

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

PATRÍCIA LUNARDELLI NEGREIROS DE CARVALHO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS ASSOCIADOS
ÀS PLANTAS DO GÊNERO *RHEEDIA***

Alfenas/MG
2011

PATRÍCIA LUNARDELLI NEGREIROS DE CARVALHO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS ASSOCIADOS
ÀS PLANTAS DO GÊNERO *RHEEDIA***

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.

Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Carvalho, Patrícia Lunardelli Negreiros de.
Isolamento e seleção de fungos endofíticos produtores de
compostos bioativos associados às plantas do gênero *Rheedia* /
Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho. - 2011.
84 f. -

Orientador: Massaharu Ikegaki
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade
Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2011.
Bibliografia.

1. Clusiaceae. 2. Fungos - metabolismo. 3. Plantas Medicinais. 4.
Fermentação. 5. Antioxidantes. 6. Psoríase. I. Ikegaki, Massaharu. II.
Título.

CDD: 615.3

PATRÍCIA LUNARDELLI NEGREIROS DE CARVALHO

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS ASSOCIADOS
ÀS PLANTAS DO GÊNERO *RHEEDIA***

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

Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Aprovada em: 19/12/2011


Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Instituição: Universidade Federal de Alfenas
(UNIFAL-MG)

Assinatura: 

Profa. Dra Ana Lúcia Tasca Góis Ruiz

Instituição: Centro de Pesquisa Química,
Biológica e Agrícola (CPQBA/ Unicamp)

Assinatura: 

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

Instituição: Universidade Federal de Alfenas
(UNIFAL-MG)

Assinatura: 

Dedico este trabalho com gratidão e amor:

*Aos meus pais, Cláudia e Paulo,
às minhas irmãs, Sarah e Flávia,
ao meu namorado Andre.*

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Orientador Prof. Dr. Masaharu Ikegaki, por me receber como orientada, tornando possível a realização deste sonho e permitindo meu crescimento pessoal e científico.
- À Universidade Federal de Alfenas e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade e apoio necessário para a realização desta pesquisa.
- Aos professores e funcionários do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Profa. Dra. Sandra M.O.M. Veiga, Prof. Dr. Luiz Carlos do Nascimento, Prof. Dr. Sinézio Inácio da Silva Júnior, Maria Vita dos Reis, Berenice F. Aguiar, e do Laboratório de Tecnologia de Cosméticos: Profa. Dra. Helenice A. de Carvalho, Vera e Odete.
- À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, especialmente à Fabiana e ao Thiago.
- À Fapemig (Processo número: APQ-00238-08) e CNPq (Processo número: 478830/2008-4), pelo apoio financeiro.
- 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 oportunidade de visita técnica ao laboratório.
- Ao professor Severino M. Alencar e à técnica Adna Prado pelo perfil químico em CG-EM dos extratos.
- Ao professor Ludwig H. Pfenning e à mestrande Ana Karla Machado da Universidade Federal de Lavras, pela caracterização dos isolados fúngicos e oportunidade de treinamento e visita técnica no laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras.

- A Deus e a Nossa Senhora por todas as bênçãos.
- À minha mãe, por sua presença infinita e incondicional durante todas as etapas de minha vida.
- Às minhas irmãs Sarah e Flávia, orgulhos de minha vida, pela amizade, momentos de descontração mesmo distantes e, em especial a Sarah, pelos auxílios nas traduções e ajudas de última hora.
- Ao meu namorado Andre, por sua paciência, carinho e compreensão durante a reta final deste trabalho.
- Aos colegas e amigos do laboratório, Priscilla O. Amaral, Melissa C. E. Santo, Rodrigo Cartaxo, Aline Rocha e Marina Navega pelo companheirismo e colaborações.
- Aos amigos Rodrigo Monteiro e Taciane M.M. Hipólito, por todos os nossos momentos juntos e pelas demonstrações de sincera amizade.
- Aos amigos do mestrado Talita Antunes, Olimpia M.M. Santos, André L. M. Viana, Mariane Santos e Antônio Felipe F. Oliveira.
- Ao técnico Gustavo Silveira, e aos professores da UNI FAL-MG, Prof. Dr. Luiz Cosme C. Malaquias, Profa. Dra. Amanda L.T. Dias, Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva e Prof. Dr. Marcelo Henrique dos Santos, por todas as contribuições diretas e indiretas a este trabalho.
- A todos que direta ou indiretamente participaram na realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*"Nunca desista nesse momento,
pois é exatamente neste lugar
e hora que a maré vai mudar"
(Harriet Beecher Stowe)*

RESUMO

A maioria dos compostos naturais do mundo ainda não foi testada, visto a vasta biodiversidade disponível. As plantas do gênero *Rheedia* apresentam propriedades farmacológicas e químicas bem descritas na literatura e podem ser fonte de fungos endofíticos produtores de compostos bioativos. Os fungos endofíticos merecem especial destaque por sua grande diversidade de espécies e conseqüentemente, seus metabólitos tendem a apresentar diversidade química e moléculas inéditas com algumas atividades biológicas já descritas. Objetivou-se neste trabalho isolar fungos endofíticos das folhas de *Rheedia brasiliensis*, selecionar os de maior destaque e testá-los quanto à capacidade em produzir metabólitos bioativos com atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa. Foram analisados 245 fragmentos de folhas de *R. brasiliensis* com isolamento de 154 fungos (freqüência de isolamento de 62,86%). Selecionou-se dois fungos, por meio da triagem antimicrobiana, para estudos mais avançados, sendo eles o *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1, que pertence a um novo gênero recentemente descrito e que pode vir a se destacar na produção de novas moléculas de interesse e, *Colletotrichum gloeosporioides* P67F1/1, o qual apresenta histórico de metabólitos bioativos e moléculas importantes descritas na comunidade científica. Assim, no primeiro estudo, avaliou-se as propriedades biológicas do extrato acetato de etila de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 obtido pela fermentação submersa em caldo czapek, testando-o quanto a sua capacidade em produzir compostos bioativos de interesse por meio de ensaios antimicrobianos, antioxidantes e antiproliferativos. As cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram susceptíveis ao extrato de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 testado, sendo a concentração inibitória mínima (CIM) para *S. aureus* de 500-1000 µg/mL. Utilizando o método do DPPH (radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil), o extrato de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 apresentou capacidade sequestrante (média da capacidade sequestrante±desvio padrão), a 90 ppm, de 58,92±0,024 (%), sendo significativamente superior ($p < 0,05$) ao padrão comercial Butil Hidróxi Tolueno (BHT), 39,52±0,095 (%). Ainda, o extrato deste fungo também apresentou destaque pela seletividade sobre as células HaCat (queratinócito humano), importante em patologias como psoríase, sendo o valor de GI_{50} de 0,95 µg/mL (média do $\log GI_{50} = -0,02$). Estes resultados apontam para a potencialidade do extrato da fermentação do fungo *Paraconiothyrium* sp P83F4/1 e estimulam a continuidade dos estudos, elucidando o(s) composto(s) que exerce(m) estas atividades em potencial e aprofundando os conhecimentos sobre os mecanismos de ação envolvidos em tais atividades. No segundo estudo, objetivou-se avaliar o potencial biológico do extrato bruto de farelo de trigo e demonstrar sua influência em processos fermentativos, utilizando-se o fungo endofítico *C. gloeosporioides* P67F1/1 para a obtenção dos compostos bioativos. Verificou-se que o extrato diclorometânico do farelo de trigo apresentou atividades biológicas iguais ou superiores ao extrato fúngico. No ensaio antimicrobiano, ambos os extratos apresentaram CIM de 250-500 µg/mL. A capacidade sequestrante (%) dos extratos, revelada pelo DPPH, mostrou valores de (média da capacidade sequestrante±desvio padrão): 17,7±0,037 (farelo de trigo) e 10,56±0,004 (fungo), sendo o extrato do farelo significativamente ($p < 0,05$) melhor que o extrato de *C. gloeosporioides* P67F1/1. No ensaio antiproliferativo, o extrato bruto do farelo de trigo apresentou atividade fraca frente à maioria das linhagens tumorais avaliadas ($25,34 < GI_{50}$ (µg/mL) $< 47,75$; $1,40 < \text{média } \log GI_{50} < 1,68$). Por outro lado, o extrato fúngico mostrou-se inativo frente a todo painel celular testado

(GI₅₀>250 µg/mL, média logGI₅₀>2,40), conforme critério do *National Cancer Institute*. Diante dos resultados, verificou-se que o farelo de trigo não se apresentou como substrato inerte no processo fermentativo. Desta forma, alerta-se a necessidade de maiores cuidados ao empregá-lo como substrato em determinados tipos de fermentação (cujos objetivos assemelham-se aos deste trabalho), evitando assim, influências de sua composição química (direta e/ou indiretamente) sobre atividades esperadas para os extratos em estudo, provenientes de processos fermentativos fúngicos.

Palavras-chave: *Paraconiothyrium* sp. *Colletotrichum gloeosporioides*. *Rhedia brasiliensis*. Processos Fermentativos. Compostos Bioativos. Ensaios Biológicos.

ABSTRACT

The majority of natural compounds in the world has not been tested yet, due to vast biodiversity available. Plants of the genus *Rheedia* can be sources of endophytic fungi producers of bioactive compounds because it presented chemical and pharmacological properties well described in the literature. Endophytic fungi deserve particularly consideration because they include microorganisms with high species diversity and consequently, high chemistry diversity and uniqueness of molecules with biological activities proven. This study aimed isolate endophytic fungi from *Rheedia brasiliensis* leaves, selecting the most outstanding and testing their ability to produce bioactive metabolites with antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activity. In all, 245 fragments of leaves of *R. brasiliensis* were analyzed with isolation of 154 fungi (isolation frequency of 62.86%). Two fungi were selected, through the antimicrobial screening, for more advanced studies: the first one was *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1, which belongs to a new genus recently described and it may be important in the production of new molecules of interest, and, the second was *Colletotrichum gloeosporioides* P67F1/1, which presents a historical of metabolites and bioactive molecules that are outlined by the scientific community. The first part of this study evaluated biological properties of extract obtained from submerged fermentation into czapek broth of the *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 endophytic fungus. So, this extract was tested for its capacity to produce bioactive compounds with antimicrobial, antioxidant and antiproliferative properties of interest. The strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were susceptible to fungal extract tested, with greater emphasis against *S. aureus*, whose minimum inhibitory concentration (MIC) values were 500-1000 µg/mL. Using the method of DPPH (1,1-diphenyl-2-picril-hydrazyl radical), *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 extract showed scavenging capacity (average sequestrant capacity \pm standard deviation), at 90 ppm, of 58.92 \pm 0.024 (%), and was significantly higher ($p < 0.05$) than commercial standard Butyl Hidroxi Toluene (BHT), of 39.52 \pm 0.095 (%). The *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 extract also stood out for selectivity on HaCat cells (human keratinocytes), important in diseases such as psoriasis, with GI_{50} value of 0.95 mg/mL (mean log $GI_{50} = -0.02$). These results indicate extract powerfull of the *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 and stimulate continuation of studies, with elucidating of compounds and deep knowledge about action mechanisms involved in such activities. The second part of this study aimed to analyze the biological potential of crude wheat bran extract and demonstrate its influence on fermentation processes using the *C. gloeosporioides* P67F1/1 to obtain bioactive compounds. The dichloromethane extract of wheat bran presented biological activities equal or higher than the fungal extract. For antimicrobial assay, both extracts showed MIC of 250-500 µg/mL. The scavenging capacity (%) of extracts, revealed by the DPPH, showed values (average sequestrant capacity \pm standard deviation): of 17.7 \pm 0.037 (wheat bran) and 10.56 \pm 0.004 (fungus), with the bran extract significantly ($p < 0.05$) better than the fungal extract. For the antiproliferative assay, the wheat bran crude extract showed weak activity for the most part of tumor lines tested ($25.34 < GI_{50} (\mu\text{g/mL}) < 47.75$, $1.40 < \text{average of } \log GI_{50} < 1.68$). On the other hand, the fungus extract was inactive for all tested cell panel ($GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$, average of $\log GI_{50} > 2.40$), according to National Cancer Institute criteria. According to results obtained, we verified that wheat bran was not an inert fermentation substrate. So, for some fermentation processes is necessary more care to use it, in order to avoid influences of (direct and/or indirect) chemical

composition on activities expected for the extracts on analysis, originated from fungal fermentation processes.

Keywords: *Paraconiothyrium* sp. *Colletotrichum gloeosporioides*. *Rheedia brasiliensis*. Fermentation Process. Bioactive compounds. Biological Assays.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de fungos endofíticos com capacidade de produzir taxol (agente anticancerígeno) e suas respectivas plantas hospedeiras.	24
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. A família Clusiaceae e a espécie <i>Rheedia brasiliensis</i>	18
2.2. Processos fermentativos.....	19
2.2.1 Potencial biotecnológico do farelo de trigo.....	20
2.3. Fungos endofíticos e sua importância	22
2.4. Atividades biológicas dos fungos endofíticos	25
2.4.1 Atividade Antimicrobiana.....	26
2.4.2 Atividade Antioxidante	27
2.4.3 Atividade Antiproliferativa.....	28
3 RESULTADOS	30
3.1 Artigo I.....	31
3.2 Artigo II	51
4 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

É notório que a atividade biológica da maioria dos compostos naturais do mundo ainda não foi testada e, há várias fontes inovadoras de biodiversidade disponíveis, visto a gama de espécies de plantas, organismos marinhos e diversidade microbiana, dentre outros, a serem explorados (HARVEY, 2007).

Assim, um aspecto crucial para a obtenção de novos fármacos derivados de produtos naturais, de acordo com Azevedo et al. (2000), é a seleção da fonte a ser estudada, pois, fontes pouco exploradas podem estar freqüentemente associadas a uma substância química inovadora. Neste sentido, os microrganismos compreendem uma enorme diversidade em espécies e, apesar das inúmeras aplicações biológicas reportadas na literatura (LAWAL et al., 2010; EL-NAGGAR; EL-ASSAR; ABDUL-GAWAD, 2009; GALLO et al., 2009), os fungos e bactérias constituem ainda um dos grupos menos estudados do ponto de vista do metabolismo secundário (HAWKSWORTH, 2001; STROBEL et al., 1996).

Neste contexto, Neto; Azevedo; Caetano (2004) apontam que o Brasil se torna um dos países que mais desperta o interesse das indústrias farmacêuticas, uma vez que possui uma das maiores biodiversidades do planeta, com enorme potencial para a descoberta de novas drogas de origem animal, vegetal ou microbiana. Esta última, principalmente, pois vem se destacando por sua grande diversidade genética e metabólica.

Sob este aspecto, as plantas do gênero *Rheedia*, cujas propriedades farmacológicas e químicas encontram-se bem descritas na literatura (ALMEIDA et al., 2008; COELHO et al., 2007; SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 1999; DELLE MONACHE; DELLE MONACHE; PINHEIRO, 1988; DELLE MONACHE; DELLE MONACHE; BETTOLO, 1983; CÔRREA, 1926), podem ser fontes promissoras de fungos endofíticos capazes de produzirem compostos bioativos de interesse.

A espécie *R. brasiliensis* Planch. & Triana (Syn. *Garcinia brasiliensis* Mart.), planta nativa da região Amazônica brasileira, é considerada a espécie mais conhecida do gênero *Rheedia*. Também chamada de “bacupari”, essa planta tem sido utilizada na medicina popular como agente cicatrizante, no tratamento de úlceras pépticas e tumores, inflamações do trato urinário, artrite e para aliviar dores (CORRÊA, 1926).

De acordo com Schulz et al. (2002) e Tan; Zou (2001), aproximadamente um quarto de todos os produtos naturais biologicamente ativos conhecidos até meados de 2001 foi obtido de fungos e, dentre todas as classes de fungos, uma que merece destaque é a dos fungos endofíticos devido à grande diversidade química e ineditismo de moléculas com algumas atividades biológicas descritas.

Conceitualmente, microrganismos endofíticos são aqueles que penetram a planta e vivem em seu interior, interagindo de forma mutualística, sem causar algum dano ou prejuízo ao seu hospedeiro (MENDES; AZEVEDO, 2007). Esses microrganismos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX, sendo Bary, em 1866, quem primeiro delineou a diferença entre eles e os patógenos de plantas (AZEVEDO, 1999; WILSON, 1995).

Singh; Barret (2006) apontam que medicamentos derivados de compostos obtidos pela fermentação microbiana têm desempenhado um papel tão importante quanto os provenientes diretos de fontes vegetais. Robinson; Singh; Nigham (2001) esclarecem que os processos fermentativos, tais como a fermentação semi-sólida (FSS) e fermentação submersa (FS), oferecem condições para a obtenção de metabólitos primários e secundários a partir de microrganismos, e vêm despertando cada vez mais o interesse das indústrias farmacêuticas pelo potencial biológico que estes metabólitos podem oferecer.

Há evidências da influência de microrganismos endofíticos em diversas características expressas pela planta devido à produção ou indução de metabólitos primários e secundários que podem conferir vantagens à mesma, tais como a produção de hormônios de crescimento e antibióticos, a proteção contra herbivoria pela produção de alcalóides, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (SEBASTIANES, 2010; NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Apesar de ainda não estar bem estabelecida a relação endófitos-hospedeiros, Tan; Zou (2001) propõem que a ação de enzimas oferece a possibilidade de recombinação genética do endófito com o hospedeiro durante a evolução e, esta poderia ser a razão mais plausível pela qual alguns endófitos possam produzir fitoquímicos originalmente característicos do hospedeiro, ou vice-versa. Um exemplo clássico é o taxol (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Diante deste panorama, o objetivo deste trabalho consistiu em isolar e selecionar fungos endofíticos das folhas de plantas do gênero *Rheedia* e testá-los

quanto a sua capacidade de produzir compostos bioativos que apresentem atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa.

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, pois 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; 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. Cerca de 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; Henri (2007) relataram que com estas e outras ferramentas, torna-se possível remover grande parte das dificuldades encontradas com estas fontes de estudo.

Conforme Singh; 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, é que provavelmente dará condições à descoberta de fármacos no futuro, bem como possibilitará novas aplicações na agricultura (DEMAIN, 2000).

Considerando a grande biodiversidade da flora brasileira, e 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). 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. A família Clusiaceae e a espécie *Rheedia brasiliensis*

O gênero *Rheedia* faz parte da família Clusiaceae (Guttiferae), que é composta por 25 gêneros, os quais se distribuem em nove tribos pertencentes a seis subfamílias, englobando mais de mil espécies que ocorrem nas regiões tropicais do globo. Este gênero tem demonstrado, pelos estudos químicos, ser possuidor de uma grande diversidade de substâncias de diferentes esqueletos químicos. Destacam-se as benzofenonas polipreniladas, flavonóides, proantocianinas e xantonas, que têm ações comprovadas contra várias doenças (DELLE MONACHE; DELLE MONACHE; PINHEIRO, 1988; DELLE MONACHE; DELLE MONACHE; BETTOLO, 1983).

