18,1 milhões de hectares de manguezal (GOPAL; CHAUHAN, 2006) e o Brasil possui uma de suas maiores extensões (SOUSA, 2006) que compreende desde o Cabo Orange, no Amapá, até a foz do rio Ararangua, em Santa Catarina. O litoral do estado de São Paulo contém aproximadamente 240km² desta vegetação.

O manguezal possui grande biodiversidade de espécies vegetais e de micro-organismos que possuem várias características adaptativas devido à alta salinidade, ventos fortes, flutuação das marés, altas temperaturas, solo lodoso e com baixos teores de oxigênio. Como principais representantes destas espécies vegetais no litoral brasileiro são: *Rhizophora mangle* (mangue vermelho), *Avicennia nitida* (mangue Siriba) e *Laguncularia racemosa* (mangue branco).

As espécies encontradas no manguezal têm um grande potencial biotecnológico e são fontes para novos compostos que podem ter diversas aplicações na indústria farmacêutica com propriedade leishmanicida, anti-inflamatória, analgésica, diurética, cicatrizante, antibiótica, antifúngica, antitumoral, entre outras (STROBEL e DAISY, 2003). Há relatos da utilização da muda de *Rhizophora* na produção de combustíveis, taninos e corantes e sua ingestão na forma de bebida está relacionada a efeitos afrodisíacos, além de ser usada como inseticida e pesticida (BANDARANAYAKE, 2002).

Muitos micro-organismos já foram isolados do mangue (SAHOO; DHAL, 2009) e os seus fungos representam um grande grupo ecológico dos fungos marinhos e podem produzir substâncias químicas com novas funções e estruturas (CHEN et al., 2011, SEBASTIANES, 2010). Neste grupo encontram-se os fungos endofíticos que habitam o interior dos tecidos destas plantas sem apresentar efeitos patogênicos. Devido à simbiose existente entre fungo endofítico-planta hospedeira, várias substâncias podem ser sintetizadas pelos endófitos para promoverem o

crescimento e a proteção do vegetal contra o ataque de fitopatógenos (AZEVEDO et al., 2000).

Há vários relatos de compostos produzidos pelos fungos endofíticos do mangue com valor biotecnológico como enzimas, antimicrobianos, antioxidantes e outros princípios ativos com propriedades farmacológicas. Elavarasi, Rathna e Kalaiselvam (2012) relatou o isolamento de um fungo do mangue chinês que é produtor da substância taxol (conhecidamente como potente agente antitumoral). Esta mesma substância, atualmente é obtida a partir da fermentação do fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, isolado da planta *Taxus brevifolia*.

Os produtos naturais são uma grande fonte de pesquisa na obtenção de novos compostos bioativos para o tratamento de diversas doenças, entre eles os metabólitos secundários de micro-organismos. Segundo Schulz et al. (2002), seis dos vinte medicamentos mais prescritos são de origem fúngica, reforçando a importância de se estudar os metabólitos por eles produzidos.

A busca por novos compostos antimicrobianos (em razão à crescente resistência aos fármacos existentes), agentes quimioterápicos (para diminuir efeitos adversos), antioxidantes e leishmanicida tem gerado grande investimento nas pesquisas atuais. Portanto, como fonte promissora para estas novas moléculas, devem ser considerados os fungos endofíticos do mangue.

Visando a necessidade de busca por novos compostos bioativos mais efetivos e menos tóxicos há, nesta pesquisa, como objetivo, a investigação mais aprofundada *in vitro* sobre capacidade dos fungos endofíticos isolados do mangue em produzir metabólitos secundários que possuam interesse biotecnológico como atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Análise do FDA (*Food and Drug Administration*) realizada entre 1981 e 2002, sobre novos medicamentos aprovados, reforça a idéia de que os produtos naturais ainda constituem a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novos fármacos. Eles continuam a desempenhar papel central pelas indústrias farmacêuticas, mesmo diante da busca por outras estratégias (robótica, bioinformática, química combinatória), para descobertas de novas moléculas e fármacos inéditos (McCHESNEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007).

De acordo com Newman e Crag (2007), aproximadamente 63% e 75% dos fármacos aprovados entre 1981 e 2006 para combate do câncer e doenças infecciosas, respectivamente, foram oriundos de produtos naturais ou derivados deles. Cerca da metade de todos os fármacos utilizados são de origem natural e tendem a oferecer alta potência e seletividade, como resultado da própria evolução das plantas (PATERSON; ANDERSON, 2005). Associando este cenário ao sucesso dos avanços técnicos em métodos e técnicas analíticas, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, técnicas avançadas em biologia molecular e robótica, McChesney, Venkataraman e Henri (2007) relataram que com estas e outras ferramentas, torna-se possível remover grande parte das dificuldades encontradas com essas fontes de estudo.

Segundo Singh e Barret (2006), há duas fontes de antibióticos: produtos naturais e compostos sintéticos. Antibióticos provenientes de fontes naturais variam de pequenas a grandes moléculas, geralmente possuem estruturas complexas com grupos funcionais bem destacados, possibilitam o máximo de interações moleculares com o alvo e muitas vezes atuam somente nos patógenos e não no hospedeiro. Estas estruturas tendem a ser mais complexas e apresentarem mais centros de assimetria, de forma que, dificilmente serão produzidas comercialmente por síntese química (DEMAIN, 2000). Por outro lado, antibióticos de origem sintética têm desempenhado um papel menor como fontes de protótipos, podendo-se citar as sulfonamidas, as quinolonas e oxazolidinonas. Como exemplos de antibióticos derivados de produtos naturais podem-se citar os β -lactâmicos, glicopeptídeos e daptomicina (SINGH; BARRET, 2006).

A abundância dos compostos naturais ainda não descobertos, devido à vasta biodiversidade disponível, provavelmente dará condições à descoberta de fármacos no futuro, bem como possibilitará novas aplicações na agricultura (DEMAIN, 2000).

De acordo com a afirmação de pesquisadores, estima-se que cada espécie vegetal possua um ou vários microrganismos endofíticos ainda não descobertos ou descritos (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002) e considerando a grande biodiversidade da flora brasileira, há uma grande fonte destes ainda inexplorados. Assim, tendem a apresentar diversidades genéticas capazes de expressar compostos estruturalmente distintos e de bioatividades pouco conhecidas, gerando um potencial de aplicação para a produção em escala de compostos de alto valor agregado e um novo campo de estudo, no que se referem às aplicações desses metabólitos (NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004).

2.1 O MANGUEZAL

Segundo Schulz et al. (2002) para a otimização da busca por microrganismos produtores de metabólitos secundários alguns fatores devem ser considerados: os metabólitos secundários produzidos podem estar relacionados a seu respectivo nicho ecológico e as interações metabólicas podem aumentar a síntese destas substâncias.

Strobel e Daisy (2003) também fizeram hipóteses para guiar a escolha racional das plantas a serem utilizadas para o isolamento de endófitos. Para ele, vegetais provenientes de um bioma único, especialmente aqueles incomuns e que requerem estratégias de sobrevivência devem ser seriamente considerados; a etnobotânica também é uma forma de escolher as espécies. Vegetais que são endêmicos estão mais propensos a possuírem micro-organismos desse tipo que outras plantas e finalmente, plantas que crescem em áreas de grande biodiversidade tem a perspectiva de alocar grande diversidade de endófitos.

As áreas do mundo que possuem uma grande biodiversidade vegetal estão localizadas nas regiões de clima tropical e temperado (STROBEL; DAISY, 2003). Entre elas está o manguezal que é considerado um ecossistema de área úmida de transição entre o ambiente terrestre e marinho. Este ecossistema é um ambiente

único cujos vegetais estão adaptados às condições de salinidade, inundação com marés, ventos fortes, altas temperaturas, lodo e solo anaeróbico exigindo das espécies adaptação morfológica, fisiológica, biológica e ecológica para sobreviverem (SEBASTIANES, 2013; SAHOO; DHAL, 2009; SCHAEFFER-NOVELLI et al.,2000).

Algumas espécies do mangue como o mangue branco (*Laguncularia racemosa*) e o mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) sintetizam substâncias (sais, ácidos orgânicos, carboidratos, benzoquinonas, sesquiterpenos, triterpenos, alcaloides, flavonoides, derivados sulfurosos e taninos) utilizados na área médica, agrônômica e cosmética (SEBASTIANES, 2010).

Do manguezal brasileiro, no litoral do estado de São Paulo, foram isolados cerca de 4300 fungos endofíticos e 344 foram identificados por Sebastianes (2013). Destes foram observados 35 gêneros diferentes sendo que os mais frequentes são *Diaphorte*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Xylaria*. E uma substância antibiótica produzida pelo fungo *Diaphorte phaseolorum* foi identificada, como ácido 3-hidroxiopropiônico sendo o primeiro relato dela como antimicrobiano.

2.2 MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Os micro-organismos endofíticos foram descobertos há mais de cem anos e de acordo com a etimologia, o termo endófito deriva do Grego, ‘*éndon*’ que significa dentro e ‘*phytón*’, planta (JALGAONWALA et al., 2011). Este leva a uma definição abrangente e amplamente aceita feita por Bacon, White e Stone (2000): “são micro-organismos que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar quaisquer efeitos negativos evidentes”. Outra interpretação já bastante específica foi feita a qual considera que todos os micro-organismos tendem a habitar, pelo menos em um período do seu ciclo de vida, o interior de um vegetal, sendo desta forma, considerado endófito (KUMARESAN e SURYANARAYANAN, 2001; AZEVEDO et al., 2000).

A relação estabelecida entre hospedeiro e planta é denominada mutualística ou simbiótica (SEBASTIANES et al., 2012; NETO; AZEVEDO, 2004; STROBEL;

DAISY, 2003; AZEVEDO, 2000), em que o micro-organismo recebe de seu hospedeiro, proteção e nutrientes necessários para a sua sobrevivência, e, concomitantemente, produz compostos químicos que, em condições de estresse da planta, aumentam sua capacidade competitiva e sua resistência (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Estes compostos químicos são os metabólitos primários e secundários, cuja bioatividade pode auxiliar o crescimento do hospedeiro pela produção de fitoreguladores responsáveis pelo desenvolvimento do vegetal (NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004), proteger as plantas contra ataque de fitopatógenos (SEBASTIANES, 2013), contribuir para a adaptação do vegetal ao meio ambiente (diminuir a herbivoria). Além disso, os endófitos se tornam potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica por poderem ser utilizados também para obtenção de enzimas, vitaminas, pigmentos, toxinas, agentes antitumorais, antimicóticos, anticânceres, dentre outros (STROBEL; DAISY, 2003).