A espécie *Rheedia brasiliensis* Planch. & Triana (Syn. *Garcinia brasiliensis* Mart.), também conhecida como *Rheedia gardneriana*, é nativa da região Amazônica e cultivada em todo o território brasileiro, sendo conhecida popularmente como bacuparil, bacuri, bacupari, porocó e bacuripari. Na medicina popular (conhecimento etnofarmacológico), as folhas da *R. brasiliensis* são utilizadas no tratamento de tumores, inflamações do trato urinário, artrite e para aliviar dores (CORRÊA, 1926).

Estudos fitoquímicos de frutos de *Rheedia gardneriana*, demonstraram a presença de alguns constituintes de grande importância por seu considerável poder

antioxidante, tais como os biflavonóides, xantonas, triterpenos e cumarinas (SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 1999).

Santos et al. (1999), isolou do extrato hexânico da casca de *R. gardneriana* uma nova benzofenona tetraprenilada, denominada 7-epiclusianona e uma fração rica nos sesquiterpenos α -copaeno, α -muuroleno, α -cadineno e cadineno, identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Almeida-Alves et al. (1999) avaliaram a ação da 7-epiclusianona sobre formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. Os resultados obtidos indicaram redução em 92% no número de tripomastigotas nas amostras de sangue de camundongos infectados (500 ppm), entretanto, foi inativa no teste *in vivo*, com os seguintes esquemas de tratamento: (A) dose oral única de 500 mg/Kg do peso corporal no pico da parasitemia e (B) dose de 100 mg/Kg do peso corporal por quatro dias, após a infecção. Ainda, a 7-Epiclusianona, a 20 ppm, foi inativa contra o fungo não patogênico *Cladosporium sphaerospermum*, e contra *Biomphalaria glabrata*, ambos nos testes *in vitro*. No teste para *Artemia salina*, usado para correlacionar com a citotoxicidade de substâncias, a amostra mostrou-se ativa com IC₅₀ de 25 μ g/mL (ALMEIDA-ALVES et al., 1999).

2.2. Processos fermentativos

Desde a descoberta de Pasteur com a fermentação de alimentos e, de Fleming, responsável pela era dos antibióticos, cientistas estudam metabólitos ativos produzidos por microrganismos objetivando encontrar compostos com atividades de interesse (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Medicamentos derivados de compostos obtidos pela fermentação microbiana têm desempenhado um papel tão importante quanto os provenientes diretos de fontes vegetais (SINGH; BARRET, 2006).

Existem vários processos de fermentação para obtenção de compostos bioativos (metabólitos primários e/ou secundários). A fermentação semi-sólida (FSS) é bastante empregada e adaptada para fermentação fúngica (SINGHANIA et al., 2009), podendo utilizar como substrato, por exemplo, sub-produtos agroindustriais como farelo de trigo (FERNANDES et al., 2009), germe de trigo (KIM et al., 2010),

arroz (EL-NAGGAR; EL ASSAR; ABDUL-GAWAR, 2009), soja, bagaço de cana-de-açúcar, que se justificam por sua obtenção em grande escala e a baixos custos, associados ao emprego de tecnologias não rebuscadas, com conseqüente economia do processo. A fermentação submersa (FS) ocorre em meio líquido e também tem sido muito empregada em processos fermentativos devido à maior facilidade de controle e de operação do processo (temperatura, pH, nutrientes) (ROBINSON; SINGH; NIGAM, 2001).

Os compostos sintetizados por fungos vão de metabólitos primários, como ácido cítrico e enzimas, até metabólitos secundários como alcalóides do Ergot e antibióticos (SHU, 2007; SCHULZ; BOYLE, 2005). Em geral, os metabólitos secundários são construídos a partir dos primários. A maioria dos metabólitos secundários fúngicos é proveniente de cinco vias metabólicas: via dos aminoácidos, via do ácido chiquímico, via dos policetídeos, via do ácido mevalônico e via dos polissacarídeos. A maioria dos efeitos terapêuticos dos metabólitos fúngicos em humanos relaciona-se aos metabólitos secundários (SHU, 2007).

2.2.1 Potencial biotecnológico do farelo de trigo

O emprego do farelo de trigo como substrato para processos fermentativos vem sendo muito utilizado (FERNANDES et al., 2009; EL-NAGGAR, EL-ASSAR, ABDUL-GAWAD, 2009; SUN et al., 2008, UL-HAQ, IDREES; RAJOKA, 2002) visando a obtenção de enzimas, antibióticos ou compostos bioativos, tais como, antimicrobiano, antioxidante e antiproliferativo.

O uso do farelo de trigo, em biorreatores, na obtenção do antibiótico meroparamicina foi considerado positivo uma vez que possibilitou com baixo custo a obtenção de um produto de alto valor agregado (EL-NAGGAR; EL ASSAR; ABDUL-GAWAR, 2009).

Sun et al. (2008) observaram que estabelecer previamente a composição do farelo de trigo possibilitou uma melhor produção de celulase e xilanase, apesar de não conseguirem estabelecer qual composto favoreceu essa melhora.

Ao utilizar farelo de trigo como substrato para a fermentação fúngica do endófito isolado do café, *Alternaria alternata*, Fernandes et al. (2009) verificaram

atividade antioxidante (ensaio do DPPH) para o extrato diclorometânico do farelo de trigo a 100 ppm, sendo que a capacidade sequestrante (CS) para o extrato de farelo de trigo foi aproximadamente de 10% e, para o extrato fúngico foi menor que 10%. Bernardes (2010), na fermentação de *Microsphaeropsis* isolado do cacau, também relatou atividade antioxidante (ensaio do DPPH) com extrato diclorometânico do farelo de trigo a 250 ppm, sendo aproximadamente 70% de CS para o extrato farelo de trigo e, valor menor que 70% para o extrato fúngico. Assim, reafirmaram o potencial antioxidante do farelo de trigo e, experimentalmente, os autores também observaram a influência que este substrato apresentou sobre a atividade antioxidante dos extratos fúngicos avaliados.

O potencial biológico deste substrato se evidencia também pelas indicações nutricionais de uso deste produto que pode vir a oferecer proteção contra doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e obesidade (WINTER, 2009). A autora relata ainda que o aminoácido triptofano, encontrado no farelo de trigo, foi o destaque para as atividades antioxidantes observadas em seu estudo e que, por todos os resultados encontrados, pôde-se considerar o farelo de trigo como um alimento importante para a saúde humana por ser biologicamente ativo, demonstrando também propriedades de inibição seletiva para células tumorais da próstata humana. Os ácidos graxos insaturados oléico, linoléico e linolênico presentes, provaram ser responsáveis também, por grande parte da atividade antioxidante do farelo de trigo. Apesar da atividade antioxidante, o extrato de farelo de trigo não demonstrou atividade imunomoduladora ou anti-inflamatória. Com base nesses achados, Winter (2009) destaca que o farelo de trigo pode sim ser considerado não mais um simples subproduto da indústria de farinha de trigo, e ainda observa seu grande potencial no mercado de alimentos funcionais.

Soares (2002) descreveu que a presença de compostos fenólicos (ácidos protocatecuico, gentísico, caféico, vanílico, clorogênico e ferúlicos), dentre outros, são importantes agentes antioxidantes no farelo de trigo, e, desta forma, podem vir a prejudicar determinados estudos de fermentação que envolva microrganismos cujo metabólito pretende ser estudado frente várias atividades ainda desconhecidas, que podem sofrer alguma influência se a matriz (substrato da fermentação) não for inerte.

2.3. Fungos endofíticos e sua importância

O termo endófito vem sendo usado desde o início do século XIX. São microrganismos representados basicamente por fungos e bactérias que colonizam o interior da planta, sem causar danos aparentes ao seu hospedeiro (MENDES; AZEVEDO, 2007; AZEVEDO, 1999). São de grande importância biotecnológica por produzirem metabólitos secundários que podem se tornar novos produtos farmacêuticos ou serem utilizados como agentes de controle biológico, por exemplo (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Bary, em 1866, foi quem primeiro delineou a diferença entre endófitos e fitopatógenos. Somente no final dos anos 70 que os microrganismos endofíticos começaram a adquirir importância por apresentarem interações simbióticas com o hospedeiro, protegendo-o do ataque de insetos e das doenças, por exemplo (AZEVEDO, 1999; WILSON, 1995).

É interessante considerar que, devido a desequilíbrios no metabolismo da planta, causados por situações de estresse, sejam eles de causa natural ou mesmo por práticas culturais mal realizadas, tais como uso excessivo de fertilizantes e outros produtos químicos, pode ocorrer um desequilíbrio na microbiota endofítica favorecendo a entrada de fitopatógenos (SCHULZ et al., 2002; AZEVEDO et al., 2000). Assim, mesmo que um microrganismo na condição de endófito não produza danos em uma determinada espécie ou variedade de planta, em situações de desequilíbrio, pode-se apresentar como um patógeno para o mesmo hospedeiro (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Isto porque a relação com as plantas depende de um gradiente de interações, a saber: parasitismo-comensalismo-mutualismo; que por sua vez dependem da adaptação e especificidade a um hospedeiro, bem como do estágio de desenvolvimento das partes envolvidas, da virulência inata do microrganismo, das respostas de defesa da planta hospedeira e das condições ambientais que permeiam a interação (AZEVEDO et al., 2000).

Os fungos endofíticos vivem pelo menos uma das fases do seu ciclo de vida no interior de tecidos vegetais, e durante esse tempo, esses microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta (RODRIGUES; DIAS FILHO, 1996; PEREIRA, 1993).

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário que podem ser secretados durante a fase estacionária do crescimento microbiano e não são diretamente essenciais à sobrevivência do organismo, podendo atuar de diferentes formas e sendo geralmente, a interface entre o microrganismo e o ambiente (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Desta forma, a interação endófito-planta pode ser classificada como mutualística, uma vez que o microrganismo recebe nutriente e proteção da planta e em contrapartida produz compostos químicos que, em condições de estresse do hospedeiro, aumentam sua capacidade competitiva e sua resistência contra fatores bióticos e abióticos (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Assim, os endófitos se tornam potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados também para obtenção de enzimas (STAMFORD et al., 1998), vitaminas, pigmentos (DEMAIN, 1992), toxinas (BACH; KIMATI, 1999), agentes anti-tumorais (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993), anti-micóticos (LI; STROBEL, 2001), anti-cárie (ALMEIDA et al., 2008).

Estes microrganismos, por viverem em ambientes com forte pressão de seleção, possuem um grande potencial para produção de substâncias inibidoras de microrganismos, por isso têm sido muito explorados pelos laboratórios de biotecnologia (SCHULZ et al., 2002). 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 10% foram descritos em literatura e apenas 1% verificado quanto à produção de algum tipo de metabólito secundário.

Durante a evolução dos fungos endofíticos no interior da planta hospedeira, eles podem adquirir capacidade de produção de algumas substâncias tipicamente produzidas pela planta (e vice-versa). Tal fato pode ser explicado pela captação de parte do DNA do hospedeiro para o interior do genoma fúngico e vice-versa (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Como exemplo, tem-se 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), substância que já movimentou mais de 9 bilhões de dólares.

Ainda hoje a fonte de Taxol é um problema frustrante devido à dificuldade e ao baixo rendimento obtido em sua síntese. Apesar de comprovada a capacidade de produção do paclitaxel por outros gêneros de fungos endofíticos (TABELA 1), de

outras espécies de plantas (LACAVA; SEBASTIANES; AZEVEDO, 2010; GANGADEVI; MUTHUMARY, 2008), bem como produção de outros compostos de importância biológica, estudos ainda procuram contornar o problema do rendimento pela busca de novas fontes desse quimioterápico. Seria fascinante se este problema pudesse ser suprido pela fermentação de endófitos em larga escala (TAN; ZOU, 2001) ou se os fungos pudessem ser manipulados para aumentar esta produção, solucionado de vez o suprimento desta droga (GANGADEVI, MUTHUMARY, 2008; STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Tabela 1. Exemplos de fungos endofíticos com capacidade de produzir taxol (agente anticancerígeno) e suas respectivas plantas hospedeiras.

Fungos endofíticos	Planta hospedeira	Referência
<i>Taxomyces andreanea</i>	<i>Taxus brevifolia</i>	Stierle et al. (1993)
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Taxus wallachiana</i>	Strobel et al. (1996)
<i>Stegolerium kukenani</i>	<i>Stegolepis guianensis</i>	Strobel et al. (2001)
<i>Fusarium maire</i>	<i>Taxus Maire</i>	Xu et al. (2006)
<i>Phyllosticta spinarum</i>	<i>Cupressus SP</i>	Kumaran et al. (2008a)
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	<i>Citrus medica</i>	Kumaran et al. (2008b)
<i>Fusarium solani</i>	<i>Taxus celebica</i>	Chakravarthi et al. (2008)
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	<i>Cardiospermum helicacabum</i>	Gangadevi; Muthumary (2008)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Justicia gendarussa</i>	Gangadevi; Muthumary (2008)
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	<i>Taxus baccata</i>	Venkatachalam et al. (2008)
<i>Aspergillus candidus</i>	<i>Taxus media</i>	Zhang et al. (2009)
<i>Chaetomella raphigera</i>	<i>Terminalia arjuna</i>	Gangadevi; Muthum ary (2009)

Fonte: Adaptado de Lacava, Sebastianes e Azevedo (2010); Gangadevi e Muthumary (2008).

Recentemente, alguns trabalhos publicados utilizando fungos endofíticos, demonstraram o potencial desta classe de microrganismos como fontes de novos biocompostos. Lin et al. (2007) isolaram 174 fungos endofíticos a partir de diferentes plantas medicinais, sendo que cerca de 28% dos isolados apresentaram compostos com atividade antimicrobiana contra pelo menos um microrganismo testado; 4% apresentaram compostos com atividade citotóxica e 2,3% apresentaram compostos com atividade para inibir protease.

O fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* vem se destacando na literatura por sua capacidade para produzir vários compostos de interesse, tais como taxol, um poderoso anticancerígeno (GANGADEVI; MUTHUMARY, 2008) além do ácido colletótrico, composto com propriedades antibacterianas e antifúngicas (GARCÍA-PAJÓN; COLLADO, 2003; LU et al., 2000). Arivudainambi et al. (2011) recentemente divulgaram o potencial deste fungo como produtor de metabólitos ativos contra *S. aureus* resistentes a metilina.

Paraconiothyrium sp., pertence ao recém criado gênero *Paraconiothyrium* (VERKLEY et al., 2004), e foi isolado de folhas do café no Brasil. Atualmente alguns trabalhos destacaram este gênero pela produção de vários compostos com atividade citotóxica (SHIONO et al., 2011; LIU et al., 2010).

Em outro trabalho, Weber et al. (2007) isolaram a partir de fungos endofíticos, seis compostos com atividade antifúngica, identificados como ceruleina (1), arundifungina (2), esfaeropsidina A (3), 5-(1,3-butadieno-1-y1)-3-(propene-1-y1)2-(5H)-furanona (4), ascoterosida A (5) e ascoterasida B (6). Dentre estes, destacaram-se compostos 2, 4 e 6, por apresentarem desempenho similar ao antifúngico comercial anfotericina B.

Da mesma forma, Wang et al. (2007) isolaram da planta *Quercus variabilis*, 67 fungos endofíticos, cujos produtos de fermentação em caldo czapek apresentaram atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias. Os autores identificaram o composto brefeldina A a partir do caldo da fermentação do fungo endofítico *Cladosporium* sp isolado de *Q. variabilis*.

Fernandes et al. (2009) isolaram 22 fungos endofíticos de *Coffea arábica*, com destaque para *Alternaria alternata*, cujo extrato diclorometânico demonstrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 69548. Os autores reiteram que os resultados obtidos em suas análises revelaram que este fungo endofítico pode ser fonte promissora de bioativos naturais.

2.4. Atividades biológicas dos fungos endofíticos

Estudos que contemplem a ampliação dos conhecimentos sobre a diversidade fúngica tendem a ser extremamente valiosos principalmente para a indústria farmacêutica, uma vez que possibilita a descoberta de novas substâncias bioativas (SINGH; BARRET, 2006; SCHULZ; BOYLE, 2005). A utilização indiscriminada de antibióticos tem selecionado microrganismos cada vez mais resistentes aos diversos medicamentos. Mudanças ambientais e estresses abióticos também contribuem com a resistência de patógenos, tornando imprescindível a descoberta de novas drogas (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Além das doenças infecciosas causadas por microrganismos, é cada vez mais freqüente o surgimento de outras patologias associadas ao estilo de vida do homem moderno como, por exemplo, o câncer.

2.4.1 Atividade Antimicrobiana

Em geral, os antibióticos são produtos de fermentação produzidos durante a fase estacionária do crescimento dos microrganismos. São definidos como produtos naturais (metabólitos secundários), produzidos por certos microrganismos e ativos contra outros em baixa concentração (ROBINSON; SINGH; NIGAM, 2001).

Uma cultura de microrganismos durante seu crescimento produz freqüentemente metabólitos secundários para sua proteção contra predadores presentes no meio, por exemplo. É por isso que supõem que os microrganismos são fontes de antimicrobianos (AZEVEDO et al., 2000).

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

Guimarães et al. (2008) isolaram 39 fungos endofíticos da *Viguiera arenaria* e *Tithonia diversifolia*, e verificaram que 64,1% dos extratos acetato de etila obtidos com a fermentação fúngica em caldo czapek, exibiram atividade contra *C. albicans* ATCC 1023, evidenciando que estes endófitos podem produzir compostos antifúngicos.

Os estudos conduzidos com os metabólitos extraídos do fungo endofítico *Curvularia* sp., isolado da planta *Sapindus saponária*, demonstraram a capacidade efetiva de inibir o crescimento de *E. coli*, indicando que este endófito exibe potencial para o uso no controle deste patógeno (ALBERTO et al., 2009).

O contínuo desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos se faz importante para superar as dificuldades relacionadas com o tratamento de doenças infecciosas causadas por patógenos resistentes (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002). Os fungos endofíticos têm emergindo como fonte alternativa para a produção de novos agentes antimicrobianos (GUIMARÃES et al., 2008).

2.4.2 Atividade Antioxidante

Uma substância antioxidante pode ser definida de forma geral como qualquer substância que atrasa, previne ou repara os danos oxidativos a uma molécula (MOON; SHIBAMOTO, 2009; ABDALA, 1993).

A oxidação constitui parte fundamental do nosso metabolismo, sendo os radicais livres produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (DUTRA; LEITE; BARBOSA, 2008).

O excesso de radicais livres no organismo tende a ser combatido por antioxidantes produzidos pelo próprio corpo ou absorvidos da dieta por meio da ingestão de α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pró-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides (WINTER, 2009). No aspecto preventivo, é interessante ressaltar a correlação existente entre atividade antioxidante e capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células em geral (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Quando isso não acontece, ocorrem os efeitos prejudiciais desse excesso, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (SOARES, 2002; VISIOLI; KEANEY JR; HALLIWELL, 2000). Dessa forma, o excesso de radicais livres encontra-se relacionado com várias patologias, tais como psoríase, artrite, doenças

do coração, catarata, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (WOLTERS, 2005; VISIOLI; KEANEY JR; HALLIWELL, 2000).