Embora ainda não esteja esclarecida a relação endófito e hospedeiro (PIMENTEL et al. 2010), é possível sugerir que, em tempo evolutivo, ocorreu recombinação genética entre eles, com captação de parte do DNA do hospedeiro vegetal para o interior do genoma fúngico (e vice-versa). Assim, é possível compreender a capacidade de metabolização de algumas substâncias tipicamente produzidas por cada um deles, sendo importante exemplificar a produção de paclitaxel (Taxol) pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae* cujo hospedeiro é *Taxus brevifolia*, planta de onde originalmente foi isolado o Taxol (BORGES et al., 2009; STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

2.3 IMPORTÂNCIA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Recentemente, inúmeros trabalhos com micro-organismos endofíticos foram publicados (SEBASTIANES et al, 2013; SEBASTIANES et al, 2012; SINGH et al., 2011; CARVALHO et al.; 2012; PANDI; MANIKANDAN; MUTHUMARY, 2010; FERNANDES et al., 2009), evidenciando a importância de se estudá-los. Entretanto, se for considerando que em cada uma das 300 mil espécies vegetais existentes no mundo possa existir pelo menos um endófito (AZEVEDO et al., 2000) e que somente

algumas foram estudadas, a possibilidade da descoberta de novos compostos bioativos e novas moléculas tornam-se enormes, existindo ainda inúmeras fontes em potencial a serem exploradas (SURYANARAYANAN et al., 2009), com destaque para fungos e bactérias, que são os micro-organismos mais comumente isolados como endófitos (STROBEL; DAISY, 2003), existindo também relatos de protozoários e nematódeos (GAMBOA; BAYMAN, 2001).

Em trabalho publicado por Hawksworth (2001), o autor estima que existam cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos distribuídos na natureza. Destes, somente 150.000 foram descritos em literatura e apenas 15.000 verificados quanto à produção de algum tipo de metabólito secundário. Em artigo de revisão, Strukel e Radić (2012) apontam que ao longo de mais de 20 anos, os fungos endofíticos têm sido explorados como fábricas de compostos bioativos com grande sucesso. Neste contexto, há uma grande probabilidade de existirem fungos endofíticos como fonte rica de compostos bioativos com grande potencial medicinal e agrícola ainda não relatados (SEBASTIANES et al., 2012; TAN; ZOU, 2001).

Desde que o primeiro fungo endofítico foi identificado, muita atenção tem sido dada à exploração de novas substâncias que podem ser sintetizadas por eles. Esta habilidade também se torna de extrema importância por fornecer uma alternativa à exploração vegetal de crescimento lento, ajudando a preservar a biodiversidade da fauna, cada vez menor no mundo (CARVALHO et al., 2012) além de reduzir o valor de mercado de tais substâncias (SEBASTIANES et al., 2012; STROBEL; DAISY, 2003).

O produto natural paclitaxel (taxol) foi o precursor do reconhecimento dos fungos endofíticos como uma importante fonte de produção de substâncias bioativas, devido à descoberta do endófito *Taxomyces andreanae* em 1993, produtor de tal composto. (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Nos anos subsequentes, vários outros fungos endofíticos, isolados de uma vasta gama de espécies vegetais, foram detectados como produtores de taxol, indicando que a produção deste importante composto se tornou muito mais ampla em fungos do que é em plantas (ALY et al., 2010).

Os endófitos podem produzir uma infinidade de compostos como os alcaloides, quinolonas, flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides, terpenoides, xantonas e outros (PIMENTEL et al., 2011; TAN; ZOU, 2001) que conferem inúmeras atividades biológicas tais como antitumoral, antidiabética, inseticida,

imunossupressiva, antioxidante, antiparasitária e antimicrobiana (PIMENTEL et al., 2011; GUO et al., 2008; MAHESHWARI, 2006). Devido à produção destas substâncias com grande potencial terapêutico, tem aumentado o interesse pelo estudo e descoberta de novos fungos endofíticos (STRUKEL; RADIĆ, 2012).

2.3.1 Fungos endofíticos do mangue

Situados na interface entre terra e mar, os manguezais são ambientes bem adaptados às condições de estresses naturais como temperatura, salinidade, anóxia e radiação ultravioleta. Devido à necessidade de adaptação para sobrevivência neste ecossistema complexo, muitos micro-organismos, especialmente os fungos, tornam-se uma rica fonte para descoberta de novas moléculas terapêuticas ativas (SEBASTIANES, 2013) com as mais diversas atividades biológicas.

Em estudos, Huang et al. (2008) caracterizaram cinco compostos obtidos do fungo endofítico ZSU-H76, isolado de uma árvore do mangue chinês *E. agallocha*. Dentre estes compostos, dois apresentaram uma satisfatória atividade antifúngica contra *Candida albicans* e *Fusarium oxysporum*, cujas concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram, respectivamente, 32 e 64 µg/mL.

Em 2011, Buong e colaboradores estudaram a atividade antimicrobiana de extratos brutos de fungos endofíticos do mangue. Em triagem, os autores avaliaram um total de 385 extratos provenientes de 150 fungos endofíticos isolados de folhas e ramos de doze espécies de mangue. Os extratos mais ativos pertenceram a seis gêneros fúngicos: *Acremonium*, *Diaporthe*, *Hypoxylon*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* e *Xylaria*. O isolado *Phomopsis* sp. MA194, proveniente de *Rhizophora apiculata*, mostrou maior espectro antimicrobiano, com baixos valores de CIM de 8-32 µg/mL contra bactérias Gram-positivas se a matriz (substrato da fermentação) não for inerte.

2.3.2 Fungos endofíticos estudados

O produto de fermentação dos isolados endofíticos *Diaporthe sp.*, *Gibberella moniliformis* e *Diaporthe phaseolorum* foram estudados no presente trabalho com o propósito de avaliar a bioatividade de cada um dos extratos obtidos.

Na literatura consultada, encontram-se poucos relatos sobre os fungos endofíticos mencionados, os quais são descritos também como fitopatógenos causadores de podridão em milho, soja e outras espécies de cultivo, tornando-se preocupantes por serem possíveis contaminantes de alimentos e rações, impulsionando pesquisas como a realizada por Yamamura e Shim (2008). Estes autores buscaram identificar o mecanismo de ação pelo qual uma proteína expressa por *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (teleomorfo *Gibberella moniliformis* Wineland) é responsável por ocasionar a podridão do milho que culmina com grandes perdas econômicas.

O gênero *Diaporthe* sp, possui potencial para o controle biológico (ASH et al. 2010), a promoção do crescimento e tem sido descrito como um produtor de antibiótico (DETRAKUL et al., 2003; BANDRE; SASEK, 1977), pois sua produção de metabólitos secundários é grande (ELSAESSER et al., 2005; ISAKA et al., 2001).

Em estudos realizados por Sebastianes et al. (2012), foram isolados 4300 fungos endofíticos, dentre eles, 344 foram identificados, sendo os mais frequentes, os fungos dos gêneros *Diaphorte*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Xylaria*. Neste mesmo estudo, foi isolado o ácido 3-hidroxiopropiônico do fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum* obtido dos galhos de *Laguncularia racemosa*, coletada em manguezais de Bertioga e Cananéia, estado de São Paulo. O composto apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Salmonella typhi* com CIM de 64 µg/mL para ambas as linhagens (SEBASTIANES, 2013).

2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

2.3.1 Atividade antimicrobiana

Antibiótico é definido como uma substância de baixo peso molecular produzido por micro-organismos que tem atividade em baixas concentrações contra

outros micro-organismos (STROBEL e DAISY, 2003). A resistência a antimicrobianos tem sido um grande problema atual, devido isto é de grande importância a pesquisa de novos compostos com esta atividade. Os produtos naturais, entre eles os metabólitos de origem dos fungos endofíticos representam uma fonte promissora destes (ARIVUDAINAMBI et al., 2011; BUATONG, J. et al., 2011).

Diversos fungos endofíticos foram identificados como produtores de substâncias antimicrobianas. Sebastianes et al. (2012) identificou o ácido 3-hidroxi propiônico (3-APA) a partir do produto de fermentação do fungo endofítico *Diaporthe phaseolorum*, isolado da espécie *Laguncularia racemosa* do mangue. Este composto apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *Salmonella typhi*.

Em um estudo Buatong et al. (2011) isolou fungos endofíticos de folhas e galhos de 12 espécies vegetais do mangue coletados do sul da Tailândia. Foram testados 385 extratos brutos de 150 fungos endofíticos isolados. Dentre os isolados, 92 produziram compostos que tem atividade antimicrobiana, a maior parte contra *S. aureus* (CIM/CBM 4–200/64–200 µg/ml). Apenas dois extratos inibiram *P. aeruginosa* (CIM /CBM 200/>200 µg/ml) e nenhum dele inibiu *E. coli*.

Outro exemplo de fungos endofíticos com atividade antimicrobiana foi a pesquisa de Fernandes et al. (2009) que isolou do café (*Coffea arabica*), 22 fungos endofíticos. Um dos fungos de importante resultado foi o *Alternaria alternata*, do qual seu extrato diclorometânico apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922 e *C. albicans* ATCC 69548).

2.3.2 Atividade antioxidante

Evidências demonstram que as espécies reativas de oxigênio (ROS) e os derivados de radicais livres estão envolvidos em uma série de doenças degenerativas e em uma variedade de efeitos patológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, diabetes e artrite reumatoide. O tratamento com antioxidantes é uma abordagem terapêutica eficaz para prevenir ou atenuar doenças ROS-associadas. Portanto, mais atenção tem sido dada para descobrir potentes antioxidantes de plantas, animais e microorganismos (YE et al, 2013).

Muitos estudos associam a produção de compostos antioxidantes dos fungos endofíticos com plantas medicinais, principalmente as empregadas na medicina tradicional chinesa para o tratamento e prevenção do câncer (HUANG et al., 2007; LIU et al., 2007).

Recentemente, YE et al. (2013) avaliou tanto *in vivo* quanto *in vitro* a atividade antioxidante de uma substância (flavipina) produzida pelo *Chaetomium globosum* CDW7, um fungo endofítico da *Ginkgo biloba*. Neste estudo, foi demonstrado que a flavipina apresenta atividade antioxidante *in vitro* mais potente que os padrões BHT (di-terc-butil metil fenol), vitamina C e trolox tanto pelo método ABTS quanto pelo DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).

O extrato bruto do fungo endofítico *Paraconiothyrium* sp P83F4/1 isolado da planta *Rheedia brasiliensis* por Carvalho et al. (2012) foi testado quanto a sua capacidade antioxidante pelo método DPPH e obteve uma atividade superior a do padrão analisado BHT.

2.3.3 Atividade antiproliferativa

O câncer é um grupo de doenças que pode atingir vários órgãos do organismo e é caracterizado pelo crescimento desregulado e proliferação de células anormais e invasão ao tecido normal (KHARWAR et al., 2011; PIMENTEL et al., 2011). Estas doenças tem-se tornado um crescente problema de saúde pública devido a seu alto índice de morbidade e mortalidade (ZHANG et al., 2010).

Foi estimado que 7,6 milhões de pessoas em todo mundo morreram em 2007 devido ao câncer. Este número deverá subir para 17,5 milhões em 2050, devido ao envelhecimento da população assim como pelo estilo de vida e influências ambientais, incluindo o tabagismo e a exposição a agentes cancerígenos (KHARWAR et al., 2011).

Os agentes antitumorais apresentam uma toxicidade inespecífica a proliferação de células normais, possuem enormes efeitos colaterais, não são eficazes contra muitos tipos de câncer (PIMENTEL et al., 2011) e também sofrem limitações contra as células tumorais multirresistentes as drogas (ZHANG et al., 2011).

Há evidências que os metabólitos secundários produzidos pelos endófitos possam ser uma grande alternativa a descoberta de novas drogas, já que muitos produtos naturais de plantas, micro-organismos e fontes marinhas foram identificados como agentes antitumorais (FIRAKOVA, STURDIKOVA; MUCKOVA, 2007).