Segundo Harper et al. (2003), a partir do fungo endofítico *Pestalotiopsis microspora*, foi preparado um produto chamado Pestacin[®] (1,5,7-tri-substituído), quimicamente denominado 1,3-dihidro isobenzofurano, o qual apresentou moderadas propriedades antifúngicas e uma atividade antioxidante onze vezes maior que a vitamina E.

Estudo realizado com 292 endófitos provenientes de 29 plantas medicinais chinesas tradicionais revelou que alguns dos endófitos foram capazes de produzir metabólitos com forte atividade antioxidante, indicando que esses fungos endofíticos cultivados podem ser uma potencial fonte de novos antioxidantes naturais (HUANG et al., 2007).

2.4.3 Atividade Antiproliferativa

O século XX apresentou um avanço extraordinário na pesquisa de produtos naturais, especialmente de plantas e microrganismos, no campo da oncologia, propiciando a descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapêutica antineoplásica (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Grande parte dos fármacos antitumorais utilizados em clínica são produtos naturais derivados de plantas, microrganismos ou animais, sendo que mais de 60% dos medicamentos utilizados tem, em alguma instância, sua origem relacionada a uma fonte natural (NEWMAN; CRAG, 2007).

Os tumores malignos são responsáveis por um número expressivo e crescente de pacientes em todo o mundo. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima para o ano de 2012-2013, cerca de 520 mil novos casos da doença e uma mortalidade que deverá atingir mais de 250 mil portadores de câncer. O estudo destaca os tipos de câncer mais incidentes nas regiões brasileiras, como de pele não melanoma, próstata, mama e pulmão. As sete novas localizações de tumores são bexiga, ovário, tireóide (nas mulheres), Sistema Nervoso Central, corpo do útero, laringe (nos homens) e linfoma não Hodgkin (INCA, 2011).

As células cancerígenas possuem comportamento alterado devido a mutações sofridas pelo seu DNA. Estas mutações permitem que a célula prolifere desreguladamente e lhe confirmam capacidade de invadir outros tecidos do organismo. O câncer pode matar devido à invasão destrutiva de órgãos sadios pelas células cancerígenas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

As fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico.

Taxol é um alcalóide diterpeno complexo com atividade antitumoral, que foi isolado pela primeira vez de *Taxus brevifolia*, há mais de 40 anos (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). O mecanismo do taxol se deve à sua interação com a proteína tubulina que está presente em vários processos de divisão celular. Ao se ligar com a tubulina polimerizada (microtúbulos), o taxol impede que esta se despolimerize. A divisão celular não ocorre, pois neste processo é necessário tubulina despolimerizada para concluir todas as etapas do ciclo celular. Com o processo comprometido, há inibição da mitose da célula tumoral (STROBEL; DAISY, 2003). O taxol, cujo princípio ativo é o paclitaxel, tem sido usado para curar muitos tumores malignos, como câncer de mama, câncer de ovário e de pulmão (PANDI; MANIKANDAN; MUTHUMARY, 2010).

O paclitaxel (Taxol® da Bristol-Myers Squibbb®) e seus derivados representam o primeiro e maior grupo de agentes anticancerígenos já descobertos, que podem ser produzidos também por vários fungos endofíticos, como apresentado anteriormente na TABELA 1 (STROBEL; DAISY, 2003). Entretanto, comercialmente essa descoberta ainda não é relevante, pois não foi estabelecida uma técnica de obtenção deste composto em larga escala que solucionasse o problema de rendimento (GANGADEVI, MUTHUMARY, 2008; TAN; ZOU, 2001; STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

De acordo com Costa-Lotufo et al. (2010), apesar da introdução de novos fármacos no arsenal terapêutico do câncer, vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado e novos alvos terapêuticos precisam ser conhecidos e testados, o que incentiva pesquisadores a realizar pesquisas de prospecção de novas moléculas com potencial atividade antitumoral.

2 RESULTADOS

Conforme descrito nas normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, artigo 22, a critério do Orientador e do Discente, a Dissertação poderá ser apresentada sob a forma de 01 (um) volume contendo: uma Revisão de Literatura, 01 (um) Artigo Científico (número mínimo), sendo representativo dos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa proposta no Programa, tendo o mestrando como primeiro autor.

No presente trabalho, os resultados serão apresentados a seguir, sob a forma de dois Artigos, redigidos para publicação em periódicos na área de Farmácia.

Inicialmente a proposta foi empregar farelo de trigo nos processos fermentativos, por suas características apresentadas anteriormente. Entretanto, conforme poderá ser observado no artigo II, o substrato escolhido apresentou comportamento indesejado e inesperado durante o processo fermentativo fúngico, não somente com *C. gloeosporioides* P67F1/1, selecionado para discussão no artigo, mas também em outros fungos isolados neste trabalho. Desta forma, buscou-se na literatura outros meios de fermentação cujos extratos não interferissem significativamente nos ensaios, de forma a evitar os mesmos impasses encontrados com o farelo de trigo. Assim, optou-se por estudar a fermentação submersa, utilizando, dentre outros caldos, o caldo czapek, quimicamente definido e empregado na literatura em processos fermentativos cujos objetivos assemelhavam-se aos do presente estudo. Desta forma, os resultados podem ser conferidos no artigo I, apresentado a seguir.

3.1 Artigo I

O artigo I, intitulado “***Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: FUNGO ENDOFÍTICO ASSOCIADO À PLANTA *Rheedia brasiliensis* PRODUTOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS**” estudou as propriedades biológicas do extrato obtido na fermentação submersa em caldo czapek do fungo endofítico *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1, isolado a partir de folhas de *R. brasiliensis*, testando-o quanto a sua capacidade em produzir compostos bioativos com atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa.

***Paraconiothyrium* sp. P83F4/1: FUNGO ENDOFÍTICO ASSOCIADO À PLANTA *Rheedia brasiliensis* PRODUTOR DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho¹, Priscilla Oliveira Amaral¹, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz², Severino Matias de Alencar³, Ludwig Heinrich Pfenning⁴, João Ernesto de Carvalho², Masaharu Ikegaki¹.

¹Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, Brasil

²CPQBA, Campinas, SP, Brasil

³ Departamento de Agro-Indústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brasil

⁴ Laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

Resumo: Objetivou-se neste trabalho isolar fungos endofíticos das folhas de *Rheedia brasiliensis*, selecionando o mais promissor e testá-lo quanto à capacidade em produzir metabólitos bioativos com atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa. Foram analisados 245 fragmentos de folhas de *R. brasiliensis* com isolamento de 154 fungos endofíticos (frequência de isolamento de 62,86%). O isolado que se destacou na triagem antimicrobiana foi *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 e, desta forma seu extrato fermentado em caldo czapek foi selecionado para estudos mais avançados. Este é o primeiro relato do isolamento deste fungo endofítico em folhas de *R. brasiliensis*. No ensaio antimicrobiano, as cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* apresentaram-se susceptíveis ao extrato fúngico, sendo o destaque maior contra *S. aureus*, cuja concentração inibitória mínima foi de 500-1000 µg/mL. A média da % capacidade sequestrante±desvio padrão (pelo método do DPPH - radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil) a 90 ppm, para o extrato fúngico foi de 58,92±0,024 (%), sendo significativamente (p<0,05) superior ao padrão comercial butil hidroxi tolueno: 39,52±0,095 (%). O extrato bruto de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 também apresentou destaque no ensaio antiproliferativo por sua seletividade sobre as células HaCat (queratinócito humano, célula imortalizada), células importantes em patologias como a psoríase, sendo o GI₅₀ de 0,95 µg/mL (média do log GI₅₀ = -0,02). Estes resultados apontam para a potencialidade do extrato bruto da fermentação do fungo *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 e encorajam a continuidade dos estudos com aprofundamento dos conhecimentos sobre a composição química e mecanismos de ação envolvidos nas atividades evidenciadas.

Palavras-chaves: Fermentação submersa; caldo czapek; radical DPPH; células HaCat.

1. Introdução

Um aspecto crucial para a obtenção de novos fármacos derivados de produtos naturais é a seleção da fonte a ser estudada, pois, fontes pouco exploradas ou que apresentem conhecimento etnofarmacológico, podem resultar no isolamento de uma substância química inovadora (AZEVEDO et al., 2000).

Considerando a grande biodiversidade da flora brasileira, e 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).

As plantas do gênero *Rheedia* (família Clusiaceae) apresentam propriedades farmacológicas e químicas bem descritas na literatura. Na medicina popular, as folhas da *Rheedia brasiliensis* Planch. & Triana (Syn. *Garcinia brasiliensis* Mart.) são utilizadas no tratamento de tumores, inflamações do trato urinário, artrite e para aliviar dores (ALMEIDA et al., 2008; COELHO et al., 2007; SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 1999; DELLE MONACHE; DELLE MONACHE; DELLE MONACHE; PINHEIRO, 1988; DELLE MONACHE; BETTOLO, 1983; CÔRREA, 1926).

Fungos e bactérias constituem ainda um dos grupos menos estudados do ponto de vista do metabolismo secundário (HAWKSWORTH, 2001; STROBEL et al., 1996). Neste contexto, destacam-se os fungos endofíticos, que vivem pelo menos uma das fases do seu ciclo de vida no interior de tecidos vegetais (AZEVEDO, 1999), e durante esse tempo, produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários com diversidade química e moléculas inéditas, os quais podem conferir diversas vantagens à planta (STROBEL; DAISY, 2003; SCHULZ et al., 2002; RODRIGUES; DIAS FILHO, 1996).

Apesar de ainda não estar bem estabelecida a relação endófitos-hospedeiros, a literatura (TAN; ZOU, 2001) propõe que a ação de enzimas oferece a possibilidade de recombinação genética do endófito com o hospedeiro durante a evolução e, esta poderia ser a razão mais plausível pela qual alguns endófitos possam produzir fitoquímicos originalmente característicos do hospedeiro, ou vice-versa. Diante disto, os fungos endofíticos também viabilizam a preservação dos vegetais, visto que para o isolamento destes microrganismos é necessário apenas uma pequena porção de tecido vegetal, obtida de forma não predatória. A descoberta por Stierle; Strobel; Stierle (1993) de que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* produzia taxol foi importantíssima para evitar a extinção de sua planta hospedeira, *Taxus brevifolia*, de onde originalmente foi obtido o taxol.

Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em isolar fungos endofíticos das folhas de *Rheedia brasiliensis*, selecionando o mais promissor e testá-lo quanto à capacidade em produzir metabólitos bioativos com atividades biológicas de interesse.

2. Materiais e Métodos

2.1 Desinfecção, processamento do material botânico e isolamento de fungos endofíticos das folhas de *R. brasiliensis*

Folhas aparentemente sadias de *R. brasiliensis* Planch. & Triana (Syn. *Garcinia brasiliensis* Mart.) foram coletadas de árvores crescidas sob controle do herbário da Universidade Federal de Viçosa (latitude sul 20°45'14'' e longitude oeste 42°52'55''), Minas Gerais, Brasil, onde a exsicata está depositada com o número VIC2604.

As folhas foram previamente lavadas sob água corrente e submetidas à desinfecção superficial por imersão em etanol 70% (v/v) por 1 minuto, hipoclorito de sódio 3% por 4 minutos, e etanol 98% (v/v) por 30 segundos, sendo posteriormente secas em câmara de fluxo laminar (PETRINI et al., 1992). Como prova de esterilização, foram semeadas em meio ágar-batata-dextrose (ABD), alíquotas de água da última lavagem dos fragmentos vegetais e incubados a 25°C.

Discos de folha com tamanho aproximado de 5 mm, obtidos com bisturi estéril, foram transferidos em número de 5 fragmentos para placas de Petri (90 mm diâmetro) contendo meio de cultura MA2 (extrato de malte 2%, ágar 2%) suplementado com sulfato de estreptomicina (50 mg/L) para suprimir crescimento de bactérias e ciclosporina A (10 mg/L) para limitar o desenvolvimento de fungos de crescimento rápido. Incubou-se a 25°C, em estufa BOD, com avaliação diária por um período de 20 dias, observando ocorrência de crescimento de colônias fúngicas a partir do material vegetal inoculado.

Para caracterização do isolado fúngico, avaliou-se a colônia desenvolvida em placa de Petri contendo o meio MA2, sem antibióticos, sendo as características morfológicas necessárias para a identificação observadas pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning da Universidade Federal de Lavras.

A taxa de colonização fúngica foi observada por avaliação macroscópica dos microrganismos isolados, considerando-se número de fragmentos vegetais com crescimento fúngico dividido pelo número total de fragmentos vegetais (Araújo et al., 2010).

2.2 Processo de fermentação, extração e concentração dos metabólitos bioativos

As culturas foram repicadas em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (ABD) e incubadas em estufa BOD a 25°C, até crescimento satisfatório.

Discos, de aproximadamente 5 mm de diâmetro, de isolados fúngicos crescidos em ABD (colônia recente) foram cortados a partir da borda da colônia e transferidos assepticamente para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 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 – qsp 1000mL] (RAPER; FENNELL, 1965).

A cultura foi incubada em estufa BOD por 10-20 dias, a 25°C, em condições estáticas. Para obter os extratos fúngicos, após o período de incubação, o micélio fúngico foi separado da cultura por filtração a vácuo. O filtrado líquido obtido foi extraído quatro vezes com acetato de etila (1:1). A fase orgânica foi coletada e o solvente (acetato de etila) foi removido em evaporador rotativo a vácuo.

Como controle negativo foi preparado o extrato do caldo czapek utilizando frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL deste caldo, o qual foi extraído quatro vezes com acetato de etila (1:1). A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica seca por meio de rotaevaporação à vacuo.

2.3 Triagem antimicrobiana

Os extratos fúngicos e do caldo czapek foram avaliados quanto à susceptibilidade microbiana, utilizando metodologia descrita por Lorian (1996), com algumas modificações. Os microrganismos testados foram *Staphylococcus aureus* ATTC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Preparou-se as suspensões microbianas em solução salina estéril a 75% de transmitância em 660 nm, o que equivale a 3×10^8 UFC/mL. Cada suspensão (1% do inóculo) foi homogeneizada em agar Mueller Hinton e vertida em placa de Petri. Orifícios (poços) foram realizados no agar para comportar as alíquotas testes e controles. Foram transferidos 50 µL/poço do extrato fúngico (solução alcóolica a 25 mg/mL), 50 µL/poço do caldo czapek (solução alcóolica a 25 mg/mL) e 50 µL/poço do solvente álcool etílico absoluto. Após período de incubação (37°C/ 24 horas), mediu-se a zona de inibição (mm). O ensaio foi conduzido em duplicata.

2.4 Ensaios microbiológicos

A concentração inibitória mínima (CIM) e a bactericida mínima (CBM) foram determinadas pela metodologia da microdiluição em caldo, utilizando microplacas com 96 compartimentos, conforme orientações descritas pelo Manual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005), Sarker; Nahar; Kumarasamy (2007) e Mann; Markham (1998), com algumas modificações.

O volume final de cada compartimento da microplaca foi de 100 µL de uma mistura composta por caldo Mueller Hinton, solução do extrato em estudo (fúngico e caldo czapek) e suspensão do microrganismo. Inicialmente adicionou-se 50 µL por compartimento da solução da amostra dispersa em caldo de cultivo, compreendendo a faixa de concentração de 7,8-1000 µg/mL em caldo Mueller Hinton. A suspensão (0,1% do inóculo de *S. aureus* e 1% do inóculo de *E. coli* ambos a 75% transmitância em 660 nm) foi homogeneizada também em caldo Mueller Hinton e distribuídas 50 µL por compartimento da microplaca, sendo posteriormente incubada em estufa a 37°C por 24h. Após a incubação, a leitura foi realizada com o revelador resazurina, adicionando-se 50 µL/compartimento. Valores de CIM e CBM acima de 1000 µg/mL foram considerados não ativos.

Alguns orifícios da placa foram utilizados para os seguintes controles:

- da esterilidade do caldo Mueller Hinton (branco do meio de cultivo);
- do inóculo (branco do crescimento bacteriano);
- do solvente utilizado na solubilização dos extratos: 160 µL de álcool etílico absoluto: 840 µL de caldo Mueller Hinton (controle negativo do crescimento bacteriano);
- da esterilidade dos extratos fúngico e caldo czapek avaliados (branco das amostras).

Todas as amostras foram testadas em triplicata e a leitura do ensaio foi feita pelo método visual (colorimétrico).

2.5 Ensaio antioxidante

A medida da atividade sequestrante de radicais DPPH (radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Miranda; Fraga (2006) e Yen; Chang; Duh (2005), com algumas modificações.

Foram adicionados 4,0 mL da solução dos extratos (fúngico e czapek), na concentração de 90 µg/mL (90 ppm), a 1,0 mL de solução do radical DPPH (0,5 mM). A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob proteção de luz, por 30 minutos

para posterior leitura espectrofotométrica (em triplicata) da absorbância a 517 nm. Utilizou-se o álcool etílico como branco; ácido ascórbico e BHT (butil hidroxi tolueno) como controle positivo, na mesma concentração dos extratos estudados. A degradação do DPPH foi avaliada pela comparação com o controle negativo (4,0 mL de etanol com 1,0 mL solução alcoólica de DPPH 0,5 mM). A capacidade sequestrante do DPPH foi calculada pela fórmula:

$$\%CS = \frac{Abs\ controle\ negativo - Abs\ amostra}{Abs\ controle\ negativo} \times 100$$

Onde Abs = Absorbância

% CS = % capacidade sequestrante

A atividade antioxidante do extrato fúngico foi analisada pelo teste ANOVA (análise de variância) que comparou estatisticamente os extratos (fúngico e caldo czapek) juntamente com os controles positivos BHT e ácido ascórbico (vitamina C). O teste avaliou se os resultados foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$), utilizando-se o programa MatLab 7.0.

2.6 Ensaio antiproliferativo

O extrato foi avaliado quanto a sua atividade antiproliferativa em células tumorais humanas utilizando-se o ensaio da sulforrodamina B (SRB) para avaliação do crescimento celular de acordo com Monks et al. (1991). O ensaio foi realizado no CPQBA-Unicamp-Campinas/SP.

Empregaram-se sete linhagens de células tumorais humanas (Tabela 1), cedidas gentilmente pelo *National Cancer Institute* (NCI - EUA) e mantidas no laboratório de cultura de células do Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola – CPQBA, em frascos de 25 cm³ (Nunc[®]), com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®]) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

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

<i>Linhagem</i>	<i>Órgão/Doença</i>	<i>Origem Embrionária</i>
U251	SNC; glioma	Ectoderme
MCF-7	Mama; adenocarcinoma	Ectoderme
NCI-ADR/RES *	Ovário; adenocarcinoma	Ectoderme
786-0	Rim; adenocarcinoma	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

* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos

Foram inoculados 100 μL /compartimento, em placas de 96 compartimentos (Nunc[®]), de uma suspensão com densidade de inoculação entre 3×10^4 e $6,5 \times 10^4$ cel/mL em meio RPMI/SFB acrescido de 2 mL/L de Penicilina : Estreptomicina (1000 UI/mL : 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Schering Plus[®]). Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, adicionou-se 100 μL /compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Para preparação das amostras, uma alíquota de 10 mg do extrato foi dissolvida em 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, 50 μL dessa 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 preparação das concentrações finais de 0,25; 2,5; 25 e 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A concentração final de DMSO não interferiu no crescimento celular.