Além do exemplo mais conhecido de substância antitumoral produzida por um fungo endofítico (paclitaxel), foi descoberto também o alcaloide “camptothecin”. Esta substância é um potente agente antineoplásico primariamente isolada do vegetal *Camptotheca acuminata* Decaisne (Nyssaceae), na China (PIMENTEL et al., 2011). Uma pesquisa feita por Kusari, Zuhlke e Spitteller (2009) relatou o isolamento do fungo endofítico *Fusarium solani* que é produtor de “camptothecin”, deste mesmo vegetal. A “camptothecin” e o “10-hidroxicamptothecin” são importantes precursores para a síntese de duas drogas antitumorais, o topotecan, and irinotecan (PIMENTEL et al., 2011).

A vinblastina e a vincristine são dois alcaloides naturais das espécies *Catharanthus roseus* ou *Vinca rósea* comumente utilizados no tratamento de linfoma e leucemia, respectivamente (CHANDRA, 2012). Kharwar et al. (2008) isolou um total de 183 fungos endofíticos a partir de *Catharanthus roseus*, coletado de dois locais no norte da Índia. Este estudo revelou dois fungos isolados do floema da planta eram os responsáveis pela produção dos vinca alcaloides existentes.

Os alcaloides são substâncias comumente produzidas pelos fungos endofíticos, como os gêneros *Xylaria*, *Phoma*, *Hypoxylon* e *Chalara*. Estes representam um importante grupo produtor de substâncias conhecidas como citochalasin, que possuem atividade antitumoral e antibiótica, porém, devido a sua alta toxicidade celular ainda não foram desenvolvidos fármacos a partir delas (STROBEL e DAISY, 2003).

2.3.4 Atividade leishmanicida

Leishmaniose é uma doença infecciosa, que está entre as doenças tropicais mais negligenciadas (MACEDO-SILVA et al., 2013), transmitida por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (MACIEL-RESENDE et al., 2013). É uma

doença endêmica de regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (MACIEL-RESENDE et al., 2013) e anualmente surgem dois milhões de novos casos com altos índices de morbidade e mortalidade (MACEDO-SILVA et al., 2013).

A *Leishmania amazonensis* o agente etiológico de vários casos de leishmanioses nos países da América do Sul. No Brasil, esta espécie pode causar duas formas clínicas distintas: a leishmaniose cutânea localizada e a leishmaniose cutânea difusa (MACIEL-RESENDE et al., 2013).

Atualmente, não existem vacinas eficazes contra a leishmaniose (SILVA et al., 2013) e apesar dos esforços para seu desenvolvimento e o controle do vetor, a quimioterapia é o método mais eficaz de tratamento (MACIEL-RESENDE et al., 2013; GONTIJO et al., 2012). As drogas de primeira escolha para o tratamento são os antimoniais pentavantes, porém se tornam um problema devido a alta prevalência de resistência nas áreas endêmicas (MACIEL-RESENDE et al., 2013; SILVA, 2013). Já a Anfotericina B e a pentamidina são de segunda escolha apesar das desvantagens significativas, especialmente em termos de eficácia, duração do tratamento, via de administração, toxicidade e custo (MACIEL-RESENDE et al., 2013; CAMPOS et al., 2008).

Alguns estudos têm demonstrado que os fungos endofíticos possam produzir metabólitos secundários contra esta doença. Santiago et al., 2011 isolou 564 fungos endofíticos de duas angiospermas provenientes da Antártida que foram testados quanto a sua capacidade leishmanicida contra a forma promastigota de *L. amazonensis* e destes, dezenove apresentaram atividade.

Já Campos et al., 2008 isolou um fungo endofítico da planta *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae) que apresentou atividade leishmanicida contra formas amastigotas de *L. amazonensis*.

3 PARTE EXPERIMENTAL

Para os testes foram utilizados doze isolados fúngicos endofíticos obtidos de folhas e ramos de espécies vegetais de mangue Siriba (*Avicennia nítida*), mangue branco (*Laguncularia racemosa*) e mangue vermelho (*Rhizophora mangle*) encontrados em Bertioga e Cananéia, litoral sul do estado de São Paulo, Brasil isolados pela Dra. Fernanda L. S. Sebastianes.

Estes isolados foram gentilmente cedidos pelo professor Dr. Paulo Teixeira Lacava e estão armazenados na coleção do Setor de Genética de Microrganismos do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Brasil (Tabela 1).

Tabela 1- Fungos endofíticos de manguezais

Isolado	Identificação	Local	Órgão
8(3)	<i>Lasiodiplodia rubropurpurea</i>	Bertioga/SP	Ramo/L
36(3)	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Bertioga/SP	Folha/R
50(3)	<i>Aspergillus sp.</i>	Bertioga/SP	Folha/A
54(4)	<i>Diaporthe sp.</i>	Cananéia/SP	Ramo/L
60(4)	<i>Penicillium sp.</i>	Cananéia/SP	Ramo/L
82(4)	<i>Aspergillus awamori</i>	Cananéia/SP	Folha/L
89(3)	<i>Hypocrea virens</i>	Bertioga/SP	Folha/A
99(3)	<i>Gibberella moniliformis</i>	Bertioga/SP	Folha/L
29.6(3)	<i>Neofusicoccum vitifusiforme</i>	Bertioga/SP	Ramo/R
9.3(1)	<i>Gibberella moniliformis</i>	Bertioga/SP	Ramo/R
39.1(1)	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Bertioga/SP	Ramo/R
41.1(1)	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	Bertioga/SP	Folha/L

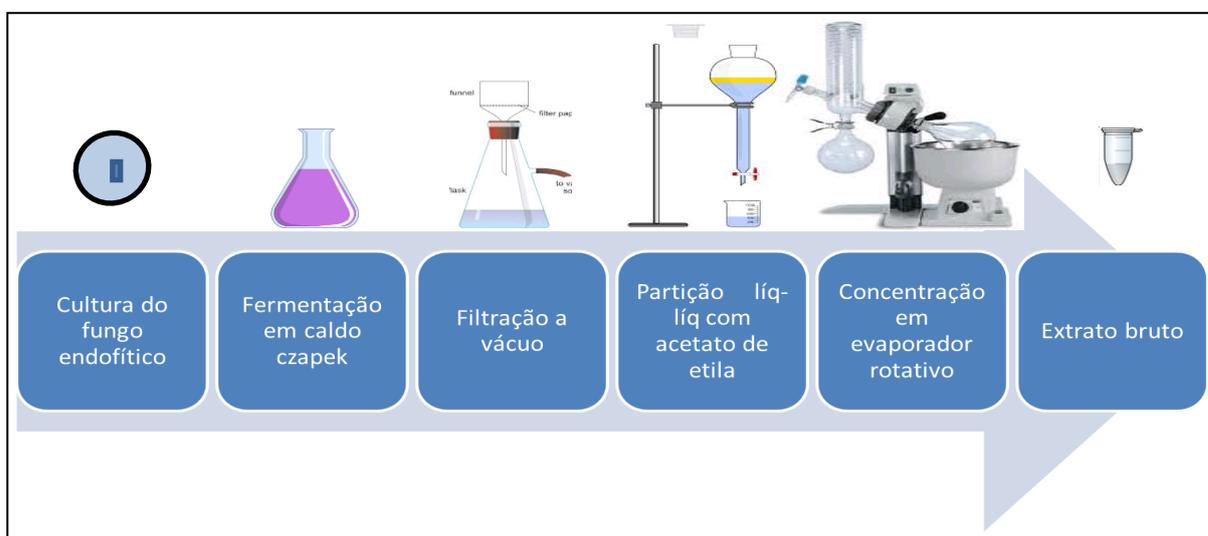
Nota: A: *Avicennia nítida*; L: espécie *Laguncularia racemosa*; R: *Rhizophora mangle*.
Fonte: SEBASTIANES, 2010 (modificado).

3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS

Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos foram obtidos a partir de fermentação em meio líquido. O mesmo processo foi realizado para todos os fungos separadamente. Primeiro, o fungo foi cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias à temperatura de 28°C. Em seguida, discos (5mm) de micélio das culturas recentes em BDA foram cortados e inoculados em Erlenmeyers de 500mL, contendo 200mL 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 – qsp 1000mL] (RAPER; FENNELL, 1965). e incubados a 28°C por 14 dias em condições estáticas e na ausência de luz em câmara incubadora para demanda bioquímica do oxigênio (DBO).

Após o período de crescimento, o micélio foi separado do meio de cultura por filtração a vácuo e com o filtrado obtido foi realizada partição líquido-líquido com o solvente acetato de etila na proporção de (1:1) v/v, por três vezes. A fração orgânica obtida foi concentrada em evaporador rotativo a vácuo obtendo-se assim, o extrato bruto (EB).

Figura 1: Fluxograma de obtenção do extrato bruto a partir da cultura de um fungo endofítico.



Fonte: Da autora

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os doze extratos brutos obtidos foram testados contra uma bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538), uma bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922) e um fungo patogênico (*Candida albicans* ATCC 10231) a fim de se conhecer o perfil de ação de cada um.

Após o resultado, foram escolhidos três extratos para aprofundamento do estudo antimicrobiano com outras cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas provenientes de isolados clínicos (*Serratia marcescens*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*, *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus* resistente a Oxacilina) e de cepas padrão (*Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus mirabilis* ATCC 25933 e *Bacillus cereus* ATCC 11778).

Para determinar a atividade antibacteriana de cada extrato bruto foi adotada a metodologia de microdiluição em caldo, utilizando microplacas de 96 orifícios de acordo com as instruções do protocolo M07-A8 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009).

As cepas utilizadas foram previamente cultivadas (24 horas antes) e preparadas suas suspensões em solução salina (NaCl 0,9%) estéril a 75% de transmitância em 660nm, de modo a fornecer 3×10^8 UFC. mL⁻¹ padronizado de acordo com a escala 0,5 de MacFarland.

Nas microplacas de 96 poços, foram depositados 100µL da mistura final: caldo Müeller-Hinton, solução do extrato bruto e suspensão do micro-organismo a ser testado. Foram utilizadas concentrações de 1,95 a 1000,00µg/mL da mistura final de EB e Cloranfenicol (na mesma concentração dos extratos brutos).

Realizou-se controle de crescimento da cepa cujo poço da placa foi adicionando somente a suspensão do micro-organismo e o meio de cultura. Outro poço foi utilizado para o controle de esterilidade do caldo Müller-Hinton, onde se adicionou somente o caldo referido. E o controle do solvente utilizado na solubilização do EB foi feito em outro poço onde foi adicionado o meio de cultura, a cepa testada e o solvente. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Na avaliação da atividade antifúngica, utilizou-se a microdiluição em caldo segundo o protocolo M27-A2 (CLSI, 2008), com modificações. A ação dos extratos foi verificada contra a levedura *C. albicans* ATCC 10231. Neste ensaio, utilizou-se a Anfotericina B como controle positivo nas concentrações de 0,19µg/mL, 0,39µg/mL, 0,78µg/mL, 1,56µg/mL, 3,12µg/mL, 6,25µg/mL, 12,5µg/mL, 25,00µg/mL, 50,00µg/mL

e 100,00µg/mL. As amostras, no entanto, foram avaliadas nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios de determinação da atividade bacteriostática. O controle do solvente também foi feito. Na avaliação da atividade fúngica foram realizados os mesmos procedimentos que na bacteriana, com exceção em relação ao meio de cultura, que foi adicionado 2% de extrato de levedura ao caldo Müller-Hinton e a leitura realizada após 48 horas de incubação.

Considerou-se como concentração inibitória mínima a faixa de concentração com menor valor, na qual não foi detectado o crescimento microbiano. Para a visualização do crescimento foi utilizado o revelador resazurina, conforme indicam alguns autores (SARKER; NAHAR; KUMARASAMYC, 2007; MANN; MARKHAM, 1998). A solução de resazurina (Sigma Aldrich®) foi preparada dissolvendo-se 10mg em 400mL de água destilada.

Para a revelação das placas, foram adicionadas 50µL desta solução em cada poço da microplaca e após 2 horas de incubação (na mesma temperatura usada no ensaio) foi feita a leitura. Os poços que estavam com a cor rosa indicavam que houve crescimento microbiano e, com a cor azul, a ausência dele.

3.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA E FUNGICIDA MÍNIMA

Para a realização deste ensaio foram utilizadas como inóculo as concentrações que não apresentaram crescimento microbiano do teste de concentração inibitória mínima. Foram retirados 50µL de cada poço e inoculados em placa com meio de cultura e posteriormente incubadas a 37°C, por 24 horas.

A concentração bactericida ou fungicida mínima é considerada aquela CIM que não há crescimento no ágar inoculado, ou seja, 99,9% de morte microbiana.

3.4 ATIVIDADE SINÉRGICA

Para avaliar se a combinação do extrato fúngico com outro agente antimicrobiano produz ação sinérgica foi utilizado o método de microdiluição “chequerboard” conforme a técnica descrita por White et al. (1996).

Para tal teste foi utilizado o micro-organismo patogênico *S. aureus* ATCC 6538, o extrato bruto do fungo endofítico *D. phaseolorum* 41.1(1) e o antibiótico padrão Amoxicilina. A série de diluições do extrato e do agente antimicrobiano utilizado (Amoxicilina padrão) variou a partir da metade da concentração inibitória mínima de cada um conforme a Figura 1.

Ao final, teve-se em cada poço 100 µL da mistura: caldo Miller-Hinton, solução do extrato fúngico diluído, solução do antimicrobiano diluído e suspensão do micro-organismo a ser testado.

O efeito das combinações foi obtido a partir do cálculo da concentração inibitória fracionária (FIC) para cada agente nas concentrações utilizadas de acordo com as equações abaixo:

$$FICI = FIC_e + FIC_a$$

Onde:

FIC_e (concentração inibitória fracionária do extrato fúngico)

$$= \frac{\text{CIM do extrato em combinação com o antimicrobiano}}{\text{CIM do extrato}}$$

FIC_a (concentração inibitória fracionária do antimicrobiano)

$$= \frac{\text{CIM do antimicrobiano em combinação com o extrato}}{\text{CIM do antimicrobiano}}$$

Os índices obtidos foram interpretados da seguinte maneira: sinérgico quanto $FICI \leq 0.5$; indiferente, $FICI$ entre 0.5 e ≤ 4 e antagônico quanto $FICI > 4$ (Odds, 2003; Petersen et al., 2006; White et al., 1996).

Figura 2- Esquema do teste de sinergismo realizado em microplaca de 96 poços

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91
	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1
B	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91
	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1
C	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91
	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1
D	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91
	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1
E	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91
	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1
F	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91	Ext 125	Ext 62,5	Ext 31,25	Ext 15,63	Ext 7,81	Ext 3,91
	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1	Ant 1
G	Contr +	Contr +	Contr +	Contr -	Contr -	Contr -						
H	Ant 8	Ant 8	Ant 8	Ant 4	Ant 4	Ant 4	Ant 2	Ant 2	Ant 2	Ant 1	Ant 1	Ant 1

Nota: Ext: extrato bruto do fungo endófitico *D. phaseolorum* 41.1(1) com suas respectivas concentrações ($\mu\text{g/mL}$) avaliadas; Ant: Amoxicilina, utilizada com o antibiótico padrão com suas respectivas concentrações; Cont +: controle de crescimento do micro-organismo avaliado; Cont -: controle de esterilidade do meio de cultura.

Fonte: Da autora.

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O poder antioxidante dos extratos de fermentação dos fungos endofíticos foi mensurado através da capacidade sequestrante de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), seguindo a metodologia descrita por Miranda; Fraga (2006) e Yen; Chang; Duh (2005) com algumas modificações.

Foram preparados 4,00mL de soluções de cada extrato e do caldo czapek na concentração de 9 µg/mL (90 ppm) e adicionado 1,00mL de solução do radical DPPH (0,5 mM). A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos. Após este tempo, foi efetuada a leitura, em triplicata, em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517nm.

O álcool etílico foi utilizado como branco e como controle negativo, a solução de DPPH. Como padrões foram preparadas soluções de ácido ascórbico e BHT (butil hidroxi tolueno) na mesma concentração dos extratos avaliados.

A degradação do DPPH foi avaliada em comparação com o controle negativo e sua capacidade sequestrante foi calculada a partir da fórmula:

$$AA(\%) = 100 - \left(\frac{((Aa - Ab) \times 100)}{Ac} \right) \quad \text{Fórmula (1)}$$

Onde:

Aa = absorvância da amostra

Ab = absorvância do branco

Ac = absorvância do controle negativo

O teste avaliou se os resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), utilizando-se o programa MatLab 7.0.

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Para a avaliação da atividade antiproliferativa dos extratos fúngicos foi realizado o ensaio da sulforodamina B (SRB) de acordo com Monks et al. (1991).

Este teste baseia-se na coloração das proteínas celulares pelo corante SRB que em condições levemente ácidas se liga aos resíduos de aminoácidos básicos das células fixadas na placa.

Foram utilizadas nove linhagens de células tumorais humanas e uma linhagem de célula humana normal imortalizada (queratinócito) (TABELA 3). Estas linhagens foram cedidas gentilmente pelo *National Cancer Institute* e mantidas no laboratório de cultura de células do Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola – CPQBA/UNICAMP, Paulínia-SP, onde foram realizados os ensaios por Dra Ana Lúcia T. G. Ruiz. As células são armazenadas em frascos de 25cm³ com 5mL de meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Tabela 3- Linhagens celulares empregadas na determinação da citotoxicidade

Linhagem	Órgão/doença	Origem embrionária
U251	SNC; glioma	Ectoderme
MCF-7	Mama; adenocarcinoma	Ectoderme
UACC-62	Melanoma	
786-0	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme
OVCAR-3	Ovário	Mesoderme
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme
K562	Medula óssea; leucemia mielóide crônica	Mesênquima
HaCat*	Queratinócito humano; célula normal imortalizada	Epiderme

* linhagem cedida pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP).
Fonte: Da autora

Após 24h desta incubação, foram adicionados 100µL da suspensão de células, em uma densidade de 3×10^4 e $6,5 \times 10^4$ células/mL, em cada compartimento das microplacas de 96 poços. Estas suspensões foram colocadas nas placas contendo meio RPMI/SFB acrescido de 50µg/mL de penicilina/estreptomicina previamente.

Para a preparação das amostras, uma alíquota de 10mg do extrato seco foi dissolvida em 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50µL dessa solução-

mãe foi dispersa em 950µL 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 0,25µg/mL; 2,5µg/mL; 2µg/mL e 250µg/mL. Como controle positivo, foi utilizado o quimioterápico Doxorrubicina, nas concentrações de 0,025µg/mL; 0,25µg/mL; 2,5µg/mL e 25µg/mL.

Para determinar a quantidade de células existentes no momento da 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 48h de incubação, as células foram fixadas com 50µL/compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por uma hora a 4°C. A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio de cultura, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as placas foram coradas com 50µL/compartimento de SRB 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 20 minutos. Em seguida, foram lavadas quatro vezes com ácido acético a 1%, para remoção do excesso de corante e secas à temperatura ambiente.

Finalmente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base 10 µM e pH 10,5 e realizada leitura espectrofotométrica da absorbância foi em 540nm em leitor de microplacas. Gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração das amostras (extratos fúngico e caldo fermentação) foram gerados para cada uma das linhagens testadas.

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

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

Onde:

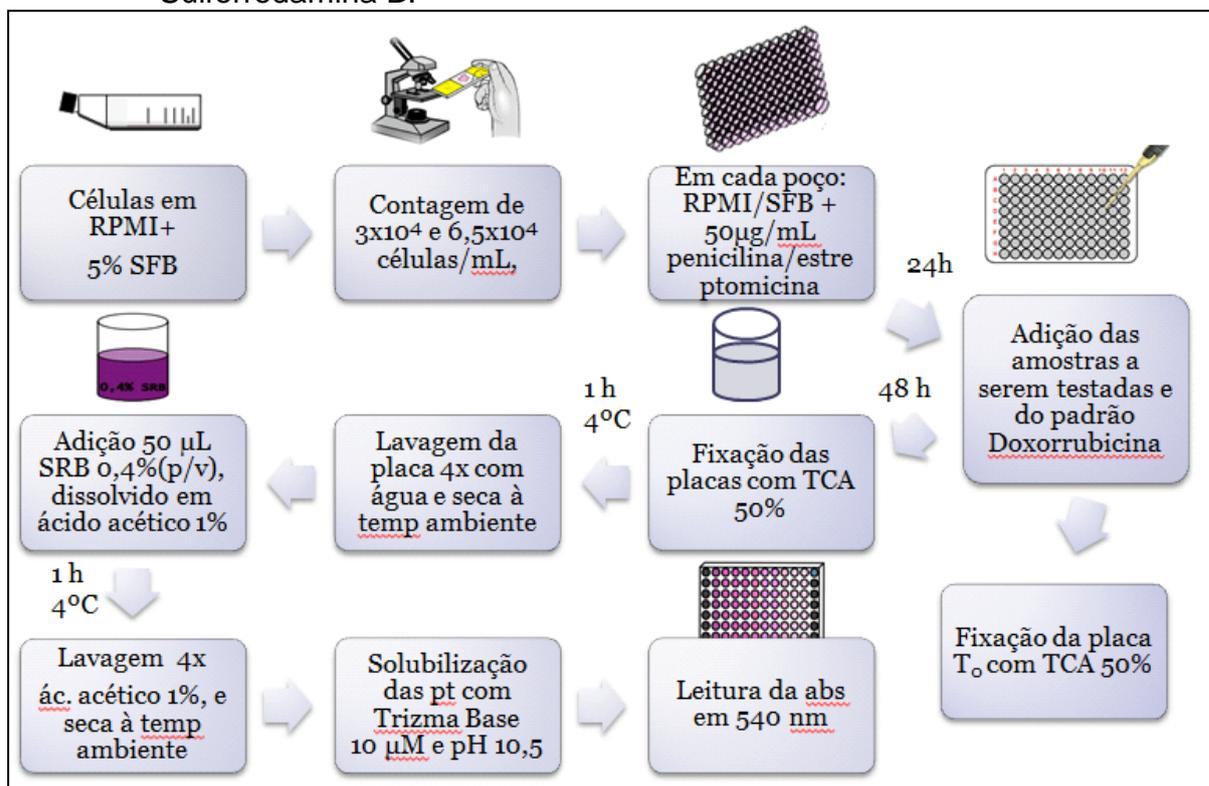
T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula;

T₁ = absorbância do branco de células;

T₀ = absorbância do controle de células na placa T₀.