Como controle positivo utilizou-se o quimioterápico Doxorubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Procedeu-se à fixação com ácido tricloroacético (TCA) a 50% da placa controle chamada T₀, que permitiu determinar qual a quantidade de células no momento da adição das amostras.

Ao final de 48h de incubação, as células foram fixadas com 50 μL /compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1h a 4°C; a seguir, estas placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as células foram coradas com 50 μL /compartimento de sulforodamida B (SRB) 0,4% (p/v), dissolvido em ácido acético 1%, e mantidas por 60 minutos a 4°C; em seguida, foram lavadas, quatro vezes, com ácido acético 1%, e secas à temperatura ambiente. Finalmente o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com Trizma Base (Sigma[®]), 10 μM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm 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. 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.

2.7 Determinação da composição química dos extratos por CG-EM

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

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

As análises em CG-EM foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu, modelo GC 2010, acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu, modelo QP 2010 Plus. A separação ocorreu em coluna capilar (RTX5MS, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). A temperatura inicial da coluna foi de 80°C, durante 1 minuto e atingiu 320°C, a uma taxa de 20°C/min e permaneceu nessa temperatura por 20 minutos, totalizando 69 minutos de análise. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste (vazão na coluna de 1 mL/min). A temperatura do injetor foi de 280°C e o volume de injeção foi de 0,4 μ L em modo “split” numa razão de 1:20. A integração foi feita utilizando-se o software LabSolutions-GCMS solution, e a identificação dos compostos detectados foi realizada por comparação com os dados dos espectros de massas da biblioteca Wiley8. Os compostos que não foram identificados, foram caracterizados por meio do seu fragmentograma (relação massa-carga m/z).

3. Resultados e Discussão

3.1 Isolamento e seleção dos fungos endofíticos

Foram analisados 245 fragmentos de folhas de *R. brasiliensis* com isolamento de 154 fungos (frequência de isolamento de 62,86%). Selecionou-se o fungo *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 (identificado conforme suas características morfológicas) pelo desempenho de seu extrato na triagem antimicrobiana, cujos halos de inibição contra

S. aureus foram de 11 mm e contra *E. coli*, de 14 mm. Esse é o primeiro relato do isolamento de *Paraconiothyrium* a partir de folhas de *R. brasiliensis*.

Paraconiothyrium sp. (*Paraconiothyrium* Verkley gen. nov.) faz parte do gênero *Paraconiothyrium*, recém-criado e descrito por Verkley et al. (2004). No Brasil, a literatura descreve o isolamento de *Paraconiothyrium* sp. como endófito apenas da fruta de *Coffea arabica* e de sedimentos marinhos (VERKLEY et al., 2004). No sul da África, este fungo foi isolado de diferentes espécies de *Prunus* spp. (árvores de pêssego, nectarina e ameixa) (DAMM et al., 2008). Alguns trabalhos apresentam novos compostos bioativos provenientes da fermentação de *Paraconiothyrium* sp., tais como isolamento de três novas epoxyphomalinas (3-5), cujas atividades citotóxicas, em particular para próstata e bexiga, são mencionadas para a epoxyphomalina 4 (MOHAMED et al., 2010). Novos sesquiterpenos tricíclicos denominados brasilamides A-D (1-4) foram isolados da cultura de *P. brasiliense* Verkley (LIU et al., 2010). Seis diterpenos isopimarane foram isolados do fungo endofítico *Paraconiothyrium* sp. MY-42 e alguns destes compostos apresentaram atividade citotóxica contra linhagens tumorais (SHIONO et al., 2011).

3.2 Determinação da composição química dos extratos

Os cromatogramas e a provável composição química para os extratos fúngico de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 e caldo czapek estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 1-A e 1-B e nas Tabelas 2 e 3, de acordo com técnicas e condições expostas anteriormente.

Analisando o cromatograma do extrato fúngico (Figura 1-A) e a Tabela 2, observou-se que este apresentou como composto principal o ácido graxo saturado butanodióico com intensidade relativa de 22,80%. Foram identificados ainda outros ácidos graxos saturados como o ácido butanóico, bem como compostos fenólicos (ácido benzóico, ácido benzenopropanóico), açúcares e carboidratos.

Mohamed et al. (2010) isolaram três novas epoxyphomalinas do produto de fermentação do *Paraconiothyrium sporulosum* em meio sólido contendo levedura, malte e glicose. Liu et al. (2010) realizaram a fermentação em arroz com *Paraconiothyrium brasiliensis* e obtiveram novos sesquiterpenos tricíclicos denominados brasilamides A-D. Shiono et al. (2011) obtiveram seis diterpenos isopimarane após processo fermentativo com *Paraconiothyrium* sp MY-42 utilizando arroz integral. Na tentativa de comparar os constituintes desconhecidos encontrados nos extratos estudados neste trabalho (Tabelas 2 e 3) foi realizada uma análise do perfil de fragmentação dos compostos já descritos

pela literatura para este fungo. No entanto, não foi possível estabelecer uma relação entre esses compostos uma vez que não ficaram claros os métodos de derivatização empregados nos artigos consultados.

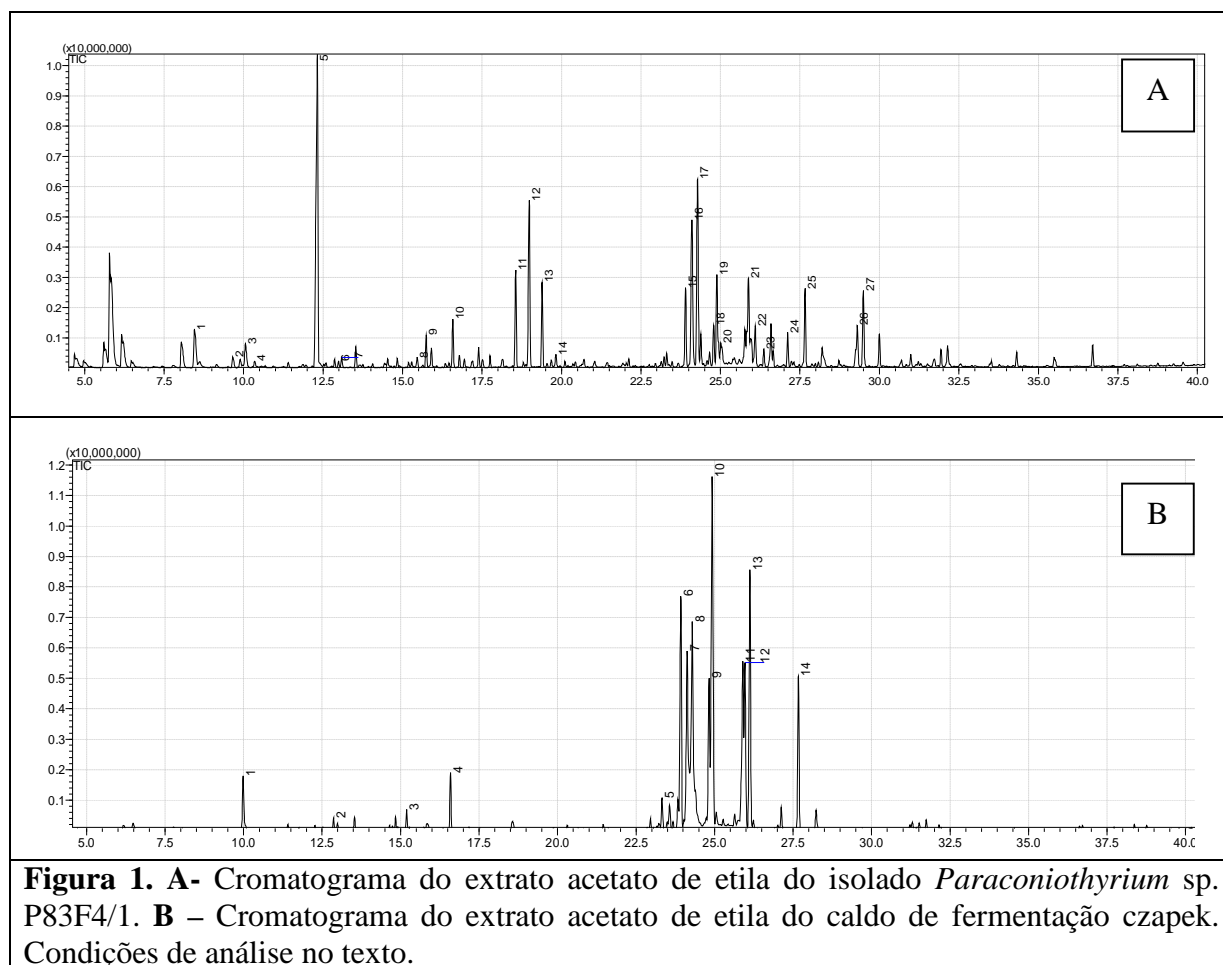


Tabela 2. Composição química do extrato acetato de etila do isolado *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1

Picos	Compostos	Tempo de retenção	% Área	m/z
1	Propanoic Acid, 2-Methyl-3-[(Trimethylsilyl)Oxy]-, Trimethylsilyl Ester	8,46	2,98	233 (20) 177 (14) 147 (100) 103 (15) 73 (71) 66 (14) 45 (15)
2	Butanoic Acid, 3-Methyl-3-[(Trimethylsilyl)Oxy]-, Trimethylsilyl Ester	9,66	0,73	247 (22) 205 (8) 147 (86) 131 (100) 75 (25) 73 (88)
3	2-Phenylethyl Trimethylsilyl Ether	10,06	1,51	194 (1) 179 (65) 105 (24) 103 (79) 75 (33) 73 (100)
4	Pentanoic Acid, 4-Methyl-2-[(Trimethylsilyl)Oxy]-, Trimethylsilyl Ester	10,35	0,29	233 (6) 159 (87) 147 (53) 103 (71) 73 (100) 45 (16)
5	Butanedioic Acid, Bis(Trimethylsilyl) Ester	12,32	22,80	262 (1) 247 (21) 147 (100) 75 (18) 73 (56) 55 (8)
6	Pyrimidine, 2,4-Bis[(Trimethylsilyl)Oxy]-	12,99	0,23	256 (53) 241 (100) 113 (26) 99 (58) 73 (43) 45 (16)
7	2-Butenedioic Acid (E)-, Bis(Trimethylsilyl) Ester	13,09	0,44	246 (21) 245 (100) 147 (58) 75 (40) 73 (99) 45 (27)
8	2-Pentenedioic Acid, 3-Methyl-, Bis(Trimethylsilyl) Ester, (E)-	15,46	0,53	273 (42) 198 (38) 183 (27) 170 (25) 147 (100) 109 (26) 73 (97)
9	Trimethylsilyl-2-[(trimethylsilyloxi)ciclohexanocarboxilado	15,74	1,47	288 (5) 273 (64) 183 (30) 170 (28) 147 (54) 129 (63) 81 (83) 73 (100)
10	Desconhecido 1	16,58	2,22	336 (3) 306 (13) 271 (44) 205 (72) 147 (86) 117 (45) 73 (100)
11	Desconhecido 2	18,56	4,93	282 (26) 267 (20) 193 (13) 179 (100) 103 (9) 73 (37)
12	Benzenepropanoic Acid, Alpha-[(Trimethylsilyl)Oxy]-, Trimethylsilyl Ester	18,99	9,78	295 (22) 267 (17) 220 (43) 194 (40) 193 (100) 73 (79)
13	Silane, [1,2,3-Benzenetriyltris(Oxy)]Tris[Trimethyl-	19,39	4,13	343 (20) 342 (58) 327 (8) 239 (100) 133 (8) 73 (95)
14	Benzoic Acid, 4-[(Trimethylsilyl)Oxy]-, Trimethylsilyl Ester	19,82	0,57	282 (26) 267 (90) 223 (59) 193 (60) 126 (16) 73 (100)
15	Glucofuranoside 1	23,90	3,93	364 (2) 217 (100) 204 (44) 147 (23) 117 (23) 73 (99)
16	Desconhecido 3	24,10	9,89	437 (53) 370 (69) 311 (35) 217 (88) 193 (99) 147 (22) 73 (100)
17	D-Fructose, 1,3,4,5,6-Pentakis-O-(Trimethylsilyl)-	24,28	10,86	437 (23) 365 (4) 217 (100) 204 (25) 147 (27) 73 (94)
18	Desconhecido 4	24,79	1,93	204 (100) 73 (97) 205 (20) 226 (59) 239 (37) 147 (21) 246 (19) 267 (10)
19	Glucofuranoside 2	24,88	4,55	364 (2) 217 (100) 204 (44) 147 (23) 117 (23) 73 (99)
20	Desconhecido 5	25,01	0,40	437 (4) 369 (100) 370 (32) 295 (10) 239 (7) 217 (14) 73 (47)

Tabela 3. Composição química do extrato acetato de etila do meio líquido de fermentação caldo czapek.

Picos	Compostos	Tempo de retenção	% Área	m/z
1	2-Propanone, 1,3-Bis-[(Trimethylsilyl)Oxy]-	9,98	2,17	219 (7) 189 (15) 147 (11) 129 (6) 103 (44) 73 (100)
2	Propanoic Acid, 2,3-Bis[(Trimethylsilyl)Oxy]-, Trimethylsilyl Ester/ Glyceric Acid, TMS	12,87	0,42	307 (4) 292 (23) 205 (13) 189 (41) 147 (67) 73 (100) 45 (24)
3	Desconhecido 6	15,19	0,61	256 (3) 228 (100) 217 (28) 184 (20) 147 (37) 110 (24) 73 (70)
4	Desconhecido 7	16,59	1,97	336 (3) 306 (13) 205 (77) 147 (89) 117 (45) 103 (16) 73 (100)
5	Desconhecido 8	23,33	1,10	365 (39) 247 (12) 191 (16) 157 (24) 147 (30) 129 (39) 73 (100)
6	Glucofuranoside 1	23,93	10,74	364 (2) 217 (100) 204 (44) 147 (23) 132 (33) 129 (70) 117 (23) 73 (99)
7	Hexose 1	24,13	10,74	437 (23) 365 (4) 217 (100) 204 (25) 147 (27) 73 (94)
8	D-Fructose, 1,3,4,5,6-Pentakis-O-(Trimethylsilyl)-	24,29	12,54	437 (23) 365 (4) 217 (100) 204 (25) 147 (27) 73 (94)
9	Glucopyranose 1	24,83	6,49	363 (2) 205 (20) 204 (100) 191 (26) 147 (22) 73 (90)
10	Glucofuranoside 2	24,93	19,10	364 (2) 217 (100) 204 (44) 147 (23) 129 (70) 117 (23) 73 (99)
11	Talose, 2,3,4,5,6-Pentakis-O-(Trimethylsilyl)-	25,90	8,90	435 (2) 217 (27) 204 (100) 191 (39) 147 (17) 73 (56)
12	Desconhecido 9	25,97	6,81	363 (4) 233 (17) 217 (67) 204 (95) 191 (67) 147 (40) 73 (100)
13	Glucopyranose 2	26,13	11,87	363 (2) 205 (20) 204 (100) 191 (26) 147 (22) 73 (90)
14	D-Glucose, 2,3,4,5,6-Pentakis-O-(Trimethylsilyl)-	27,67	6,54	435 (2) 204 (100) 191 (48) 147 (18) 73 (58)

3.3 Determinação da atividade biológica dos extratos

3.3.1 Atividade antimicrobiana

Na Tabela 4, estão descritos os resultados de atividade antimicrobiana para o extrato de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 frente às cepas de *S. aureus* e *E. coli*, com presença de halo de inibição para ambos microrganismos testados e destaque para concentração inibitória mínima (CIM) contra *S. aureus*.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana do extrato acetato de etila do isolado *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 e do caldo czapek.

Extrato	<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
	Halo de inibição (mm)	CIM ^a (mg/mL)	CBM ^b (mg/mL)	Halo de inibição (mm)	CIM ^a (mg/mL)	CBM ^b (mg/mL)
<i>Paraconiothyrium</i> sp. P83F4/1	11	500-1000	>1000	14	>1000	>1000
Caldo czapek	0	NA	NA	0	NA	NA

a) CIM: concentração inibitória mínima; b) CBM: concentração bactericida mínima; NA: não ativo para concentrações testadas (7,8-1000 µg/mL).

Conforme esperado, o extrato do caldo de fermentação (czapek) utilizado como controle negativo, não exerceu influência sobre a atividade antimicrobiana do extrato fúngico de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1.

Na metodologia empregada utilizou-se o revelador resazurina como avaliador do crescimento celular. Trata-se de um corante azul não fluorescente e atóxico que se torna rosa fluorescente quando reduzido a resorufina por oxidoredutases viáveis dentro das células (SARKER; NAHAR; KUMARASAMY, 2007).

A atividade antimicrobiana do extrato de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 pode estar associada à presença de ácidos graxos, uma vez que em estudos anteriores realizados Banday et al. (2010) demonstraram que ácidos graxos análogos ao colesterol foram responsáveis por atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas. A atividade antimicrobiana destes extratos pode estar relacionada também com os compostos desconhecidos que não foram identificados quando comparados à biblioteca do CG-EM. De acordo com Hayes e Berkovitz (1979), ácidos graxos atuam como tensoativos aniônicos e tem propriedades antibacterianas e antifúngicas em baixos valores de pH, além disso, estes compostos podem ser seletivos contra organismos Gram-positivos visando a estrutura e função das paredes das células bacterianas e membranas.

É importante ressaltar que não foram identificados no extrato de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1, compostos cujas atividades antimicrobianas fossem mais expressivas, o que pode explicar a discreta atividade encontrada para este extrato.

3.3.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos testados a 90 ppm, avaliada pelo método do DPPH, está resumida na Tabela 5.

Tabela 5. Determinação da capacidade sequestrante (%) dos extratos *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 e caldo czapek, pelo método do DPPH, utilizando etanol como solvente.

	Média da CS (%) \pm σ (90 ppm)
<i>Paraconiothyrium</i> sp. P83F4/1	58,92 \pm 0,024 ^b
Caldo czapek	0 \pm 0,013 ^d
Ácido ascórbico	96,61 \pm 0,002 ^a
BHT	39,52 \pm 0,095 ^c

CS (%): capacidade sequestrante. σ : desvio padrão da triplicata. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente ($p < 0,05$).

É importante observar que por se tratar de extrato bruto, o extrato de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 apresentou uma potencial atividade antioxidante a ser explorada em estudos futuros, com capacidade sequestrante superior ao padrão comercial BHT ($p < 0,05$), ainda que menor do que a capacidade demonstrada pela vitamina C.

De acordo com a composição química do extrato verificou-se a presença de alguns ácidos graxos que também podem estar associados à atividade antioxidante descrita. Sugere-se ainda que a considerável atividade antioxidante deste extrato fúngico possa estar relacionada a algum composto não identificado quando comparados a biblioteca do CG-EM.