A concentração efetiva GI_{50} (do inglês *growth inhibition 50*), concentração necessária para interromper em 50% do crescimento foi calculada por regressão não linear, tipo sigmoidal, utilizando-se software Origin, versão 7.5.

Figura 3– Fluxograma das etapas do teste antiproliferativo pelo corante Sulforrodamina B.



Fonte: Da autora

3.7 Determinação da atividade leishmanicida

A atividade leishmanicida dos extratos brutos dos fungos foi determinada pelo método colorimétrico com o 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) que avalia a viabilidade celular.

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* utilizadas foram cultivadas a 26°C, em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 20% de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina.

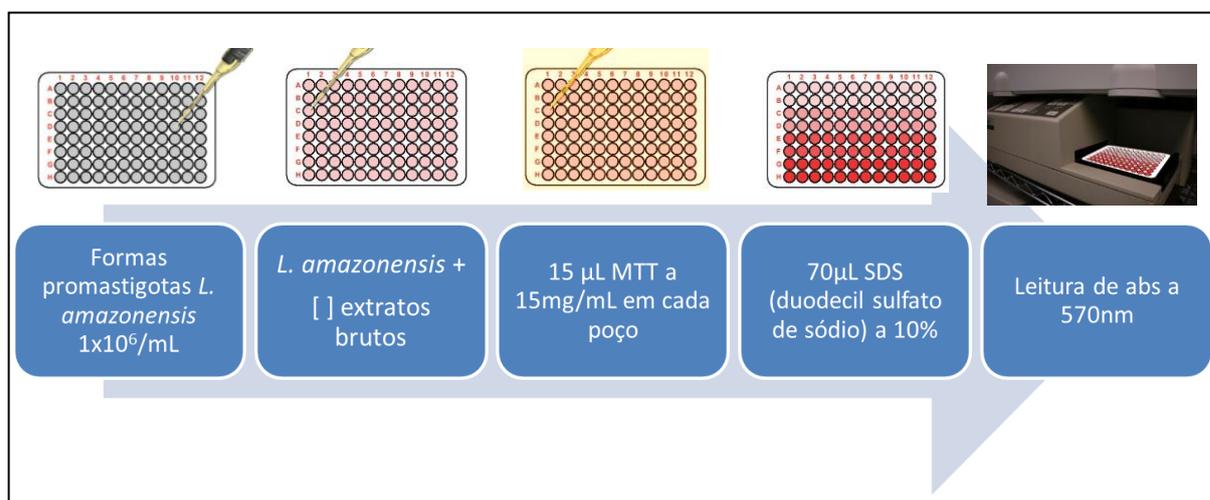
Para a realização do teste, as formas promastigotas (1×10^6 /mL) obtidas do cultivo em fase logarítmica foram colocadas em placas de 96 poços a 26°C e a estas

foram adicionadas diferentes concentrações dos extratos de *Diaporthe sp.* (80 a 625µg/mL), *Gibberella moniliformis* (80 a 0,625µg/mL) e *Diaporthe phaseolorum* (40 a 0,3125µg/mL) sendo as amostras avaliadas após 24 horas de incubação. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Após o período de incubação das formas promastigotas com os extratos brutos, 15µL de uma solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenilbrometo tetrazolina (5 mg/mL) foram adicionados em cada poço. A placa foi então incubada a 26°C por 4 horas em ausência de luz. Após isto, 70µL de SDS (duodecil sulfato de sódio) a 10% foram adicionados em cada poço, a fim de solubilizar os cristais de formazan e as placas foram mantidas em estufa a 26°C por mais 20h.

A absorbância correspondente a cada amostra foi então medida no leitor de Elisa a 570 nm. A absorbância obtida pelas células controle não tratada foi considerada como 100% de viabilidade celular. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Biostat.

Figura 4– Fluoxograma das etapas do teste leishmanicida in vitro.



Fonte: Da autora.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão apresentados os resultados referentes aos testes realizados.

4.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os extratos brutos dos doze fungos endofíticos do mangue (Tabela 4) foram avaliados quanto a sua ação contra o crescimento microbiano e obtiveram-se as concentrações inibitórias mínimas demonstradas na tabela 4. Não foram observadas concentrações bactericidas ou fungicidas em nenhum dos extratos avaliados.

Analisando os resultados (Tabela 4), pode-se observar que dos doze extratos fúngicos testados, somente um apresentou atividade contra a bactéria Gram-negativa (*E. coli*) e o fungo patogênico (*C. albicans*). Para três extratos fúngicos (25%) não houve nenhuma atividade antimicrobiana e sete deles (58,3%) apresentaram atividade contra a bactéria Gram-positiva em alta faixa de concentração, de 500 a 1000µg/mL. Com menores concentrações inibitórias de *S. aureus*, entre 250,0 e 62,5µg/mL, foram observados dois extratos.

De acordo com Rios e Recio (2005), na busca produtos naturais, os extratos que apresentam concentrações antimicrobianas maiores que 1000µg/mL devem ser evitados. Portanto, a partir dos resultados, foram escolhidos três extratos brutos que apresentaram menor concentração inibitória para dar continuidade aos estudos biológicos. Os fungos endofíticos *Diaporthe sp.* 54(4) e *D. phaseolorum* 41.1(1) foram selecionados devido à baixa concentração necessária para inibir o crescimento da bactéria *S. aureus* ATCC 6538. A escolha do fungo *G. moniliformis* 99(3) foi devido ao seu amplo espectro de ação, inibindo crescimento tanto de bactéria Gram-positiva e negativa quanto da levedura.

O extrato bruto do endófito *G. moniliformis* 99(3) foi o único dos doze extratos que mostrou atividade fungicida contra o patógeno *C. albicans* ATCC 10231 com a concentração inibitória mínima de 125-250µg/mL. Em um estudo com fungo endofítico do mangue chinês, Huang et al (2008) isolou cinco frações do extrato

sendo que duas delas obteve concentração de 32-64µg/mL contra *C. albicans* ATCC 10231.

Tabela 4- Concentração inibitória mínima (µg/mL) dos extratos brutos dos fungos endofíticos do mangue e dos padrões Cloranfenicol e Anfotericina B

		Cepas		
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
		ATCC 6538	ATCC 25922	ATCC 10231
Extrato bruto dos fungos endofíticos	8(3)	500-1000		-
	36(3)	500-1000	-	-
	50(3)	500-1000	-	-
	54(4)	62,5-125	-	-
	60(4)	-	-	-
	82(4)	500-1000		-
	89(3)	-	-	-
	99(3)	500-1000	250-500	125-250
	29.6(3)	-	-	-
	9.3(1)	500-1000	-	-
	39.1(1)	500-1000	-	-
	41.1(1)	125-250	-	-
Padrão	Cloranfenicol	<1,95	<1,95	-
	Anfotericina B	-	-	<1,95

Nota: 8(3)= *Lasiodiplodia rubropurpurea*; 36(3)= *Diaporthe phaseolorum*; 50(3)= *Aspergillus sp.*; 54(4)= *Diaporthe sp.*; 60(4)= *Penicillium sp.*; 82(4)= *Aspergillus awamori*; 89(3)= *Hypocrea virens*; 29.6(3)= *Neofusicoccum vitifusiforme*; 99(3)= *Gibberella moniliformis*; 39.1(1)= *Diaporthe phaseolorum*; 41.1(1)= *Diaporthe phaseolorum*.

Fonte: Da autora.

Além de ativo contra *E. coli* e *S.aureus*, após análise com outros micro-organismos, este mesmo extrato também apresentou atividade antibacteriana contra cepas Gram-positivas e Gram-negativas. Pode-se destacar a baixa concentração inibitória (125-250µg/mL) contra os isolados clínicos *E. casseliflavus* e *S. marcescens*, assim como contra a cepa padrão de *B. cereus* ATCC 11778. Um estudo desenvolvido por Buatong et al. (2011), a fim de selecionar fungos endofíticos do mangue tailandês que produzissem substâncias antimicrobianas

detectou que dos 150 fungos endofíticos isolados, nenhum extrato apresentou atividade contra a bactéria *E. coli*.

Tabela 5- Atividade antibacteriana ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos brutos dos fungos endofíticos e do padrão Cloranfenicol

Cepas	Extrato bruto dos fungos endofíticos			Padrão	
	<i>Diaporthe sp.</i> 54(4)	<i>G. moniliformis</i> 99(3)	<i>D. phaseolorum</i> 41.1(1)	Cloranfenicol	
Gram positivas	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	125,00 -250,00	125,00-250,00	31,25-62,50	< 1,95
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	125,00-250,00	125,00-250,00	62,50-125,00	< 1,95
	<i>Enterococcus gallinarum</i>	250,00-500,00	-	-	7,80 – 15,62
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-	-	7,80 – 15,62
	<i>S. aureus</i> OX res. 155	500,00-1000,00	-	-	31,25–62,50
	Gram negativas	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	500,00-1000,00	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027		500,00-1000,00	500,00-1000,00	-	7,80 – 15,62
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933		-	-	-	1,95 – 3,90
<i>Serratia marcescens</i>		125,00-250,00	125,00-250,00	31,25-62,5	< 1,95
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028		-	500,00-1000,00	-	< 1,95

Fonte: Da autora.

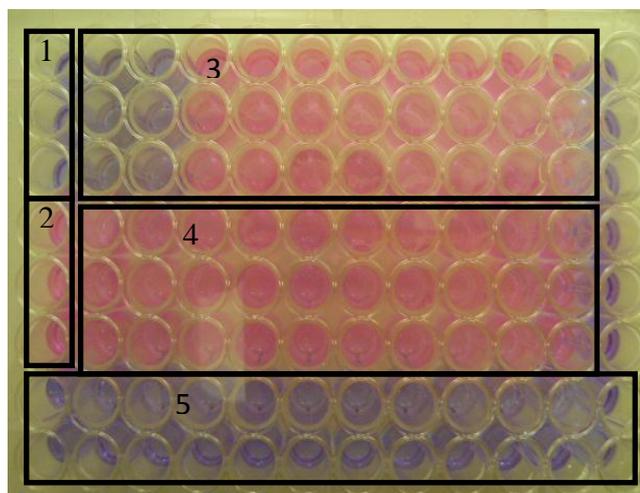
Assim como Maria, Sridhar e Ravira (2005) que estudou fungos endofíticos do mangue da Índia e dentre quatorze isolados, somente um teve ação contra a bactéria Gram-negativa. Os resultados do fungo endofítico *G. moniliformis* 99(3) evidenciam que este é um fungo promissor para a produção de substâncias antimicrobianas.

O extrato bruto do fungo *Diaporthe sp.* 54(4) também apresentou amplo espectro de atividade, conseguindo inibir o crescimento tanto de bactérias Gram-positivas quanto negativas, com menores valores de concentração inibitória (125-250 $\mu\text{g/mL}$) contra *E. casseliflavus*, *S. marcescens* e *B. cereus*. Este extrato

destacou-se por ser o único dos três testados que inibiu o crescimento de um isolado clínico de *S. aureus* oxacilina resistente.

O endófito *D. phaseolorum* 41.1(1) não demonstrou atividade tão ampla no painel de bactérias testadas quanto os outros dois fungos. Mas destacou-se por ter apresentado as menores concentrações inibitórias para *B. cereus* (31,25-62,5µg/mL) e para *Serratia marcescens* (62,5- 125µg/mL).

Figura 5- Microplaca de 96 orifícios contendo o teste concentração inibitória mínima contra a bactéria *S. aureus* ATCC 6538



Nota: 1: controle de crescimento do micro-organismo; 2: controle de esterilidade do meio; 3: concentrações avaliadas do extrato bruto de *Gibberella moniliformis* (99(3)); 4: concentrações avaliadas do extrato bruto de *Neofusicoccum vitifusiforme* (9.3(1)) e 5: concentrações avaliadas de Cloranfenicol.

Fonte: Da autora.

4.2 ATIVIDADE SINÉRGICA

De acordo com o teste realizado não houve sinergismo entre o extrato do fungo endofítico do mangue e o antibiótico Amoxicilina. Entretanto, as concentrações inibitória mínimas de cada um mantiveram-se, ou seja, nos poços em que foram avaliados isoladamente, tanto o EB quanto a Amoxicilina obteve seu desempenho.

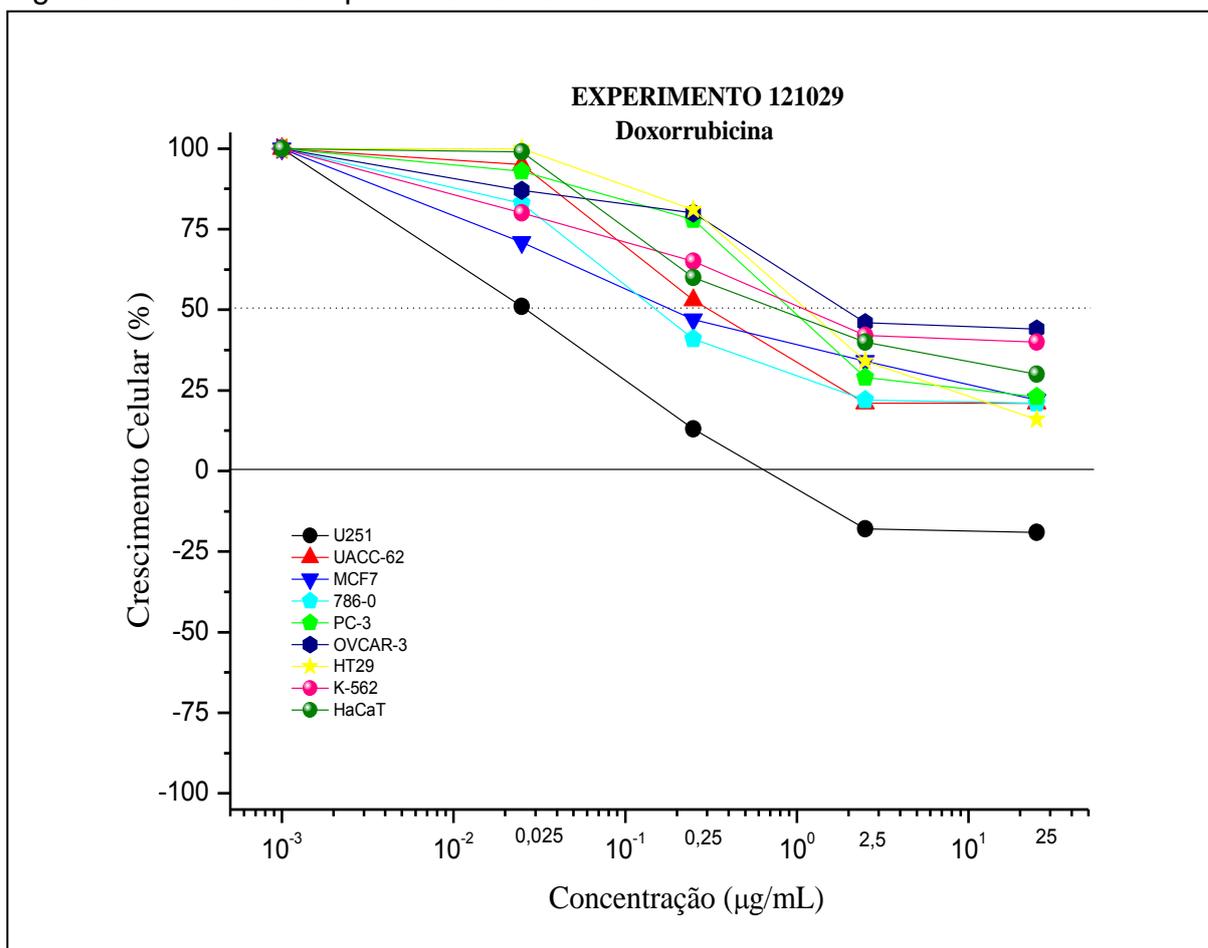
Em um estudo realizado avaliando a atividade sinérgica entre extratos brutos e antibióticos contra cepas patológicas, Arivudainambi, et al.(2011), constatou sinergismo entre extratos do fungo endofítico *C. gloeosporioides* isolado da planta

medicinal *V. negundo* L. e os antibióticos penicilina e vancomicina contra cepas meticilina resistentes de *S. aureus*.

4.3 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

As atividades antiproliferativas exercidas pelos extratos acetato de etila dos fungos endofíticos e da Doxorrubicina, utilizada como padrão são demonstradas nas Figuras 1, 2, 3 e 4.

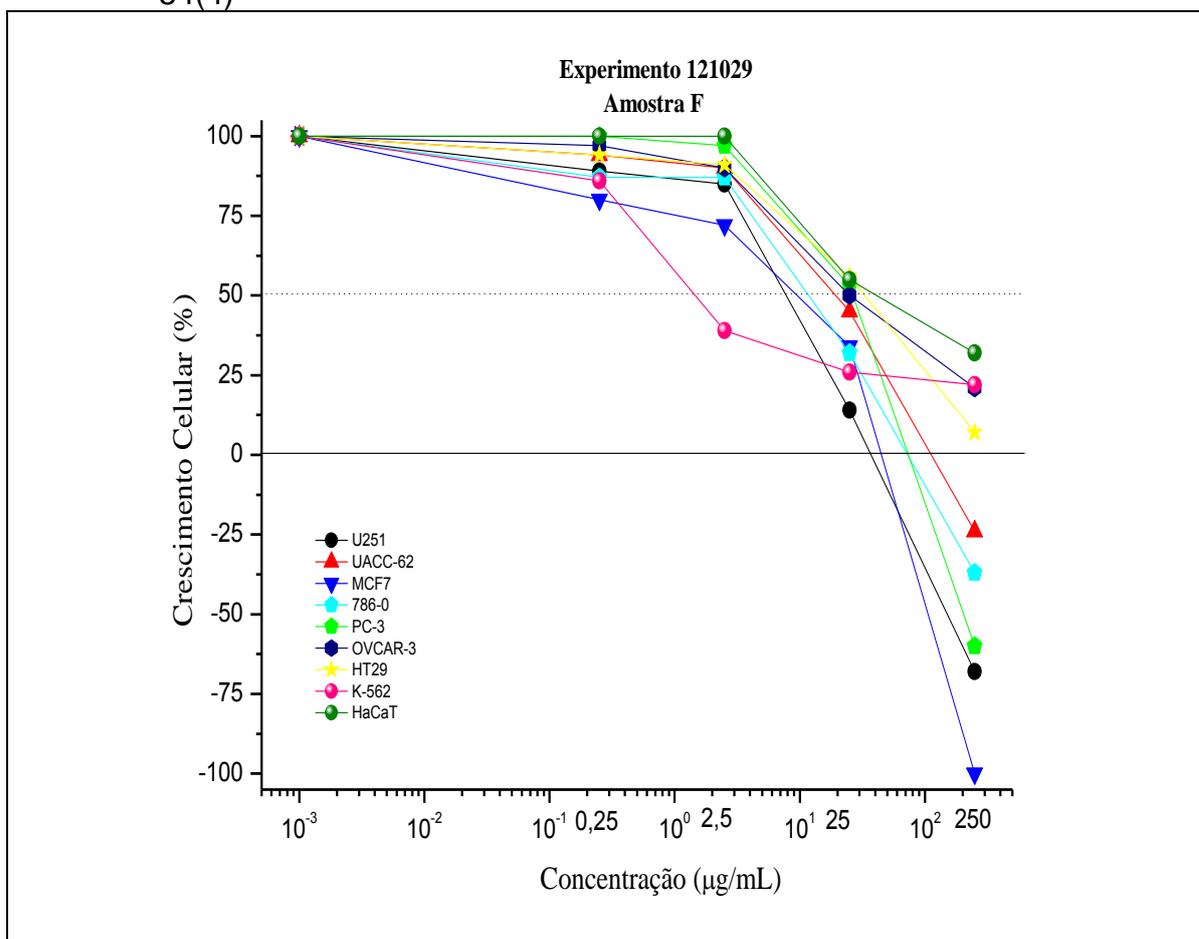
Figura 6 - Atividade antiproliferativa de Doxorrubicina



Nota: linhagens celulares testadas: U251 (glioma, SNC); UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); 786-0 (rim); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colorectal); K562 (leucemia); HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

Fonte: Da autora.

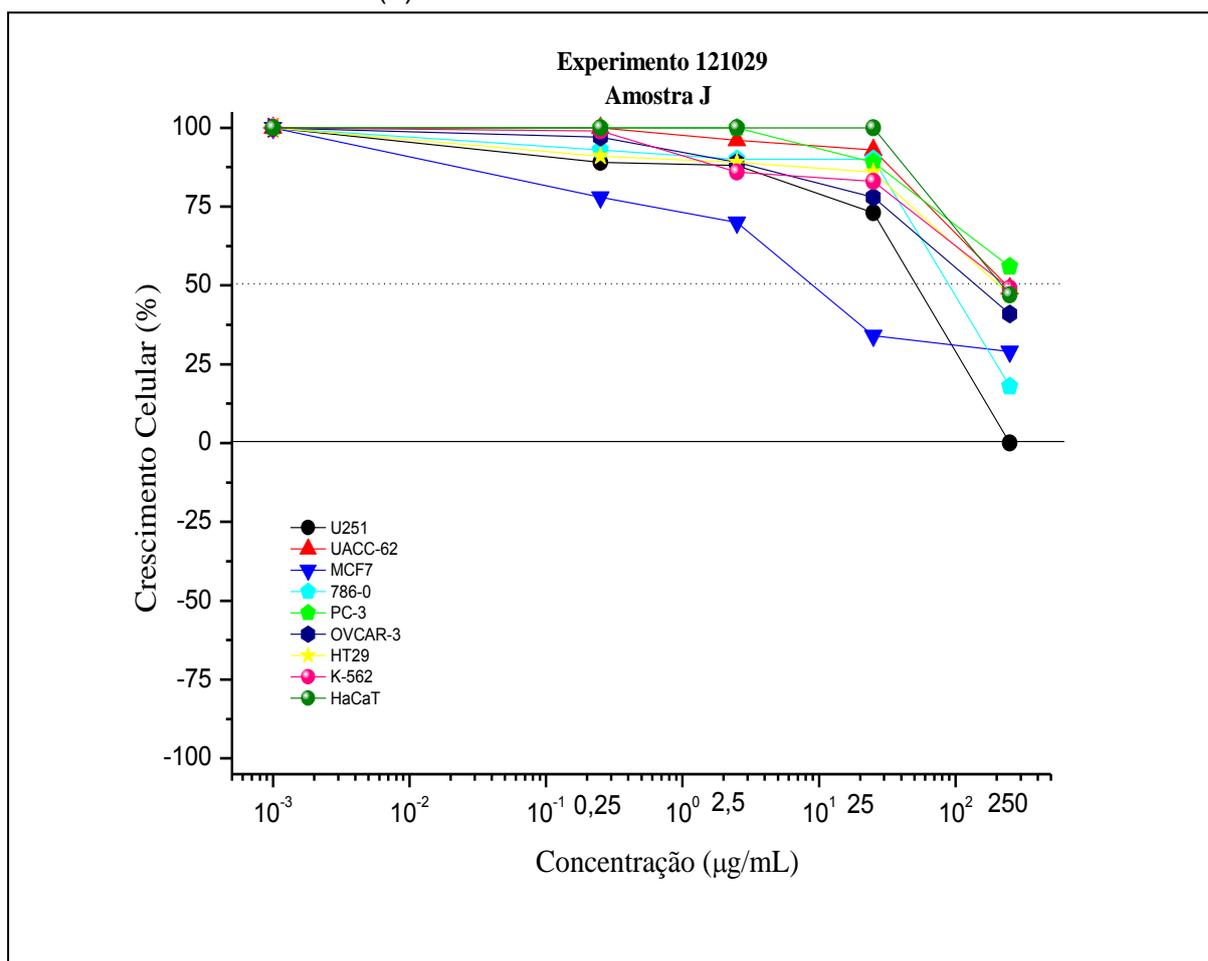
Figura 7- Atividade antiproliferativa do extrato bruto do fungo endófito *Diaporthe* sp. 54(4)