Liu et al. (2007) observaram maior atividade antioxidante do extrato etanólico de *Xylaria* sp YX-28 em relação aos padrões ácido ascórbico e BHT. Os autores atribuíram esta atividade à presença de compostos fenólicos. Da mesma forma, Huang et al. (2007) correlacionaram a capacidade antioxidante das culturas de fungos endofíticos estudados ao seu conteúdo fenólico total.

O método cromogênico do radical orgânico DPPH, empregado como triagem para compostos naturais cuja atividade antioxidante esteja sendo investigada, é amplamente utilizado (MIRANDA; FRAGA, 2006). Trata-se de um método indireto que se fundamenta na redução de soluções alcólicas do radical DPPH* na presença de um antioxidante doador de elétron ou hidrogênio, formando um composto estável. Entretanto este método impossibilita, por exemplo, a avaliação da atividade de compostos antioxidantes hidrofílicos, uma vez que o radical é dissolvido em solventes orgânicos e não em meio aquoso (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Assim, para complementar este estudo, seria importante associar outros métodos de medida de atividade antioxidante (MOON; SHIBAMOTO, 2009), como por exemplo, o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico, um método direto que permite a detecção da atividade antioxidante por outro mecanismo de ação, o que é bastante recomendado, pois, de acordo com Frankel e Meyer (2000) muitos antioxidantes naturais são multifuncionais e sua atividade não pode ser analisada por um único método.

3.3.3 Atividade antiproliferativa

Na Tabela 6 encontram-se os valores da concentração necessária para inibição de 50% do crescimento celular (GI_{50}), expressos em $\mu\text{g/mL}$, para os extratos fúngico e caldo czapek, contra linhagens de células humanas.

Tabela 6. Inibição parcial do crescimento celular (GI_{50}), expressos em $\mu\text{g/mL}$, de linhagens tumorais frente ao extrato de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 e do caldo czapek.

	2	m	a	7	p	h	q	k	Média log GI_{50}
Doxorrubicina	0,029	0,024	0,37	0,06	0,15	0,27	0,038	<0,025	-1,15
<i>Paraconiothyrium</i> sp. P83F4/1	110,9	118,9	45,4	>250	33,6	>250	0,95	104,1	1,76
Caldo czapek	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>2,40

2 = U251 (glioma, SNC); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 7 = 786-0 (renal); p = PC-3 (próstata); h = HT-29 (colorretal); q = HaCat (queratinócito humano, célula normal imortalizada); k = K562 (leucemia); NT: não testado. Doxorrubicina: controle positivo.

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

Conforme esperado, o controle com o extrato do meio líquido (caldo czapek) utilizado para fermentação fúngica foi considerado inativo frente a todo o painel celular testado (média do log $GI_{50} > 2,40$), provando a não influência sobre a atividade do extrato fúngico.

Analisando o comportamento do extrato de *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 frente a todo painel celular, verifica-se valores extremos de GI_{50} , variando entre 0,95 a $>250 \mu\text{g/mL}$. Calculando a média do log de GI_{50} do extrato fúngico, tem-se o valor de 1,76, que classificaria o extrato como inativo. Entretanto, há que se destacar deste extrato a atuação sobre a célula HaCat (queratinócito humano, célula imortalizada), cujo valor de GI_{50} foi de $0,95 \mu\text{g/mL}$, sendo a média do log $GI_{50} = -0,02$, indicativo de potente toxicidade sobre esta linhagem importante em patologias como psoríase.

A psoríase é uma doença inflamatória crônica da pele, mediada por células T, caracterizada por lesões eritematosas com formação de placas avermelhadas de escamação esbranquiçadas ou prateadas, que se deve ao aumento na proliferação celular de queratinócitos, cujo acúmulo na superfície da pele envolve um processo inflamatório e imunológico local (ARAÚJO; BURGOS; MOURA, 2009).

As causas ainda são desconhecidas, porém uma predisposição genética associada a vários fatores como a dieta e hábitos de vida (consumo de bebidas alcólicas e fumo), interferem diretamente com a doença e constituem uma explicação etiológica plausível (LANGLEY; KRUEGER; GRIFFITHS, 2005).

Em estudo realizado por Briganti; Picardo (2003) foi demonstrado que indivíduos com essa patologia apresentaram estado antioxidante prejudicado, com aumento de malonilaldeído, um marcador da peroxidação lipídica e diminuição dos níveis plasmáticos de β -caroteno, α -

tocoferol bem como de níveis séricos de selênio. Wolters (2005) reforça que o estresse oxidativo e o aumento de radicais livres estão associados à inflamação da pele na psoríase, bem como a outros componentes celulares.

Considerando o caráter antioxidante do extrato *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1 e as observações apresentadas pela literatura, este extrato possivelmente auxiliaria no tratamento desta doença reduzindo a concentração dos radicais livres gerados e conseqüentemente, dos sinalizadores deste processo inflamatório, contribuindo positivamente com a melhora do paciente.

Como a condição patológica da psoríase é apenas passível de tratamento e controle, não existindo cura, o extrato fúngico, ainda bruto, se revelou mais uma possibilidade importante no controle da proliferação de queratinócitos, estimulando estudos mais avançados sobre sua seletividade à linhagem HaCat.

Medicamentos como Daivobet® (hidrato de calcipotriol/dipropionato de betametasona), Daivonex® (calcipotriol) e Bonalfa® (tacalcitol) são algumas opções disponíveis no mercado para tratamento de psoríase, os quais tendem a minimizar as placas formadas e estão associados com a vitamina D. A substância ativa, calcipotriol, é um análogo da vitamina D, que induz a diferenciação e suprime a proliferação dos queratinócitos, responsáveis pelas manifestações clínicas da psoríase vulgar. O dipropionato de betametasona possui uma potente ação antiinflamatória e imunossupressiva bem estabelecida na psoríase (BULA DAIVOBET, 2009; BULA DAIVONEX, 2009). Tacalcitol é um análogo da vitamina D3. O seu mecanismo de ação traduz-se pela inibição da proliferação dos queratinócitos e pela indução da diferenciação destas células, o que o torna eficaz no tratamento da psoríase visto que normaliza a diferenciação e a proliferação das células anormais na pele com psoríase (BONALFA, 2011).

Outros isolados do gênero *Paraconiothyrium* tem se destacado na produção de compostos com atividades citotóxicas. Em recente estudo com *Paraconiothyrium* (MY-42), desenvolvido por Shiono et al. (2011), seis diterpenos foram isolados e as estruturas elucidadas. Três compostos (1, 2 e 3) apresentaram-se com atividade citotóxica moderada frente linhagem celular de leucemia promielocítica humana HL60. Estes autores também avaliaram indução de apoptose na formação da cadeia de DNA de células HL60 e verificaram que a digestão do DNA genômico foi dose dependente.

4. Conclusão

Os resultados obtidos permitem destacar o fungo endofítico *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1, cujo extrato bruto sobressaiu-se por sua capacidade em sequestrar radicais livres e inibir seletivamente o crescimento celular de queratinócitos humanos imortalizados (células HaCat), podendo ser utilizado no tratamento da psoríase ao reduzir radicais livres envolvidos nesta patologia.

Este isolado fúngico da planta *Rheedia brasiliensis*, torna-a fonte promissora de endófitos capazes de produzirem compostos bioativos de interesse, enconrajando a busca por conhecimentos mais profundos sobre os mecanismos de ação bem como a elucidação do(s) composto(s) envolvido(s) nas atividades biológicas evidenciadas.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPEMIG – Processo número: APQ-00238-08 e ao CNPq – Processo número: 478830/2008-4, pelo apoio financeiro.

6. Referências bibliográficas

ALMEIDA, L. S. B.; MURATA, R.A; YATSUDA, R.; DOS SANTOS, M.H. ou SANTOS, M.H.; NAGEM, T.J; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine (Stuttgart)**, v. 15, p. 886-891, 2008.

ARAUJO, M.L.D.; BURGOS, M.G.P.A.; MOURA, I.S.C. Influências nutricionais na psoríase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. [online]. 2009, vol.84, n.1, p. 90-92.

ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; SOBRAL, J.K.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALO, 2010. 167p.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2 (supl.), p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 3, p. 1-36, 2000.

BANDAY, M.R.; FARSHORI, N.N.; AHMAD, A.; KHAN, AU.; RAUF, A. Synthesis and characterization of novel fatty acid analogs of cholesterol: In vitro antimicrobial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 1459–1464, 2010.

BRIGANTI, S.; PICARDO, M. Antioxidant activity, lipid peroxide tion and skin disease. What's new. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 17, p. 663-669, 2003.

BONALFA. Infarmed, 2011. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9559&tipo_doc=rcm>. Acesso em: <10 de outubro de 2011>.

BULA DAIVOBET. MedicinaNET, 2009. Disponível em: <<http://www.medicinanet.com.br/bula/1719/daivobet.htm>>. Acesso em: <10 de outubro de 2011>.

BULA DAIVONEX. MedicinaNET, 2009. Disponível em: <<http://www.medicinanet.com.br/bula/1720/daivonex.htm>>. Acesso em: <10 de outubro de 2011>.

COELHO, C.P.; SOUZA, K.R.D.; GONTIJO, V.S.; MEGDA, J.; SANTOS, M.H. Estudo fitoquímico da folha de *Rheedia brasiliensis* e avaliação da atividade antioxidante de seus extratos e substâncias isoladas. In: **15º SIICUSP**, 2007, Ribeirão Preto. 15º SIICUSP, 2007.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1, p. 232-234, 1926-1978.

DAMM, U.; VERKLEY, G.J.M.; CROUS, P.W.; FOURIE, P.H.; HAGIE, A.; RICCIONI, L. Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. **Persoonia**, v. 20, p. 9–17, 2008.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; PINHEIRO, R.M.; Nemorosonol, a derivate of tricyclo-[4.3.1.0]-decane-7-hidroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2305-2308, 1988.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G. B. M. Chemical investigation of the genus *Rheedia*. **Jounarl of Natural Products**, v.46, n.5, p. 655-659, 1983.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

FERNÁNDEZ, M.C.; CUESTA-RUBIO, O.; PEREZ, A.R.; PORTO, R.M.O.; HERNÁNDEZ, I.M.; PICCINELLI, A.L.; RASTRELLI, L. GC-MS Determination of Isoflavonoids in Seven Red Cuban Propolis Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9927–9932, 2008.

FOUCHE, G.; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J. In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 455-461, 2008.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 13, p. 1925-1941, 2000.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, n. 2, p. 1422-1432, 2001.

HAYES, M.L.; BERKOVITZ, B.K. The reduction of fissure caries in Wistar rats by a soluble salt of nonanoic acid. **Archives of Oral Biology**, v. 24, p. 663 -666, 1979.

HUANG, W-Y.; CAI, Y-Z; XING, J.; CORKE, H.; SUN, M. A potential antioxidant resource: endophytic from medicinal plants. **Economic Botany**, v. 61, n. 1, p. 14-30, 2007.

LANGLEY, R. G. B.; KRUEGER, G. G.; GRIFFITHS, C. E. M. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, p. 18-23, 2005.

LIU, L.; GAO, H.; CHEN, X.; CAI, X.; YANG, L.; GUO, L.; YAO, X.; CHE, Y. Brasilamides A–D: Sesquiterpenoids from the Plant Endophytic Fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2010, n. 17, p. 3302–3306, 2010.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; YAN, G. Antioxidant activity and phenolics of na endophytic *Xylaria sp* from *Ginkgo biloba*. **Food Chemistry**, v.105, p. 548-554, 2007.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. In: 3ed., Williams and Wilkins, Baltimore (1955) 330 p.

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.

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.). Pratical Studies for Medicinal Chemistry: an integrating approach for developing. **IUPAC**, 2006. Disponível em: <www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/>.

MOHAMED, I.E.; KEHRAUS, S.; KRICK, A.; KONIG, G.M.; KELTER, G.; MAIER, A.; FIEBIG, H-H.; KALESSE, M.; MALEK, N.P.; GROSS, H. Mode of Action of Epoxyphomalins A and B and Characterization of Related Metabolites from the Marine-Derived Fungus *Paraconiothyrium sp*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 2053–2056, 2010.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOY, M. 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.

MOON, J-K.; SHIBAMOTO, T. **Antioxidant Assays for Plant and Food Components**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

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.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, Hoboken, v. 1, p. 185-196, 1992.

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

RODRIGUES, K. F.; DIAS FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. bumidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 31, n. 12, p. 905-909, 1996.

SANTOS, M. H.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, T. T.; BRAZ-FILHO, R. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova [online]**, v. 22, n. 5, p. 654-660, 1999.

SANTOS, M.H. ou SANTOS, M.H.; CORRÊA, R.S.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T. T. ; OLIVEIRA, J. R. Efeito de constituintes químicos isolados da casca do fruto de *Rheedia gardneriana* sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 26, p. 711-714, 2007.

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, p. 321-324, 2007.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A-K.; KROHN, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 106, n. 9, p. 996-1004, 2002.

SHIONO, Y.; KIKUCHI, M.; KOSEKI, T.; MURAYAMA, T.; KWON, E.; ABURAI, N.; KIMURA, K. Isopimarane diterpene glycosides, isolated from endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. MY-42. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1400-1405, 2011.

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.

STROBEL, G.A. ; HESS, W.M. ; FORD, E.; SIDHU, R.S.; YANG, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 417-423, 1996.

VERKLEY, G.J.M.; SILVA, M.; WICKLOW, D.T.; CROUS, P.W. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 323-335, 2004.

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.

WOLTERS M. Diet and psoriasis: experimental clinical and evidence. **British Journal of Dermatology**, v. 153, p. 706-714, 2005.

3.2 Artigo II

O artigo II, intitulado “**Evaluation of the biological activity of crude wheat bran extract commonly used to fungal fermentation process**” consistiu em avaliar o extrato cru de farelo de trigo e demonstrar sua influência em processos fermentativos, utilizando-se o fungo endofítico *Colletotrichum gloeosporioides* P67F1/1 isolado de *Rheedia brasiliensis*, para a obtenção dos compostos bioativos.

EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF CRUDE WHEAT BRAN EXTRACT COMMONLY USED TO FUNGAL FERMENTATION PROCESS

Patrícia Lunardelli Negreiros de Carvalho^{1*}, Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz², Severino Matias de Alencar³, João Ernesto de Carvalho², Masaharu Ikegaki^{1*}.

¹ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, Alfenas, MG, Brazil.

² CPQBA, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

³ Department of Agri-Food Industry, Food and Nutrition, “Luiz de Queiroz” College of Agriculture, University of Sao Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brazil.

Summary

This study aimed an evaluation of the biological activity of crude wheat bran extract and its efficiency in fermentation processes using the endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* P67F1/1 to obtain bioactive compounds, considering the historical of important molecules and bioactive metabolites previously described in the scientific community. Tests performed were anti-microbial, anti-oxidative and anti-proliferative assays, also was established chemical profile to each extract (wheat bran and fungus). In all performed assays, wheat bran extract presented biological activity equal or better than the *C. gloeosporioides* P67F1/1 extract. For anti-microbial assay both extracts presented minimum inhibitory concentration of 250-500 µg/mL. For % scavenging capacity (average±standard deviation), measured by DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical) assay, presented values of 17.7±0.037 (wheat bran) and 10.56±0.004 (fungus), with the wheat bran extract (p < 0.05) significantly better than the fungic extract. In the anti-proliferative assay, the wheat bran extract has presented a weak activity for almost all tumoral cells lines evaluated (25.34 < GI₅₀ (µg/mL) < 47.75; 1.40 < means of log GI₅₀ < 1.68). On the other hand, the fungus extract was inactivity for all cell lines tested (GI₅₀ > 250 µg/mL, means of log GI₅₀: 2.40), according to the National Cancer Institute criteria. The results alert for the necessity of further studies and care when using wheat bran in fermentative processes, since their chemical composition may influence direct and/or indirect in the obtained results as well as in the biotechnological potential of the fungus extract.

Key words: Industrial Sub-Products, Endophytic Fungi, *Colletotrichum gloeosporioides*; Solid-State Fermentation; Functional Food.

*Corresponding author:

C.-P.L.N. Phone: +55-35-3299-1340; E-mail: patricialunardelli@unifal-mg.edu.br

I-M. Phone: +55-35-3299-1102, Fax: +55-35-3299-1063; E-mail: masaharu.ikegaki@unifal-mg.edu.br

Introduction

Brazil has a strong economy in agribusiness that contributes to large amount of industrial sub-products generated by food processing industries, such as wheat bran, wheat germ, rice, soy. These wastes have value-added by their rich chemical composition and because they can represent an important source compounds obtained with microbial fermentation, such as enzymes, polysaccharides and antibiotics (1). With the importance of discovering molecules that may become a new drug, the fermentation processes can contribute directly to obtain new bioactive metabolites or facilitate its large scale production. Singh and Barrett (2) point out that drugs derived from compounds obtained by microbial fermentation have played a role as important as those from direct plant sources. Another relevant aspect is that their use in solid-state fermentation process also allows pollutants reduction (1).

Thus, several studies (3, 4, 5, 6) have utilized wheat bran on fungal fermentation process for achievement of enzymes, antibiotics or compounds with, for example, potential anti-microbial, anti-proliferative and/or anti-oxidant activities.

However, there are reports in the literature (3) about problems caused by the wheat bran use as solid substrate in fungal fermentation mainly due to its undefined chemical composition and the presence of some anti-oxidant components (7).

Wheat bran has also been highlighted in the functional foods market, and its nutritional indication has increased due to its protective properties against cardiovascular diseases, cancer, diabetes and obesity (8). This way, it must be considered as more than just an industrial sub-product (9).

Considering the historical of important molecules and bioactive metabolites previously described in the scientific community for the endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, becomes interesting to use it in fermentation processes with wheat bran as substrate. Gangadevi and Muthumary (10) related *C. gloeosporioides* capacity of producing taxol, a powerful anti-cancer; Zou et al (11) obtained colletotric acid, which displays anti-bacterial and anti-fungic properties and recently, the extract of this endophytic fungus showed an effective anti-microbial activity against *Staphylococcus aureus* strains resistant to methicillin (12).

The aim of the present study was to assess the crude wheat bran extract and demonstrate its influence for obtaining bioactive compounds in fermentative processes.

Material and Methods

The endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* P67F1/1 used in fermentative processes in this study was retired of collection of Bioprocess Laboratory of Federal University of Alfenas.

Preparation of crude extracts

- *Wheat bran*: Wheat bran (100 g) was moistened with distilled water (100 mL) before autoclaving at 121 °C, for 20 minutes. This flask was incubated at 25 °C in BOD incubator for 10 days and was extracted two times with dichloromethane (100 mL) at room temperature and further concentrated using a vacuum pump to give crude extract to biological assays.

- *Endophytic fungi*: *C. gloeosporioides* P67F1/1 (Discs \pm 5 mm diameter) was obtained from a recently colony grown on PDA (potate dextrose agar) and transferred aseptically to 500 mL erlenmeyer flasks containing sterile wheat bran, prepared as described on previous item. This culture was incubated for 10-20 days (until satisfactory growth) at 25 °C in BOD incubator under static conditions. After incubation, the culture was extracted twice with dichloromethane (200 mL) and to follow the fungic mycelium was filtered and the culture broth was concentrated in a vacuum rotary evaporator to give crude extract to biological assays.