Nota: linhagens celulares testadas: U251 (glioma, SNC); UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); 786-0 (rim); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colorectal); K562 (leucemia); HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

Fonte: Da autora.

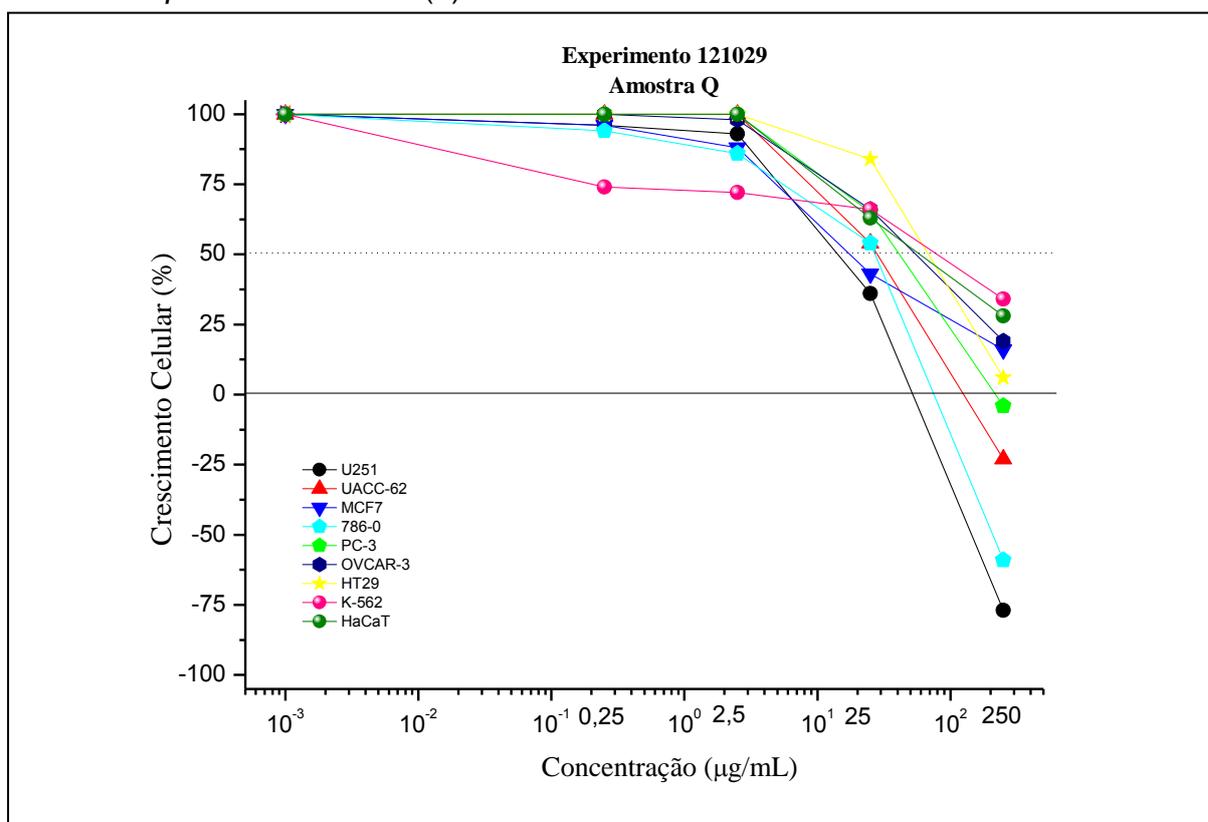
Figura 8- Atividade antiproliferativa do extrato bruto do fungo endofítico *Giberella moniliformis* 99(3).



Nota: linhagens celulares testadas: U251 (glioma, SNC); UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); 786-0 (rim); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colorectal); K562 (leucemia); HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

Fonte: Da autora.

Figura 9- Atividade antiproliferativa do extrato bruto do fungo endófito *D. phaseolorum* 41.1(1)



Nota: linhagens celulares testadas: U251 (glioma, SNC); UACC-62 (melanoma); MCF-7 (mama); 786-0 (rim); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT29 (colorectal); K562 (leucemia); HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada).

Fonte: Da autora.

Na tabela 6, são apresentadas as concentrações necessárias para inibir cinquenta por cento do crescimento das células e o valor médio do log destas concentrações (mean logGI₅₀) que o NCI (*Instituto Nacional do Câncer – EUA*) utiliza para classificação dos extratos. Segundo esta análise, o efeito que classifica o efeito citostático dos extratos é considerado como inativo (média logGI₅₀ > 1,5), fraco (1,1 < média logGI₅₀ < 1,5), moderado (1,1 > média logGI₅₀ > 0) e potente (média logGI₅₀ < 0) (Fouche et al., 2008).

Pode-se observar que dentre as amostras analisadas, o extrato fúngico *Diaporthe sp* 54(4) apresenta melhor ação entre eles, que, de acordo com a classificação, tem atividade fraca. Porém, analisando isoladamente o painel de resultados, deve-se destacar a ação deste mesmo extrato contra as células tumorais de leucemia K562 e contra células de glioma N51. Em tal amostra, detectou-se uma atividade antiproliferativa moderada sobre as células leucêmicas (logGI₅₀= 0,43) e sobre as células de glioma (logGI₅₀= 0,86). Os extratos dos fungos *G. moniliformis*

99(3) e *D. phaseolorum* 41.1(1) mostraram ser inativos, de acordo com a classificação adotada para a avaliação das amostras.

Há vários estudos que investigam a produção endófitos de substâncias com potencial anticarcinogênico. Um exemplo deste caso é a produção de taxol (um diterpenóide com atividade antitumoral) pela espécie de fungo endofítico, *Taxomyces andreanae*, isolada da *Taxus brevifolia* (árvore da qual se faz a extração desta substância), relatada por Stierle, Strobel e Stierle, 1993). Outro exemplo é a substância cajanol, extraída das raízes da espécie vegetal *Cajanus cajan* [L.] Millsp., que tem atividade inibitória sobre antígeno específico prostático e é um novo agente anticâncer de mama que induz a apoptose destas células tumorais (DUKER-ESHUN et al., 2004; LIU et al., 2011). Um estudo, realizado por Zhao et al. (2011), com fungos endofíticos deste vegetal, isolou um fungo endofítico, *Hypocrea lixii*, que é produtor da substância cajanol.

Tabela 6 – Concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de Doxorrubicina e extratos brutos dos fungos endofíticos do mangue capazes de inibir 50% do crescimento (GI_{50} : *Growth Inhibition*) das células tumorais e queratinócitos (q).

	2	u	m	7	p	o	H	k	q	Mean logGI ₅₀
Doxorrubicina	0,026	0,43	0,28	0,23	1,1	5,7	1,3	2,2	1,4	-0,2
<i>Diaporthe</i> sp 54(4)	7,2	25,0	6,5	13,2	25,0	30,6	29,5	2,7	57,3	1,1
<i>Gibberella</i> <i>moniliformis</i> 99(3)	39,1	241,8	11,0	96,3	>250	149,6	233,7	>250	247,3	>2,0
<i>Diaporthe</i> <i>phaseolorum</i> 41.1(1)	23,2	25,5	20,9	25,5	26,8	52,5	59,4	64,4	63,5	1,5

Nota: N51 (glioma, SNC); u =UACC-62 (melanoma); m = MCF-7 (mama); 7 = 786-0 (rim); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT29 (colorectal); k = K562 (leucemia); q = HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada), Doxorrubicina= controle positivo.

Fonte: Da autora.

Recentemente, Elavarasi, Rathna e Kalaiselvam (2012) identificaram um fungo endofítico, do mangue indiano, *Fusarium oxysporum* isolado das folhas de *Rhizophora annamalayana*, como produtor de taxol. Este autor ainda destaca a

importância de se pesquisar novas substâncias obtidas a partir dos fungos endofíticos do mangue e enumera as descobertas como isocumarina com atividade citotóxica contra células Hep-2 e HepG₂₉ (células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano) , um novo composto derivado de uma xantona ativo contra células KB e KB_{V200} (carcinoma epidermóide humano e carcinoma epidermóide humano resistente a drogas), entre outros.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pela capacidade de sequestro do radical DPPH. Foi utilizada concentração de 90ppm tanto para os extratos assim como para os padrões. Os resultados estão dispostos na tabela 4.

Tabela 7 - Atividade antioxidante pelo método DPPH dos padrões ácido ascórbico e BHT e extratos dos fungos endofíticos do mangue

Amostras	Atividade antioxidante (%) \pm desvio padrão*
Ácido ascórbico	96,047 \pm 0,005 ^a
BHT	66,310 \pm 0,019 ^b
<i>Diaporthe sp</i> 54(4)	8,747 \pm 0,018 ^d
<i>G. moniliformis</i> 99(3)	29,640 \pm 0,011 ^c
<i>D. phaseolorum</i> 41.1(1)	8,357 \pm 0,005 ^e

Nota: Médias seguidas de letras diferentes se diferem estatisticamente ($\alpha=0,05$).

Fonte: Da autora.

Não houve atividade antioxidante expressiva entre os extratos analisados quando comparados com os padrões. Porém o extrato do fungo endofítico *G. moniliformis* 99(3) é o que se destaca entre eles. Deve-se ressaltar que os extratos avaliados são brutos, o que pode ter um significativo aumento desta atividade caso sejam isolados compostos deles.

Como no estudo de YE et al. (2013) que isolou a substância flavipina do extrato do fungo endofítico *Chaetomium globosum* CDW7 proveniente do *Ginkgo*

biloba. Esta tem atividade antioxidante *in vitro* (DPPH) superior aos padrões avaliados (vitamina C, BHT e trolox).

4.5 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Os extratos brutos avaliados inibiram a proliferação da forma promastigota de *Leishmania amazonensis* com valores de IC₅₀ compreendidos entre 7,197 e 80,415µg/mL, como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 8- Atividade leishmanicida dos extratos brutos dos fungos endofíticos do mangue contra a forma promastigota de *Leishmania amazonensis*

Extrato bruto do fungo endofítico	IC ₅₀ (µg/mL) ^a
<i>Diaporthe sp.</i> 54(4)	62,157
<i>G. moniliformis</i> 99(3)	80,415
<i>D. phaseolorum</i> 41.1(1)	7,197

Nota: ^a: atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Fonte: Da autora.

O extrato bruto do fungo endofítico *D. phaseolorum* 41.1(1) demonstrou o melhor resultado inibindo cinquenta por cento do crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* na concentração de 7,197µg/mL. Em uma pesquisa realizada por Maciel-Rezende et al (2013), a droga padrão utilizada contra a mesma forma do parasita, a Anfotericina B, apresentou um IC₅₀ de 4,700µg/mL.

Rosa et al., 2010 isolou fungos endofíticos de plantas bioativas brasileiras, obteve extratos de acetato de etila de cada um deles e testou a capacidade inibir o crescimento da forma promastigota de *L. amazonensis*. Entre todos os extratos, o do fungo endofítico denominado UFMGCB 579 demonstrou o menor valor de IC₅₀ (4,6µg/mL).

Um estudo feito por Campos et al., 2008 também isolou alguns fungos endofíticos de vegetais de diferentes biomas brasileiros e o isolado UFMGCB-555,

obtido da *Piptadenia adiantoides* J.F. Macbr (Fabaceae) demonstrou forte atividade leishmanicida.

Um estudo realizado por Sebastianes et al. (2013) com o mesmo endófito *D. phaseolorum* 41.1 (1), isolado da espécie *L. racemosa* cujas atividades biológicas foram testadas na presente pesquisa, identificou a presença do ácido 3, hidroxipropiônico (3-HPA). Este metabólito foi extraído após sucessivos fracionamentos em coluna de cromatografia de sílica gel e sua estrutura foi elucidada por RMN e MS. Sebastianes et al. (2013) testou a atividade antimicrobiana do composto 3-HAP contra as bactérias *S. aureus* e *S. typhi* e obteve uma concentração inibitória mínima de 64µg/mL. O extrato bruto do mesmo fungo testado também apresentou atividade contra um painel de bactérias e sendo ele o mesmo isolado pode-se deduzir que a atividade apresentada deve-se a possível presença deste composto no metabólito secundário do fungo.

Quintiliano (2013) fez uma análise por cromatografia em camada delgada dos extratos acetato de etila dos fungos *G. moniliformis* 99(3) e *Diaporthe sp.* 54(4). Verificou-se que os dois extratos apresentaram resultado positivo com o reagente de Dragendorff indicando presença de amins terciárias ou quaternárias, podendo ser alcaloides. Ge et al. (2009) identificou a produção de dois novos alcaloides bioativos por um fungo endofítico o que ressalta a possibilidade da atividade demonstrada pelos endófitos *G. moniliformis* 99(3) e *Diaporthe sp.* 54(4) poderem ser devido a presença desta classe de composto.

5 CONCLUSÕES

Analisando os resultados pode-se verificar que cada extrato possui uma característica: o extrato do fungo *Diaporthe sp.* 54(4) revelou ter atividade contra células de leucemia (células K562) e de glioma (N51). Apresentando também atividade bacteriostática de amplo espectro, com baixa capacidade antioxidante.

Já o extrato do fungo endofítico *Gibberella moniliformis* 99(3) demonstrou amplo espectro de ação antimicrobiana, sendo ativo tanto em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e levedura, mas não teve significativa atividade antiproliferativa. E dentre os três extratos testados, foi o que obteve maior atividade antioxidante.

O extrato do fungo *Diaporthe phaseolorum* 41.1(1) não apresentou expressiva atividade antiproliferativa, tampouco antioxidante. No entanto, foi o extrato que teve menores concentrações inibitórias mínimas contra as bactérias testadas e menor concentração para atividade leishmanicida.

Portanto, os resultados obtidos mostram que os extratos dos fungos endofíticos do mangue testados são promissoras fontes para o isolamento de novos compostos ativos. Deve-se, então, aprofundar os estudos com estes para identificar possíveis compostos que os constitui a fim de se conhecer melhor seus metabólitos secundários.

REFERÊNCIAS

ALY, A. H. et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, n. 41, p. 1–16, 2010.

ARIVUDAINAMBI, U. S. E. et al. Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 340-345, 2011.

ASH et al. Genetic characterization of a novel *Phomopsis* sp., a putative biocontrol agent for *Carthamus lanatus*. **Mycologia**, v. 102, n. 1, p. 54–61, 2010.

AZEVEDO, J. L. et al.; Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 1-36, 2000.

BACON, C. W., WHITE, J. F., STONE, J. K. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon, C.W., White, J.F. (Eds.), *Microbial Endophytes*. **Marcel Dekker**, p. 3–29, 2000.

BANDARANAYAKE, W. M. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. **Wetlands Ecology and Management**, n. 10, p. 421–452, 2002.

BANDRE, T. R.; SASEK, V. Antibiotic Activity of Pyrenomycetes under Submerged Conditions, **Folia Microbiol**, n. 22, p. 269—274, 1977.

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

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

CAMPOS, F. F. et al. Leishmanicidal Metabolites from *Cochliobolus* sp., an Endophytic Fungus Isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 12, 2008.

CARVALHO DE, 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, p. 172-176, 2012.

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

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

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Third Edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility testes for bacteria that grow aerobically. Approved Standard-Ninth Edition. M07-A8. Wayne, PA, USA: CLSI, 2009.

DEMAIN, A. L. **Microbial secondary metabolism**: a new theoretical for academia, a new opportunity for industry. In: SECONDARY metabolites; their function and evolution. Chichester: J. Willey, 1992. p. 03-23 (Ciba Foundation Symposion, 171).

DETTRAKUL, S. et al. Antimycobacterial Pimarane Diterpenes from the Fungus *Diaporthe* sp., **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, n. 13, p. 1253–1255, 2003.

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

ELAVARASI, A.; RATHNA, G. S.; KALAISELVAM, M. Taxol producing mangrove endophytic fungi *Fusarium oxysporum* from *Rhizophora annamalayana*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S1081-S1085, 2012.

ELSÄSSER, B. et al. X-ray Structure Determination, Absolute Configuration and Biological Activity of Phomoxanthone A, **Eur. J. Org. Chem.**, p. 4563–4570, 2005.

FERNANDES, M. 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, 2009.

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

FIRAKOVA, S., STURDIKOVA, M.; MUCKOVA, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, v. 62, n. 3, p. 251–257, 2007.

GAMBOA, M. A.; BAYMAN, P. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). **Biotropica**. p. 352-360, 2001.

GE, H. M. et al. Bioactive alkaloids from endophytic *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 4, 2009.

GONTIJO, V. S. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural bioflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 58, p. 613-623, 2012.

GOPAL, B.; CHAUHAN, M. Biodiversity and its conservation in the Sudarban Mangrove Ecosystem. **Aquatic Sciences**, v. 68, p. 338- 354, 2006.

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

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**. v. 95, p. 641-655, 1991.

HUANG, Z. et al. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. **Phytochemistry**, n. 69, p. 1604–1608, 2007.

ISAKA, M. et al. Phomoxanthenes A and B, novel xanthone dimmers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. **J Nat Prod**, v. 64, p. 1015–1018, 2001.

JALGAONWALA, R. E. et al. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **J. Microbiol. Biotech. Res.**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2011.

KUMARESAN, V.; SURYANARAYANAN, T. S. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community. **Mycology Research**, n. 105, v. 11, p. 1388-1391, 2001.

KHARWAR, R. N., VERMA, V. C., STROBEL, G., EZRA, D. The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Current Science**, n. 95, p. 228–233, 2008.

KUSARI, S.; ZUHLKE, 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.

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

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

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 538–544, 1998.

MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R.; RAVIRAJ, N. S. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. **Journal of Agricultural Technology**, v.1: XX, p. 67-80, 2005.

MACEDO-SILVA, S. T. et al. *In vitro* activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

MACIEL-REZENDE, C. M. et al. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 3114–3119, 2013.

McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S.K.; HENRI, S.T. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

MIRANDA, A. L. P.; FRAGA, C. A. M. **Free radical scavenger activity:** determination of the antioxidant profile of bioactive substances. In: MONGE, A.;

BARREIRO, E. J.; (Org.). *Practical Studies for Medicinal Chemistry: an integrating approach for developing*. IUPAC, 2006. Disponível em: <www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/>.

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

NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, L. W. Microrganismos Endofíticos: Interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-76, 2002.

NETO, P. A. S. P.; AZEVEDO, J. L. de; CAETANO, L. C. Microrganismos endófitos em plantas: status e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 3, n. 4, 2004.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 2461-477, 2007.

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

PATERSON, I.; ANDERSON, E. A. The renaissance of natural products as drug candidates. **Science**, v. 310, p. 451-453, 2005.

PIMENTEL, M. R. et al. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. **Biotechnology Research International**, v. 2011, 2010.

QUINTILIANO, N. F. **Estudo químico e avaliação de atividade antimicrobiana do produto de fermentação de fungos endofíticos**. 2013. 60f. Trabalho de conclusão de curso (Química Bacharelado). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2013.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus Aspergillus**. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, p. 56-57, 1965.

ROSA, L. H. et al. Leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 41, p. 420-430, 2010.

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

SAHOO, K.; DHAL, N. K.. Potencial microbial diversity in mangrove ecosystems: A review. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 32, n. 2, p. 249-256, 2009.

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, p. 95-103, 2012.

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.

SCHULZ, B. et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

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, 2010.

SEBASTIANES, F. L. S. et al. 3-Hydroxypropionic Acid as an Antibacterial Agent from Endophytic Fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Current Microbiology**, n. 65, p. 622–632, 2012.

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

SCHAEFFER-NOVELLI, Y. et al. Brazilian mangroves, **Aquatic Ecosystem Health and Management**, n. 3, p. 561-570, 2000.

SILVA, M. S. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

SINGH, S. B.; BARRET, J. F. Empirical antibacterial drug discovery-Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 1006-1015, 2006.

SOUSA, O. V. et al. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 1725–1734, 2006.

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

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes and Bioprospecting. **Fungal biology reviews**, n. xxx, 2009.

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**, n. 18, p. 448-459, 2001.

YAMAMURA, Y. e SHIM, W. The coiled-coil protein-binding motif in *Fusarium verticillioides* Fsr1 is essential for maize stalk rot virulence. **Microbiology**, n. 154, p.1637–1645, 2008.

YEN, W. J.; CHANG, L. W.; DUH, P. D. Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 193-200, 2005.

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

ZHANG, J. et al. Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. **Marine Drugs** 2010, n. 8, p. 1469-1481, 2010.

ZHAO, J. et al. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, n. 11, p. 159-168, 2011.

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**, v. 40, n. 8, p. 1914–1918, 1996.