Chemical Profile

Before GC-MS (gas chromatography/mass spectrometry) analysis, both crude extracts (wheat bran and fungi) were submitted to a TMS derivation. Briefly, 15 mg of each crude extract were mixed with 100 μ L of *N*-methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) in a sealed glass tube for 15 min at 60 °C. Then, the reagent was removed under nitrogen flow and the residue was diluted in hexane (600 μ L), according to Fernández et al (14) with some modifications.

A Shimadzu gas chromatograph, model 2010 GC, coupled to mass spectrometer Shimadzu, model QP 2010 Plus, were employed for all analyses. Samples were separated on a capillary column (RTX5MS 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). The column temperature was initially held at 80 °C for 1 min, and then temperature was raised to 320 °C at a rate of 20 °C/min., followed by an isothermal period of 20 min. The total run time was 69 min. Ultra-high-purity helium with an inline oxygen trap was used as carrier gas (1 mL/min.). The injector was heated to 280 °C, on split (1:20). The injection volume was 0.4 μ L.

The integration was done with software solution LabSolutions-GCMS. The identification of compounds was performed by comparison with the obtained data with those from mass spectra libraries Wiley8. The compounds that could not be identified were characterized by the principal molecular ions, according to the mass-charge ratio (m/z).

Anti-microbial screening

The 25 mg/mL of each crude extracts (wheat bran and fungi) were dissolved in ethyl alcohol and aliquots of 50 μ L were screened for their anti-microbial activity using the agar diffusion method (15). The microbial suspension of *S. aureus* ATCC 6538 was prepared in sterile saline 0.89% to obtain the equivalent of 3×10^8 CFU/mL (75 % transmittance/660 nm). This suspension (0.1 mL) was homogenized in Mueller Hinton agar (100 mL) and poured into a Petri dish. All test plates were incubated at 37 °C in BOD incubator for 24 hours. The inhibition zones were observed, measured (with ruler) and recorded. The procedure was done in duplicate. The negative control was ethyl alcohol.

Microbiological assay

The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC) were determined in accordance with Clinical and Laboratory Standards Institute (16) guidelines and Sarker, Nahar and Kumarasamy (17) and Mann and Markham (18) with modifications. The final volume of each microplate well was 100 μ L of a mixture composed of Mueller Hinton broth, extracts (wheat bran and fungus) and microorganism suspension. Extracts were evaluated in the concentration range between 7.8-1000 μ g/mL in Mueller Hinton broth. Suspensions (0.1% of inoculum of *S. aureus* and 1% inoculum of *E. coli* both transmittance 75%/660 nm) were homogenized in the same broth and distributed on microplate (50 μ L/well) and subsequently incubated at 37 °C in incubator for 18 h - 24 h. After, the reading was held with the indicator resazurin by adding 50 μ L/well. Values of MIC and MBC above 1000 mg/mL were considered not active.

Some wells in microplate were used for the following controls: 1) Sterility Mueller Hinton broth; 2) Inoculum of each test organism; 3) Solvent (absolute ethanol) used in the solubilization of the extracts and 4) Sterility of the extracts (wheat bran and fungus).

Anti-oxidant assay

Four mL of crude wheat bran and fungus extracts (90 ppm) were added to 1.0 mL of 0.5 mM DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical) in ethanol. The mixtures were vi-

gorously shaken and left to stand at room temperature for 30 minutes in the dark (19, 20) with few modifications. Absorbance at 517 nm was measured using ethanol as blank. Standard samples (ascorbic acid and butyl hydroxyl toluen) were used in the same concentration. DPPH degradation was evaluated by comparison with a negative control solution (4.0 mL ethanol and 1.0 mL of DPPH solution). Triplicate tests were conducted for each sample. The DPPH radical-scavenging capacity was calculated by the formula (I):

$$\%SC = \frac{Abs\ negative\ control - Abs\ sample}{Abs\ negative\ control} \times 100 \quad (I)$$

Where: Abs = Absorbance

% SC = % scavenging capacity

The anti-oxidant results were analysed by ANOVA test (variance analysis) and values were considered statistically significant with $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using MatLab 7.0 program.

Anti-proliferative assay

Cell lines [U251 (glioma), K-562 (chronic myeloid leukemia), MCF-7 (breast adenocarcinoma), NCI-H460 (non-small lung adenocarcinoma cells), PC-3 (prostate adenocarcinoma), HT-29 (colon adenocarcinoma), 786-0 (kidney adenocarcinoma), NCI-ADR/RES (ovarian adenocarcinoma, multidrug resistant phenotype), NIH:OVCAR-3 (ovarian adenocarcinoma), UACC-62 (melanoma) and VERO (renal, normal cell, green monkey)] were kindly provided by the *National Cancer Institute (NCI-USA)*. Stock cultures were grown in a medium containing 5 mL of RPMI 1640 (GIBCO BRL) supplemented with 5 % of fetal bovine serum. Penicillin: Streptomycin (1000 UI/mL:1000 µg/mL, 1 mL/L) was added to experimental cultures. Cells in 96 well plates (100 µL cells/well) were exposed to sample concentrations in DMSO/ RPMI (0.25, 2.5, 25 and 250 µg/mL) at 37 °C, 5 % of CO₂ in the air for 48 h. Final DMSO concentration did not affect cell viability. Doxorubicine (0.025, 0.25, 2.5 and 25 µg/mL) was used as positive control. Afterwards, cells were fixed with 50% trichloroacetic acid and cell proliferation was determined by spectrophotometric quantification (540 nm) of cellular protein content, employing sulforhodamine B (SRB) assay (21). Using a concentration–response curve for each cell line, GI₅₀ (concentration that

produces 50 % growth inhibition) was determined through non-linear regression analysis, utilizing software ORIGIN 7.5 (OriginLab Corporation).

Results and Discussion

Chemical Profile

The CG-MS results for wheat bran (Figure 1-A) and of *C. gloeosporioides* P67F1/1 (Figure 1-B) extracts were summarized in Tables 1 and 2, respectively, according to technical and methodological conditions previously described.

According to CG-MS analysis the dichloromethane wheat bran extract is mainly composed by unsaturated fatty acids such as Oleic acid (ω -9), with area of 47.21 % (peak 5, Figure 1-A). The main role of unsaturated fatty acids is to produce regulatory hormones for several functions in organism, including blood pressure, blood clotting, lipidic blood levels, besides immune and inflammatory responses (22, 23).

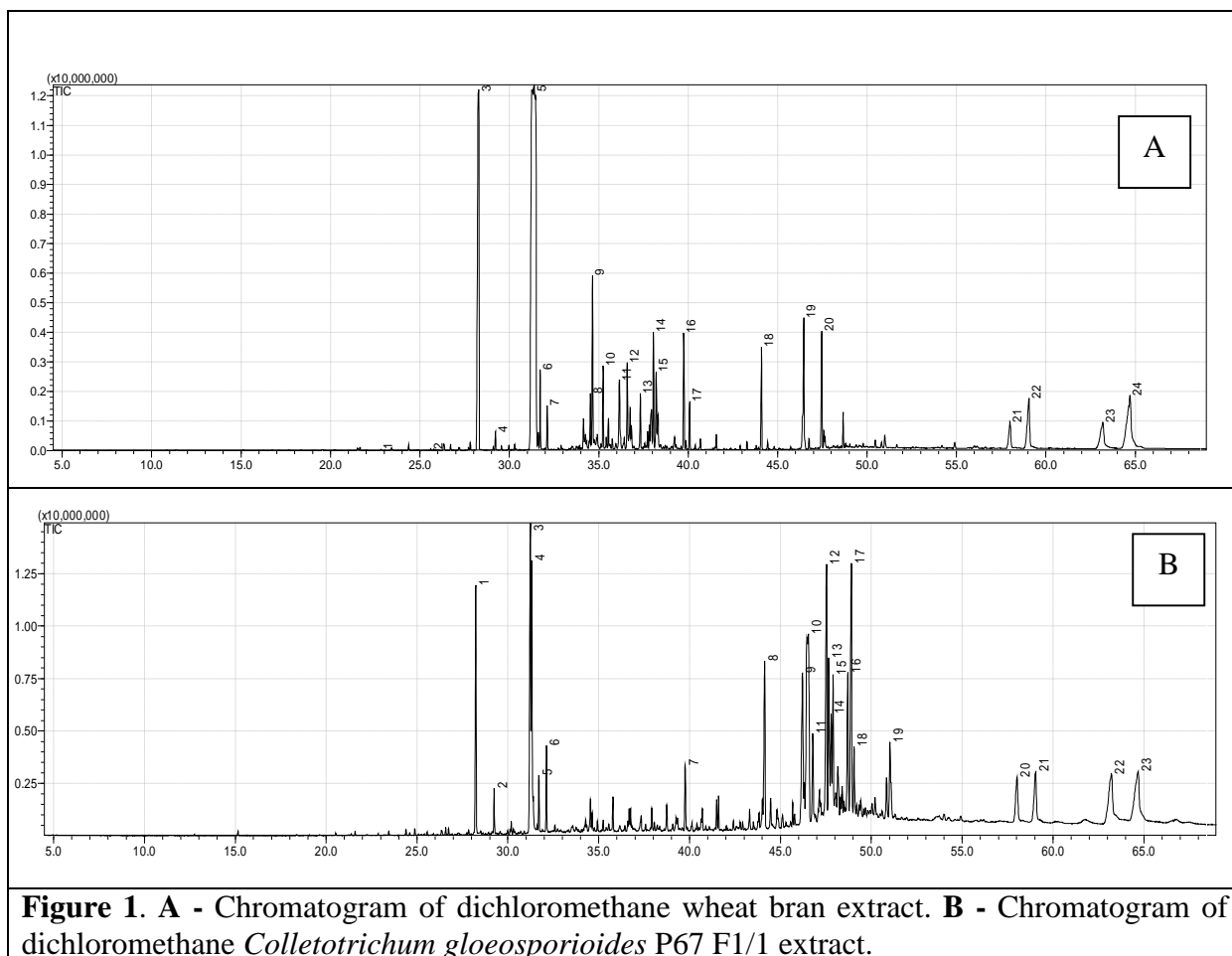


Figure 1. A - Chromatogram of dichloromethane wheat bran extract. **B** - Chromatogram of dichloromethane *Colletotrichum gloeosporioides* P67 F1/1 extract.

Table 1. Compounds identified by GC-MS in the dichloromethane wheat bran extract with the main masses/charges (m/z).

Peak	Compound	Retention time	% Área	m/z
1	Vanillic Acid	22.81	0.02	312 (67) 297 (100) 282 (35) 267 (64) 253 (41) 223 (53) 126 (24) 73 (76)
2	Syringic Acid	25.61	0.03	342 (77) 327 (100) 312 (73) 297 (60) 283 (21) 257 (38) 141 (24) 73 (51)
3	Hexadecanoic Acid, Trimethylsilyl Ester (Palmitic Acid)	28.29	15.67	328 (8) 313 (64) 145 (32) 117 (77) 73 (100)
4	Ferulic Acid, Tms (2-Propenoic Acid, 3-[3-Methoxy-4 [(Trimethylsilyl)Oxy]Phenyl]-, Trimethylsilyl Ester)	29.22	0.34	338 (100) 323 (73) 308 (67) 293 (40) 249 (48) 73 (52)
5	Oleic Acid, Trimethylsilyl Ester	31.39	47.21	354 (7) 339 (59) 145 (37) 129 (60) 117 (100) 73 (91)
6	Octadecanoic Acid, Trimethylsilyl Ester	31.72	1.36	356 (7) 341 (33) 145 (42) 132 (50) 117 (74) 75 (70) 73 (100)
7	1,2,3-Propanetricarboxylic Acid, 2-(Acetyloxy)-, Tributyl Ester	32.11	0.77	259 (50) 185 (100) 157 (42) 129 (56) 112 (31) 57 (45)
8	11-Eicosaenoic Acid 1tms	34.53	0.80	367 (29) 73 (100) 145 (25) 129 (41) 117 (43) 55 (64)
9	Unknown 1	34.65	3.22	440 (11) 369 (14) 225 (67) 130 (31) 93 (17) 73 (100)
10	Unknown 2	35.24	1.34	440 (11) 369 (14) 225 (67) 130 (31) 93 (17) 73 (100)
11	Unknown 3	36.15	1.27	229 (8) 211 (7) 199 (100) 129 (79) 75 (35) 73 (80)
12	Unknown 4	36.59	1.47	515 (5) 357 (40) 328 (36) 275 (22) 173 (52) 73 (100)
13	Hexadecanoic Acid, 2,3-Bis[(Trimethylsilyl)Oxy]Propyl Ester	37.33	0.87	459 (10) 371 (100) 239 (28) 147 (31) 73 (41) 57 (26)
14	Unknown 5	38.10	1.99	603 (1) 518 (28) 173 (100) 103 (19) 73 (76)
15	Unknown 6	38.21	1.26	518 (8) 317 (100) 171 (22) 73 (74) 129 (21)
16	Unknown 7	39.75	2.70	498 (1) 395 (25) 147 (47) 129 (100) 103 (45) 73 (80)
17	Octadecanoic Acid, 2,3-Bis[(Trimethylsilyl)Oxy]Propyl Ester	40.08	0.86	487 (11) 399 (100) 147 (37) 129 (30) 103 (18) 73 (76) 43 (52)
18	Unknown 8	44.10	1.90	521 (12) 520 (28) 268 (100) 73 (18)
19	Unknown 9	46.46	2.03	549 (14) 548 (33) 269 (25) 268 (100) 73 (19)
20	Silane, Trimethyl[[[(3.Beta.,22e)-Stigmasta-5,22-Dien-3-Yl]Oxy]-	47.46	2.26	486 (19) 396 (38) 381 (14) 358 (12) 255 (12) 129 (100)
21	Unknown 10	57.99	1.40	649 (10) 313 (20) 285 (19) 145 (17) 129 (100)
22	Unknown 11	59.10	3.01	649 (36) 574 (17) 385 (59) 371 (76) 262 (74) 129 (100)
23	Unknown 12	63.18	2.14	673 (5) 409 (17) 337 (10) 129 (100) 67 (24) 73 (23)
24	Unknown 13	64.70	6.08	673 (17) 411 (26) 395 (28) 260 (31) 129 (100) 81 (69) 67 (81)

Table 2. Compounds identified by GC-MS in the dichloromethane *C. gloeosporioides* P67F1/1 extract with the main masses/charges (m/z).

Peak	Compound	Retention time	% Area	m/z
1	Hexadecanoic Acid, Trimethylsilyl Ester	28.24	5.46	328 (8) 313 (64) 145 (32) 117 (77) 73 (100)
2	Ferulic Acid, Tms (2-Propenoic Acid, 3-[3-Methoxy-4 [(Trimethylsilyl)Oxy]Phenyl]-, Trimethylsilyl Ester)	29.24	0.77	338 (100) 323 (73) 308 (67) 293 (40) 249 (48) 73 (52)
3	Trimethylsilyl 9,12-Octadecadienoate	31.24	9.08	337 (39) 262 (24) 220 (9) 95 (50) 75 (100) 73 (96)
4	Trimethylsilyl 9-Octadecenoate	31.32	6.15	354 (7) 339 (59) 129 (60) 145 (37) 117 (100) 75 (86) 73 (91)
5	Octadecanoic Acid, Trimethylsilyl Ester	31.71	0.89	356 (7) 341 (33) 145 (42) 132 (50) 117 (74) 75 (70) 73 (100)
6	1,2,3-Propanetricarboxylic Acid, 2-(Acetyloxy), Tributyl Ester	32.12	1.48	259 (50) 185 (100) 157 (42) 129 (56) 112 (31) 57 (45)
7	Unknown 7	39.76	1.49	498 (1) 483 (7) 395 (20) 203 (23) 147 (48) 129 (100) 103 (45) 73 (78)
8	Unknown 8	44.14	4.71	521 (14) 520 (31) 310 (7) 268 (100) 73 (21)
9	Ergosterol TMS Derivative / Silane, (Ergosta-5,7,22-Trien-3.Beta.-Yloxy)Trimethyl-	46.21	4.73	468 (17) 378 (20) 363 (76) 337 (55) 253 (29) 143 (34) 119 (37) 69 (100) 73 (97)
10	Unknown 9	46.54	13.40	549 (15) 548 (32) 281 (12) 268 (100) 73 (21)
11	Unknown 14	46.78	1.96	484 (13) 400 (39) 255 (19) 231 (100) 83 (63) 55 (55)
12	Unknown 15	47.54	7.89	487 (13) 486 (33) 396 (74) 381 (31) 357 (67) 129 (100)
13	Unknown 16	47.65	4.25	473 (51) 398 (25) 383 (40) 305 (26) 215 (97) 75 (100)
14	Unknown 17	47.80	2.63	398 (22) 356 (9) 275 (21) 229 (37) 124 (100)
15	Unknown 18	47.90	3.28	520 (100) 414 (38) 231 (91) 217 (27) 43 (40)
16	Unknown 19	48.71	3.90	577 (17) 576 (34) 268 (100) 210 (19) 73 (21)
17	Unknown 20	48.91	8.42	412 (23) 370 (11) 288 (20) 124 (100) 229 (36) 43 (32)
18	Unknown 21	49.05	1.50	500 (26) 485 (52) 444 (53) 313 (64) 312 (63) 69 (64) 55 (100)
19	Unknown 22	51.03	1.25	605 (20) 604 (35) 281 (10) 268 (100) 73 (17)
20	Unknown 10	58.02	2.52	649 (10) 313 (20) 285 (19) 145 (17) 129 (100)
21	Unknown 11	59.05	2.93	649 (36) 574 (17) 385 (59) 371 (76) 262 (74) 129 (100)
22	Unknown 12	63.22	5.22	673 (5) 409 (17) 337 (10) 129 (100) 67 (24) 73 (23)
23	Unknown 13	64.69	6.09	673 (17) 411 (26) 395 (28) 260 (31) 129 (100) 81 (69) 67 (81)

In wheat bran extract was also identified saturated fatty acids such as Hexadecanoic acid (Stearic acid) and Eicosanoic acid. Other compounds identified were phenolic compounds [Vanillic acid (peak 1), Syringic acid (peak 2) and Ferulic acid (peak 4)], citric acid (peak 7) and steroids such as Silane, Trimethyl [(3- β , 22E)-Stigmasta-5,22-Dien-3-Yl]Oxy] were also detected. This compound is a phytosterol, which is a vegetable cholesterol,

whose studies have proved its capacity of reducing human cholesterol if consumed regularly, decreasing the low density lipoprotein fraction, without interfering with the high density lipoprotein fraction (24). The presence of phytosterol confirms wheat bran as an important food.

From the chromatogram of the fungic extract it is possible to suggest the presence of steroid substances such as Ergosterol TMS Derivative and Silane(Ergosta-5,7,22-Trien-3- β -hydroxil)Trimethyl-). Ergosterol is a component of fungi cellular membrane which exerts similar functions to those of cholesterol in animal cells, and it was also identified by Bernardes (25) in the fungic extract of the cocoa endophytic *Microspheeropsis* sp.

Comparing both chromatograms (Figures 1-A and 1-B) and the Tables 1 and 2, it is possible to observe by peaks and % area that during the fermentation process, the fungus has probably metabolized some compounds present in wheat bran between the retention periods 35-45 minutes (peaks 9 to 18) and produced others compounds between the retention times 45-52 minutes (peaks 9 to 19).

Anti-microbial activity

Table 3 summarize the anti-microbial activity of wheat bran extract before and after the fermentation process by the endophytic fungus *C. gloeosporioides* P67F1/1.

These results (Table 3) had demonstrated that wheat bran extract has a slight anti-microbial activity, observed by an inhibition zone of *S. aureus* growth and a MIC value between 250-500 μ g/mL. In a similar study with agro-industrial sub-products, Kim et al (26) described that chloroform wheat germ extract contains 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone that has highly inhibitory activity against *S. aureus* and *Bacillus cereus*.

Table 3. Microbiological evaluation of wheat bran and *C. gloeosporioides* P67F1/1 crude dichloromethane extracts against *Staphylococcus aureus*.

Microbiological assay against <i>S. aureus</i>			
	Inhibition zone (mm)	MIC^a (μg/mL)	MBC^b (μg/mL)
Wheat bran	9	250-500	>1000
<i>C. gloeosporioides</i>	14	250-500	>1000

a: MIC = minimum inhibitory concentration; b: MBC = minimum bactericidal concentration

The anti-microbial potential of fermentation products from *C. gloeosporioides* using potato sucrose broth (substrate) has been reported in the literature by Zou et al (11), whom isolated the colletotrich acid that inhibited the growth of *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, and *Sarcina lutea* with MICs of 25, 50 and 50 µg/mL. This compound was obtained from crude extract and extracted exhaustively with ethyl acetate. After was separated by column chromatography over silica gel and eluted successively with CHCl₃, a CHCl₃/MeOH gradient and MeOH.

In this study, the anti-microbial performance of the *C. gloeosporioides* P67F1/1 extract was similar to that observed for wheat bran extract. This suggests that the fermentative process occurred in the wheat bran as a substrate was not as efficient and positive as the one observed on other endophytic fungi fermented in the same substrate as already described in the literature by Bernardes (25) and Fernandes et al (3). In first study, the author studied extract of *Microspheeropsis* (endophytic fungus) fermented in wheat bran and observed anti-microbial activity against *S. aureus* (MIC: 62.5-125 µg/mL). In second study, authors analysed the extract of *Alternaria alternata* and reported anti-microbial activity against *S. aureus* (MIC: 50-100 µg/mL) and *E. coli* (MIC: 400-800 µg/mL).

The anti-microbial activity may be associated to the chemical composition of the extracts, due to the presence of fatty acids and steroids, apart from other non-identified compounds. The literature reports the anti-microbial activity of fatty acids, and similar, against Gram positive and Gram negative bacteria (27, 28). Other authors suggest that this activity may be related by the presence of steroids, for their activity against Gram positive and Gram negative bacteria and fungi (29, 30, 31).

According to Hayes and Berkovitz (32) fatty acids act as anionic surfactants and have anti-bacterial and antifungal properties at low pH values; in addition, these compounds can be selective against Gram positive microorganisms by targeting the structure and function of bacterial cell walls and membranes.

Anti-oxidant activity

The DPPH scavenging capacity (%) of both dichloromethane crude extract (wheat bran and *C. gloeosporioides* P67F1/1) and of two commercial standards ascorbic acid and BHT (butil hidroxi toluene) were evaluated (Table 4).

Table 4. DPPH scavenging activity of crude extracts wheat bran and of endophytic fungus *C. gloeosporioides* P67F1/1 and of standard value ascorbic acid and BHT.

Anti-oxidant assay (average \pm s) - 90 ppm	
	SC (%) \pm s
Wheat bran	17.7+0.037 ^c
<i>C. gloeosporioides</i>	10.56+0.004 ^d
Ascorbic acid	96.61+ 0.002 ^a
BHT	39.52+0.095 ^b

SC (%): scavenging capacity. σ : standard deviation. Values marked by the different letter are significantly different ($p < 0.05$).

C. gloeosporioides P67F1/1 crude extract, at 90 ppm, presented lower anti-oxidative activity than wheat bran crude extract. In fact, both presented lower scavenger capacity ($p < 0.05$) than the standards utilized (ascorbic acid and BHT). Fernandes et al (3) and Bernardes (24) also reported presence of anti-oxidative activity, although weak, in high concentration of wheat bran extract (used as substrate in the fermentative process), using the same method.

This scavenging activity assay, using DPPH radical, serves as a prediction and selection of potential anti-oxidative activity and can be used as screening for synthetic chemical compounds and natural products (20). However, in this study, it is important to highlight that the DPPH assay was not efficient to detect all the possible anti-oxidative compounds present in the wheat bran in analysis. The DPPH radical was one of synthetic radicals used to study the activity of several phenolic antioxidants (33) and the concentration of phenolic compounds in the extract wheat bran in study were low and contributed to the result observed in Table 4. Frankel and Meyer (33) explain that many natural anti-oxidants are multifunctional and their activity in heterogeneous foods cannot be assayed by a single method.

A study (34) of antioxidant activity from six milling fractions including head shorts, tail shorts, low-quality flour, low-grade flour, bran and control flour, showed that bran possessed the greatest antioxidant activity compared to all these samples and the authors observed that wheat bran extract was an important anti-oxidant agent due to presence of the highest amounts of phenolic acids, such as vanillic, syringic and ferulic acids, being an alternative natural anti-oxidant.

Other possibility for anti-oxidant activity low (Table 4) in present study is that according Baublis et al (35), the bran portion in analysis could be able to influence the result of the anti-oxidative activity as well as other evaluated biological activities.

Anti-proliferative activity

Antiproliferative evaluation was performed in a panel of normal (VERO) and human cancer [U251 (glioma), K-562 (chronic myeloid leukemia), MCF-7 (breast adenocarcinoma), NCI-H460 (non-small lung adenocarcinoma cells), PC-3 (prostate adenocarcinoma), HT-29 (colon adenocarcinoma), 786-0 (kidney adenocarcinoma), NCI-ADR/RES (ovarian adenocarcinoma, multidrug resistant phenotype), NIH:OVCAR-3 (ovarian adenocarcinoma), UACC-62 (melanoma)] cell lines. 48h sulforhodamine B (SRB) cell viability assay was performed to determine growth inhibition and a concentration inhibiting the growth of 50 % of the cells (GI₅₀) was calculated for each cell line treated with both dichloromethane crude extracts (wheat bran and fungus), in Table 5 and Figure 2.

Table 5. Growth Inhibitory (GI₅₀) for dichloromethane wheat bran and for fungus *C. gloeosporioides* P67F1/1 extracts.

Cell lines	GI ₅₀ µg/mL		
	Dox ^a	W-b ^b	C-g ^c
U251 (glioma)	0.03	26.07	>250
UACC-62 (melanoma)	0.28	29.79	>250
MCF-7 (breast)	0.27	25.87	104,16
NCI-ADR/RES*	0.45	25.34	>250
786-0 (renal)	0.09	28.74	>250
NCI-H460 (lung)	<0.025	27.11	>250
PC-3 (prostate)	1.76	29.92	>250
OVCAR-3 (ovary)	0.17	28.20	>250
HT-29 (colon)	0.24	40.01	>250
K562 (leukemia)	0.66	47.75	>250
VERO (renal, normal cell, green monkey)	0.31	28.56	>250
Mean logGI ₅₀	-0.4	1.5	>2.5

^aDox: doxorubicin (positive control); ^bW-b: wheat bran; ^cC-g: *C. gloeosporioides*; GI₅₀- Growth Inhibitory (necessary concentration required to inhibit 50% cell growth in µg/mL). *ovary - resistant to multiple drugs.

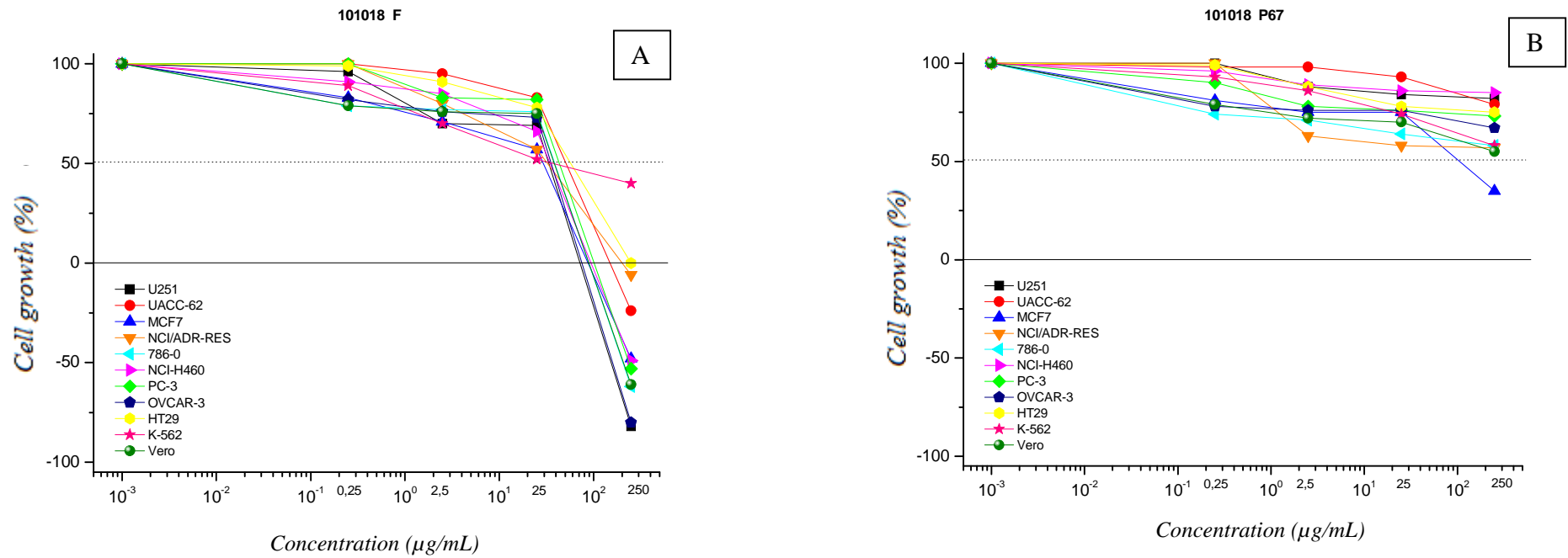


Figure 2. Anti-proliferative activity of dichloromethane extract of wheat bran (A) and for fungus *C. gloeosporioides* P67F1/1 (B).

Following the the NCI (Natural Cancer Institute, EUA) criteria (36), extracts were regarded as inactive ($\text{mean} \geq 1.5$), weakly ($1.1 < \text{mean} < 1.5$), moderately ($0 < \text{mean} < 1.1$) or potently ($\text{mean} < 0$) active on basis of mean of $\log\text{GI}_{50}$.

Then, both wheat bran and fungi dichloromethane extracts presented mean $\log\text{GI}_{50}$ above 1.5 (Table 5). It is interesting to notice that wheat bran dichloromethane extract showed GI_{50} ranging between 25.34 and 47.75 $\mu\text{g/mL}$ while fungi dichloromethane extract was inactive at the higher concentration evaluated (250 $\mu\text{g/mL}$).

These results suggest that the compounds that were present in wheat bran extract and absent in fungi extract should be responsible for the better activity observed for substrate extract in comparison with fermented extract, indicating that the new compounds obtained with fermentation process do not contributed with the biological activities of the *C. gloeosporioides* P67F1/1 extracts.

The anti-proliferative activity may be associated to the chemical composition of wheat bran extract previously observed (Figure 1-A), such as fatty acids, phenolic and unknown compounds that were present in small quantities possibly by low activity. Eitsuka et al (37) describe the anti-proliferative activity of fatty acids, with inhibitory effect of telomerase in tumoral cells of the human colorectal adenocarcinoma (DLD-1). Fatty acids have also presented reduction in breast cancer, being indicated as preventive supplement for this kind of neoplasia (38).

Conclusion

In general, the extract of wheat bran presented a more expressive anti-oxidative and anti-proliferative activity when compared with those observed for the extract of endophytic fungus *C. gloeosporioides* P67F1/1.

These results point out that it is important to be careful using wheat bran as a substrate for fermentation, in order to avoid influences of its chemical composition (direct and/or indirectly) that can affect biological activities expected for the compounds originated of fungal fermentation processes.

Acknowledgements

The authors thank FAPEMIG - Process number: APQ-00238-08 by financial support and Profesor Ludwig Heinrich Pfenning at Department of Phytopathology at Federal University of Lavras, for fungus identification.

References

1. C.S., V. Lemo, U.F. Rodríguez-Zúñiga, V. Bertucci Neto, S. Couri, Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulasas por fermentação semi-sólida, *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento N° 22*, São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 13p. (2008).
2. S.B., Singh, J.F. Barret, Empirical antibacterial drug discovery-Foundation in natural products, *Biochemical Pharmacology* 71:7 (2006) 1006-1015.
3. M.R.V. Fernandes, T.A. Costa e Silva, L.H. Pfenning, C.M. Costa-Neto, T.A. Heinrich, S.M. Alencar, M.A. Lima, M. Ikegaki, Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L., *Braz. J. Pharm. Sci.* 45:4 (2009) 677-685.
4. M.Y. El-Naggar, S.A. El-Assar, M. Abdul-Gawad, Solid-State fermentation for the production of Meroparamycin by *Streptomyces* sp. strain MAR01, *J. Microbiol. Biotechnol.* 19:5 (2009) 468-473.
5. X. Sun, Z. Liu, Y. Qu, X. Li, The effects of wheat bran composition on the production of biomass-hydrolyzing enzymes by *Penicillium decumbens*, *Appl Biochem Biotechnol* 146 (2008) 119–128.
6. I. Ul-Haq, S. Idress, M.I. Rajoka, Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation, *Process Biochem* 37 (2002) 637–641.
7. S.E. Soares, Phenolic acids as antioxidants, *Rev. Nutr.* 15 (2002) 71-81.
8. P. Kumar, R.K. Yadava, B. Gollen, S. Kumar, R.K. Verma, S. Yadav, Nutritional contents and medicinal properties of wheat: a review, *LSMR* 22 (2011) 1-10.
9. K.M. Winter, Identification of bioactive compounds in wheat. *PhD Tesis*, Southern Cross University, Lismore, NSW (2009) (in English).
10. V. Gangadevi, J. Muthumary, Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*, *Mycologia Balcanica* 5 (2008) 1-4.
11. W.X. Zou, J.C. Meng, H. LU, G.X. Chen, G.X. Shi, T.Y. Zhang, R.X. Tan, Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an Endophytic Fungus in *Artemisia mongolica*, *J. Nat. Prod.* 63 (2000) 1529-1530.
12. U.S.E. Arivudainambi, T.D. Anand, V. Shanmugaiyah, C. Karunakaran, A. Rajendran, Novel bioactive metabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, *FEMS Immunol Med Microbiol* 61:3 (2011) 340-345.
13. O. Petrini, T.N. Sieber, L. Toti, O. Viret, Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi, *Natural Toxins* 1 (1992) 185-196.
14. M.C. Fernández, O.C. Rubio, A.R. Perez, R.M.O. Porto, I.M. Hernandez, A.L. Piccinelli, L. Rastrelli, GC-MS determination of isoflavonoids in seven red Cuban propolis samples, *J Agric Food Chem.* 56 (2008) 9927-9932.
15. V. Lorian, Antibiotics in laboratory medicine. In: 3ed., Williams and Wilkins, Baltimore (1955) 330 p.

16. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2005, *Fifteenth Informational Supplement CLSI document M100-S15*, CLSI, Wayne (2005).
17. S.D. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, 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* 42 (2007) 321-324.
18. C.M. Mann, J.L. Markham, A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils, *J. App. Microbiol.* 84 (1998) 538-544.
19. W.J. Yen, L.W. Chang, P.D. Duh, Antioxidant activity of peanut seed testa and its antioxidative component, ethyl protocatechuate, *Food. Sci. Technol.* 38 (2005) 193-200.
20. A.L.P. Miranda, C.A.M. Fraga, Free radical scavenger activity: determination of the antioxidant profile of bioactive substances, In: A. Monge, E.J. Barreiro, (Org.), *Practical Studies for Medicinal Chemistry: an integrating approach for developing, IUPAC, 2006*, Disponível em: <www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/>.
21. A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, M. Gray- Goodrich, H. Campbell, J. Mayo, M. Boy, Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *J. Natl. Cancer. Inst.* 83 (1991) 757-766.
22. S. Tsaluchidu, M. Coochi, L. Tonello, B.K. Puri, Fatty acids and oxidative stress in psychiatric disorders, *BMC Psychiatry* 8 (2008) S5-8.
23. J-M. R. Frenoux, E.D. Prost, J.L. Belleville, J.L. Prost, A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats, *J. Nutr.* 131 (2001) 139-145.
24. E.A. Trautwein, G.S.M.J.E. Duchateau, Y. Lin, Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plants sterol, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105 (2003) 171-185.
25. M.T.C.P. Bernardes, Fungos endófitos do cacau: seleção e avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa do extrato da fermentação de *Microsphearopsis* sp. *PhD Tesis*, Federal University of Alfenas, Brazil (2010) (in Portuguese).
26. M.H. Kim, S.H. Jo, K.S. Ha, J.H. Song, H.D. Jang, Y.I. Kwon, Antimicrobial activities of 1,4-benzoquinones and wheat germ extract, *J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 8 (2010) 1204-1209.
27. K. Benkendorff, Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 316 (2005) 29-44.
28. M.R. Banday, N.N. Farshori, A. Ahmad, A.U. Khan, A. Rauf, Synthesis and characterization of novel fatty acid analogs of cholesterol: In vitro antimicrobial activity, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 1459-1464.
29. A.C. Keller, M.P. Maillard, K. Hostettmann, Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*, *Phytochemistry* 41 (1996) 1041-1046.
30. S.N. Khan, B.J. Kim, H.K. Kim, Synthesis and antimicrobial activity of 7-fluoro-3-aminosteroids, *Bioorg. Med. Chem. Lett* 17 (2007) 5139-5142.
31. H. Yu, L. Zhang, L. Li, C. Zheng, L. Guo, W. Li, P. Sun, L. Qin, Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes, *Microbiological Research* 165:6 (2010) 437-449.

32. M.L. Hayes, B.K. Berkovitz, The reduction of fissure caries in Wistar rats by a soluble salt of nonanoic acid, *Arch Oral Biol* 24 (1979) 663 -666.
33. E.N. Frankel, A.S. Meyer, The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *J. Sci. Food Agric* 80:13 (2000) 1925-1941.
34. S.N. Onyeneho, N.S. Hettiarachchy, Antioxidant activity of durum wheat bran, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1496-1500.
35. A.J. Baublis, C.R. Lu, F.M. Clydesdaleand, E.A. Decker, Potential of wheat-based breakfast cereals as a source of dietary antioxidants, *J. Am. Coll. Nutr.* 19 (2000) 308s-311s.
36. G. Fouche, G.M. Cragg, P. Pillay, N. Kolesnikova, V.J. Maharaj, J. Senabe, In vitro anticancer screening of South African plants, *J Ethnopharmacol* 119 (2008) 455-461.
37. T. Eitsuka, K. Nakagawa, T. Suzuki, T. Miyazawa, Polyunsaturated fatty acids inhibit telomerase activity in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells: A dual mechanism approach, *Biochim Biophys Acta* 1737 (2005) 1-10.
38. D.P. Rose, J.M. Connoly, Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents, *Pharmacol Therapeut* 83 (1999) 217-244.

3 CONCLUSÕES

Trabalhos envolvendo bioprospecção são de fundamental importância, visto a necessidade de se obter novas substâncias com atividades terapêuticas. Todavia, são estudos que podem ser equiparados a procurar uma agulha em palheiro, dada a dificuldade e morosidade para obtenção de um composto com excelente ação terapêutica.

Com os resultados obtidos no presente estudo é possível concluir que a planta *Rheedia brasiliensis* apresentou-se fonte promissora de fungos endofíticos capazes de produzirem compostos bioativos de interesse.

Dentre estes microrganismos, destaca-se o fungo endofítico *Paraconiothyrium* sp. P83F4/1, cujo extrato bruto se evidencia pela capacidade em sequestrar radicais livres e inibir seletivamente o crescimento celular de queratinócitos humanos imortalizados (células HaCat), podendo ser utilizado no tratamento da psoríase ao reduzir radicais livres envolvidos nesta patologia. Estes dados encorajam a continuidade dos estudos com aprofundamento dos conhecimentos sobre a composição química e mecanismos de ação envolvidos nas atividades evidenciadas.

O estudo com o extrato do farelo de trigo e o extrato do fungo endofítico *C. gloeosporioides* isolado de *R. brasiliensis* alertou para a necessidade de cuidados ao empregar farelo de trigo como substrato para fermentação, a fim de evitar influências de sua composição química ou de suas atividades biológicas inatas, sobre as atividades esperadas para o extrato fúngico em estudo. Reforça-se ainda o potencial nutricional que o farelo de trigo apresenta, deixando de ser apenas um subproduto agro-industrial.

A busca incessante por uma nova molécula não pode se tornar um entrave para pesquisas de prospecção e, neste sentido, fica evidente a importância de aprofundar estudos com outros substratos empregados em processos fermentativos, o que permitirá avaliar, com mais detalhes, as variações de cultivo de um mesmo fungo, as quais podem levar às alterações nos metabólitos produzidos por este microrganismo, contribuindo, por exemplo, com a produção de extratos mais ativos.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, D.S.P. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CVRANDI**, v. 26, p. 141-164, nov./dez., 1993.

ALBERTO, N.R.; ORLANDELLI, R.C.; GARCIA, A.; PAMPHILE, J.A. Avaliação de Metabólitos de Isolados Endofíticos de *Sapindus saponária* no Controle de Patógenos. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR, 6., 2009, Maringá. **Anais** Maringá: Centro Universitário de Maringá, 2009. 6 CD-ROOM.

ALMEIDA, L.S.B.; MURATA, R.A.; YATSUDA, R.; DOS SANTOS, M.H. ou SANTOS, M.H.; NAGEM, T.J. ; ALENCAR, S. M.; KOO, H.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine (Stuttgart)**, v. 15, p. 886-891, 2008.

ALMEIDA-ALVES, T.M.; ALVES, R.O.; ROMANHA, A.J.; SANTOS, M.H.; NAGEM, T.J.; ZANI, C.L. Biological activities of 7-epiclusianone. **Journal of Natural Products**, v. 62, p.369-371, 1999.

ARAÚJO, M.L.D.; BURGOS, M.G.P.A.; MOURA, I.S.C. Influências nutricionais na psoríase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. [online]. 2009, vol.84, n.1, p. 90-92.

ARAÚJO, W.L.; LACAVA, P.T.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; SOBRAL, J.K.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; AZEVEDO, J.L. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALO, 2010. 167p.

ARIVUDAINAMBI, U.S.E.; ANAND, T.D.; SHANMUGAIAH, V.; KARUNAKARAN, C.; RAJENDRAN, A. Novel bioactivemetabolites producing endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 340-345, 2011.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2 (supl.), p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, p. 1-36, 2000.

BACH, E.E.; KIMATI, H. Purification and Characterization of Toxins from Wheat Isolates of *Drechslera tritici-repentis*, *Bipolaris bicolor*, and *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 5, n. 2, p. 184-199, 1999.

BANDAY, M.R.; FARSHORI, N.N.; AHMAD, A.; KHAN, AU.; RAUF, A. Synthesis and characterization of novel fatty acid analogs of cholesterol: In vitro antimicrobial activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, p. 1459–1464, 2010.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAUBLIS, A.J.; LU, C.R.; CLYDESDALEAND, F.M.; DECKER, E.A. Potential of wheat-based breakfast cereals as a source of dietary antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, p. 308s-311s, 2000.

BEIRA, F.T.A. 2000. 130f. **Evaluación de la actividad antineoplásica de extractos de La planta *Jodina rhombifolia* Hook. et Arn.** Tesis (Doctor em Farmacia) – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad de Barcelona, Barcelona.

BENKENDORFF, K. Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 316, p. 29-44, 2005.

BERNARDES, M.T.C.P. **Fungos endófitos do cacau: seleção e avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa do extrato da fermentação de *Microspheeropsis* sp.** 2010. 63f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2010.

BONALFA. Infarmed, 2011. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=9559&tipo_doc=rcm>. Acesso em: <10 de outubro de 2011>.

BORGES, W.S.; BORGES, K.B.; BONATO, P.S.; SAID, S.; PUPO, M.T. Endophytic fungi: natural products, enzymes and biotransformation reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 13, p. 1137-1163, 2009.

BRIGANTI, S.; PICARDO, M. Antioxidant activity, lipid peroxide tion and skin disease. What's new. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 17, p. 663-669, 2003.

BULA DAIVOBET. MedicinaNET, 2009. Disponível em: <<http://www.medicinanet.com.br/bula/1719/daivobet.htm>>. Acesso em: <10 de outubro de 2011>.

BULA DAIVONEX. MedicinaNET, 2009. Disponível em: <<http://www.medicinanet.com.br/bula/1720/daivonex.htm>>. Acesso em: <10 de outubro de 2011>.

COELHO, C.P.; SOUZA, K.R.D.; GONTIJO, V.S.; MEGDA, J.; SANTOS, M.H. Estudo fitoquímico da folha de *Rheedia brasiliensis* e avaliação da atividade antioxidante de seus extratos e substâncias isoladas. In: **15º SIICUSP**, 2007, Ribeirão Preto. 15º SIICUSP, 2007. Disponível em: <<http://sistemas.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=3485&numeroEdicao=15>>. Acesso em: <27 de novembro de 2010>.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1, p. 232-234, 1926-1978.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

DAMM, U.; VERKLEY, G.J.M.; CROUS, P.W.; FOURIE, P.H.; HAGIE, A.; RICCONI, L. Novel *Paraconiothyrium* species on stone fruit trees and other woody hosts. **Persoonia**, v. 20, p. 9–17, 2008.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; PINHEIRO, R.M.; Nemorosonol, a derivate of tricyclo-[4.3.1.0]-decane-7-hidroxy-2,9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v.27, n.7, p.2305-2308,1988.

DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G. B. M. Chemical investigation of the genus *Rheedia* . **Journal of Natural Products**, v.46, n.5, p.655-659, 1983.

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

DEMAIN, A.L. Small bugs, big business: the economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 499-514, 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

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, n. 4, p. 606-614, 2008.

EITSUKA, T.; NAKAGAWA, K.; SUZUKI, T.; MIYAZAWA, T. Polyunsaturated fatty acids inhibit telomerase activity in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells: A dual mechanism approach. **Biochim Biophys Acta**, v. 1737, p. 1-10, 2005.

EL-NAGGAR, M.Y.; EL-ASSAR, S.A.; ABDUL-GAWAD, M. Solid-State Fermentation for the Production of Meroparamycin by *Streptomyces* sp. strain MAR01. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 468–473, 2009.

FARINAS, C.S.; LEMO, V.; RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U.F.; BERTUCCI NETO, V.; COURI, S. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Nº 22**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 13p. (2008).

FERNANDES, M.R.V.; SILVA, T.A.C.; PFENNING, L.H.; COSTA NETO, C.M.; HEINRICH, T.A.; ALENCAR, S.M.; LIMA, M.A.; IKEGAKI, M. 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.

FERNÁNDEZ, M.C.; CUESTA-RUBIO, O.; PEREZ, A.R.; PORTO, R.M.O.; HERNÁNDEZ, I.M.; PICCINELLI, A.L.; RASTRELLI, L. GC-MS Determination of Isoflavonoids in Seven Red Cuban Propolis Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9927–9932, 2008.

FOUCHE, G.; CRAGG, G.M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V.J.; SENABE, J. In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 455-461, 2008.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 13, p. 1925-1941, 2000.

FRENOUX, J-M. R.; PROST, E.D.; BELLEVILLE, J.L.; PROST, J.L. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 139-145, 2001.

GALLO, M.B.C.; GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M. T. Natural products from endophytic fungi. In: Ratul Saikai; Rajib L. Bezbaruah; Tarun Ch. Bora. (Org.). **Microbial Biotechnology**. New Delhi: New India Publishing Agency, 2008. p. 139-168.

GANGADEVI, V.; MUTHUMARY, J. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides*, a novel endophytic taxol-producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Justicia gendarussa*. **Mycologia Balcanica**, v. 5, p. 1-4, 2008.

GARCÍA-PAJÓN, C. M.; COLLADO, I.G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 426–431, 2003.

GUIMARÃES, D.O.; BORGES, W.S.; KAWANO, C.; RIBEIRO, P.H. ; GOLDMAN, G.H.; NOMIZO, A.; THIEMAN, O.H.; OLIVA, G.; LOPES, N.P.; PUPO, M.T. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** (Print), v. 52, p. 134-144, 2008.

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

HARVEY, A.L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 5, p. 480-484, 2007.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycology Resorchn**, v. 105, n. 2, p. 1422-1432, 2001.

HAYES, M.L.; BERKOVITZ, B.K. The reduction of fissure caries in Wistar rats by a soluble salt of nonanoic acid. **Archives of Oral Biology**, v. 24, p. 663 -666, 1979.

HUANG, W.-Y.; CAI, Y.-Z.; XING, J.; CORKE, H.; SUN, M. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants. **Economic Botanic**, v.61, p.14-30, 2007.

INCA. **Sítio do Instituto Nacional do Câncer**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: <30 de Novembro de 2011>.

JUNQUEIRA, L.C.U.; CARNEIRO J. **Biologia Celular e Molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KELLER, A.C.; MAILLARD, M.P.; HOSTETTMANN, K. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1041-1046, 1996.

KHAN, S.N.; KIM, B.J.; KIM, H.K. Synthesis and antimicrobial activity of 7-fluoro-3-aminosteroids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 5139-5142, 2007.

KIM, M-H.; SUNG-HOON J.; KYOUNG-SOO, H.; JI-HYE S.; HAE-DONG, J.; YOUNG-IN, K. Antimicrobial Activities of 1,4-Benzoquinones and Wheat Germ Extract. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 8, p. 1204-1209, 2010.

KUMAR, P.; YADAVA, R.K.; GOLLEN, B.; KUMAR, S.; VERMA, R.K.; YADAV, S. Nutritional contents and medicinal properties of wheat: a review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 22, p. 1-10, 2011.

LACAIVA, P.T.; SEBASTIANES, F.L.S.; AZEVEDO, J.L. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2.ed. Revisada e ampliada. Caxias do Sul: EducS, 2010. cap. 15, p. 554.

LANGLEY, R. G. B.; KRUEGER, G. G.; GRIFFITHS, C. E. M. Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 64, p. 18-23, 2005.

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

LI, J.Y.; STROBEL, G.A. Jesterone and hydroxy-jesterone antino-myceto cyclohexenenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 261-265, 2001.

LIN, X., LU, C., HUANG, Y., ZHENG, Z. SU, W., SHEN, Y. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *Camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1037-1040, 2007.

LIU, L.; GAO, H.; CHEN, X.; CAI, X.; YANG, L.; GUO, L.; YAO, X.; CHE, Y. Brasilamides A–D: Sesquiterpenoids from the Plant Endophytic Fungus *Paraconiothyrium brasiliense*. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2010, n. 17, p. 3302–3306, 2010.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; YAN, G. Antioxidant activity and phenolics of na endophytic *Xylaria sp* from *Ginkgo biloba*. **Food Chemistry**, v.105, p. 548-554, 2007.

LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. In: 3ed., Williams and Wilkins, Baltimore (1955) 330 p.

LU, H.; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R.X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum sp.*, an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, v. 151, p. 67-73, 2000.

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.

MARQUES, D.N.; ALBUQUERQUE, P.M. **Farinha de trigo**. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos: UFRGS, 1999. Disponível em: <<http://www.pgie.ufrgs.br/portalead/unirede/tecvege/feira/prcerea/paolei/farinha.html>>. Acesso em: <28 de outubro de 2011>.

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.

MENDES, R.; AZEVEDO, J.L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIS, L.; MALOSSO, E.; YANOMELO,

A.M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: UFPE, 2007. p. 129-140.

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/>.

MOHAMED, I.E.; KEHRAUS, S.; KRICK, A.; KO" NIG, G.M.; KELTER, G.; MAIER, A.; FIEBIG, H-H.; KALESSE, M.; MALEK, N.P.; GROSS, H. Mode of Action of Epoxyphomalins A and B and Characterization of Related Metabolites from the Marine-Derived Fungus *Paraconiothyrium* sp. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 2053–2056, 2010.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOY, M. 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.

MOON, J-K.; SHIBAMOTO, T. **Antioxidant Assays for Plant and Food Components**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 1655-1666, 2009.

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, julho de 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.

ONYENEHO, S.N.; HETTIARACHCHY, N.S. Antioxidant activity of durum wheat bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1496-1500, 1992.

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.

PEREIRA, J. O. **Fungos endófitos dos hospedeiros tropicais**. Tese de Doutorado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 104p. 1993.

PETRINI, O.; SIEBER, T. N.; TOTI, L.; VIRET, O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, Hoboken, v. 1, p. 185-196, 1992.

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

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

RODRIGUES, K. F.; DIAS FILHO, M. B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. bumidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 31, n. 12, p. 905-909, 1996.

ROSE, D.P.; CONNOLY, J.M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agent. **Pharmacol Therapeut**, v. 83, p. 217-244, 1999.

SANTOS, M. H.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, T. T.; BRAZ-FILHO, R. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. **Química Nova [online]**, v. 22, n. 5, p. 654-660, 1999.

SANTOS, M.H.; CORRÊA, R.S.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T. T. ; OLIVEIRA, J. R. Efeito de constituintes químicos isolados da casca do fruto de *Rheedia gardneriana* sobre a eclosão de juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 3. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 26, p. 711-714, 2007.

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, p. 321-324, 2007.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, v. 109, p.661-686, 2005.

SCHULZ, B.; BOYLE, C.; DRAEGER, S.; RÖMMERT, A-K.; KROHN, K. 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.

SHAHIDE, F. **Natural antioxidants: Chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS Press, p. 414, 1997.

SHIONO, Y.; KIKUCHI, M.; KOSEKI, T.; MURAYAMA, T.; KWON, E.; ABURAI, N.; KIMURA, K. Isopimarane diterpene glycosides, isolated from endophytic fungus *Paraconiothyrium* sp. MY-42. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1400–1405, 2011.

SHU, C. H. **Fungal fermentation for medicinal products**. In: Bioprocessing for Value- Added Products from Renewable Resources. Taiwan, cap. 17, p. 447 – 463, 2007.

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

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

STAMFORD, T. L. M., ARAUJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados de Jacatupé (*Pachyrhizus erosus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

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.

STROBEL, G.A. ; HESS, W.M. ; FORD, E.; SIDHU, R.S.; YANG, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 417-423, 1996.

SUN, X.; LIU, Z.; QU, Y.; LI, X. The Effects of Wheat Bran Composition on the Production of Biomass-Hydrolyzing Enzymes by *Penicillium decumbens*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 146, p. 119–128, 2008.

TAKAHASHI, J.A.; MONTEIRO DE CASTRO, M.C.; SOUZA, G.G.; LUCAS, E.M.F.; BRACARENSE, A.A.P.; ABREU, L.M.; MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, M.S.; FLOREANO, M.B.; OLIVEIRA, T.S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 18, p. 198-204, 2008.

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

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. São Paulo: Atmed, 2005. 920p.

TRAUTWEIN, E.A.; DUCHATEU, G.S.M.J.E.; LIN, Y. Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plants sterol. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 171-185, 2003.

TSALUCHIDU, S.; COOCHI, M.; TONELLO, L.; PURI, B.K. Fatty acids and oxidative stress in psychiatric disorders, **BMC Psychiatry**, v. 8, p. S5-8, 2008.

UL-HAQ, I.; IDREES, S.; RAJOKA M. I. Production of lipases by *Rhizopus oligosporus* by solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 637–641, 2002.1, 2.

VERKLEY, G.J.M.; SILVA, M.; WICKLOW, D.T.; CROUS, P.W. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 323–335, 2004.

VERKLEY, G.J.M.; SILVA, M.; WICKLOW, D.T.; CROUS, P.W. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. **Studies in Mycology**, v. 50, p. 323–335, 2004.

VISIOLI, F.; KEANEY JR., J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research**, v. 47, p. 409, 2000.

WANG, F.W., JIAO, R.H., CHENG, A.B., TAN, S.H., SONG, YC. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus variabilis* and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 23, p. 79-83, 2007.

WEBER, R.W.S., KAPPE, R., PAULULAT, T., MOSKER, E., ANKE, H. Anti-*Candida* metabolites from endophytic fungi. **Phytochemistry**, v. 68, p. 886-892, 2007.

WILSON, D. Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, v. 73, n. 2, p. 274-276, 1995.

WINTER, K.M. **Identification of bioactive compounds in wheat**. 2009. 227f. Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the award of the degree of Doctor of Philosophy. Centre for Phytochemistry and Pharmacology. School of Environmental Science and Management. Southern Cross University.

WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; PANPHUT, W.; THONGON, N.; DANWISSETKANJANA, K.; RUANGRUNGSI, N.; MEEVOOTISOM, V. Endophytic fungi with anti-microbial, anti-ancer and anti-malarial activities isolated from Thai medicinal plants. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 265-272, 2004.

WOLTERS M. Diet and psoriasis: experimental clinical and evidence. **British Journal of Dermatology**, v. 153, p. 706-714, 2005.

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.

YU, H.; ZHANG, L.; LI, L.; ZHENG, C.; GUO, L.; LI, W.; SUN, P.; QIN, L. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 437-449, 2010.

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