

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL - MG

MARIA TEREZA CARNEIRO PASCHOAL BERNARDES

**FUNGOS ENDÓFITOS DO CACAU: SELEÇÃO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,
ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO DA
FERMENTAÇÃO DE *Microsphaeropsis* sp.**

ALFENAS/MG

2010

MARIA TEREZA CARNEIRO PASCHOAL BERNARDES

**FUNGOS ENDÓFITOS DO CACAU: SELEÇÃO E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,
ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO DA
FERMENTAÇÃO DE *Microsphaeropsis* sp.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Obtenção, identificação e avaliação de compostos bioativos - Universidade Federal de Alfenas.
Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

ALFENAS/MG

2010

Bernardes, Maria Tereza Carneiro Paschoal.

Fungos endófitos do cacau : seleção e avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa do extrato da fermentação de *Microsphaeropsis* sp / Maria Tereza Carneiro Paschoal Bernardes. - Alfenas, 2010.

52 f. -

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

Orientador: Prof. Dr. Masaharu Ikegaki.

1. Fungos – metabolismo. 2. Testes de Sensibilidade Microbiana - métodos. 3. Testes de Carcinogenicidade – métodos. 4. Ascomicetos - classificação. I. Título.

CDD: 579

MARIA TEREZA CARNEIRO PASCHOAL BERNARDES

**FUNGOS ENDÓFITOS DO CACAU: SELEÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,
ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA DO EXTRATO DA FERMENTAÇÃO DE *Microsphaeropsis* sp**

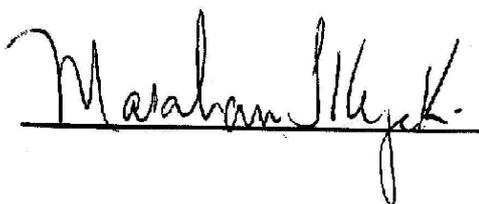
A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Obtenção, identificação e avaliação de compostos bioativos - Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 12/07/2010

Prof. Dr. Masaharu Ikegaki

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



Profa. Dra. Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

Instituição: UNICAMP

Assinatura:



Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:



À Deus, Pai Superior, que me acolheu e me guiou nos momentos difíceis;

Aos meus pais Oswaldo e Elma, que mesmo de longe, me deram incentivo e coragem para conquistar mais uma etapa de minha carreira;

Ao meu esposo Alexandre e às minhas bonequinhas Alyssa e Isabella, por ter me dado amor, compreensão, carinho e forças para o término deste trabalho, minhas desculpas por muitas vezes estar ausente mesmo estando presente;

À profa. Marlene L. Godoy V. de Souza, amiga, pela compreensão e carinho;

AGRADECIMENTOS

Ao professor Masaharu Ikegaki pela paciência e pela conquista deste título, além do crescimento didático;

À Unifal, instituição de renome que oferece este programa de mestrado de qualidade inquestionável;

Ao professor Dr. Ludwig H. Pfenning por ceder amostras de fungos que resultaram neste trabalho;

À professora Dra. Ana Lúcia Tasca Goes Ruiz e professor Severino Matias de Alencar, por contribuir com seus trabalhos, obrigada pela atenção;

À “minha” Maria, por ter dirigido tão bem minha casa e minha família, enquanto eu me dedicava ao trabalho e aos estudos;

À Unifenas, funcionários, professores e acadêmicos, que souberam entender minha ausência e minha restrição de horários, agradeço o apoio;

À família em geral, tios e sogra “tia Maria”, por me dar incentivo e carinho, sempre preocupados com meu desempenho;

Aos professores, colegas de mestrado, funcionários da Unifal e em especial à acadêmica de Biotecnologia Anne Letícia, enfim, a todos que acompanharam esta caminhada por estes anos em que estive envolvida neste trabalho.

RESUMO

Atualmente, fungos endófitos são alvos de estudo para descoberta de substâncias bioativas com interesse na agricultura, no controle de pragas, na descoberta de novos ativos para uso na terapêutica, entre outros. Assim como toda planta, o *Theobroma cacao* L. serve de habitat para diversos fungos endófitos que vivem no interior dos tecidos das plantas numa relação de simbiose, mutualismo ou parasitária. No total de 37 linhagens de fungos endófitos isolados do *Theobroma cacao* L. foram cultivados *in vitro* e seus extratos brutos foram analisados, sendo que um fungo foi selecionado para investigação das atividades antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa. O fungo endófito *Microsphaeropsis* sp. CML 1765 apresentou um crescimento e estabilidade satisfatória além de boa atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato da fermentação de *Microsphaeropsis* sp ficou entre 62,5 e 125 µg/mL. A análise em CG/EM identificou a composição química do extrato de *Microsphaeropsis* sp mostrando ser, essencialmente, constituído de ácidos graxos e esteróides. A atividade antioxidante foi determinada através do teste de DPPH e não foi expressiva, possivelmente por não conter compostos fenólicos em sua composição química. A atividade antiproliferativa foi testada frente a nove linhagens de células tumorais e o extrato de *Microsphaeropsis* sp apresentou seletividade contra células de melanoma (UACC-62) atingindo o TGI (inibição total do crescimento), na concentração de 4 µg/mL. Todas as linhagens atingiram o GI₅₀ (atividade citostática) e LC₅₀ (atividade citocida) nas concentrações de 25 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. A biodiversidade da natureza abre caminhos para muitos estudos sobre fungos endófitos que são fontes naturais pouco exploradas de metabólitos bioativos, com potencial terapêutico desconhecido.

Palavras-chaves: Fungo – metabolismo. Teste de Sensibilidade Antimicrobiana. Teste Antiproliferativo. Ascomicota.

ABSTRACT

Nowadays, there is an increasing interest in endophytic fungi research as a source of bioactive substances that could be applied in agriculture for pest control, and even for the discovery of new drugs. Like any plant, *Theobroma cacao* L. serves as habitat for diverse fungal endophytes that live within plant tissues in a symbiotic, mutualistic or parasitic. A total of 37 strains of fungal endophytes isolated in *Theobroma cacao* L. were cultured in vitro and their extracts were analyzed, and a fungus was selected for investigation of the antimicrobial, antioxidant and antiproliferative activities. The fungus endophyte *Microsphaeropsis* sp. CML 1765 presented a satisfactory growth and stability in addition to good antimicrobial activity against *S. aureus*. The results of minimum inhibitory concentration (MIC) of the extract from fermented *Microsphaeropsis* sp were between 62.5 and 125 µg/mL. The chemical composition analysis of the extracts was carried by GC/MS and allowed the identification of fatty acids and steroids as main components. The antioxidant activity was determined using the DPPH test and was not significant, possibly because it contains phenolic compounds in their chemical composition. The antiproliferative activity was tested against nine cancer cell lines and extract *Microsphaeropsis* sp. showed selectivity against melanoma cells (UACC-62) reaching the TGI (total growth inhibition) at a concentration of 4 µg/mL. The extracts were cytostatic and cytotoxic for all cell lines at concentrations of 25 µg/mL and 250 µg/mL, respectively. The diversity of nature opens the way for studies on fungal endophytes that are natural sources of unexplored bioactive metabolites with therapeutic potential unknown.

Key Words: Fungi - metabolism. Antimicrobial Sensitivity Assay. Antiproliferative Assay. Ascomycota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Theobroma cacao</i> L.	16
Figura 2 - Estruturas químicas: microsfaerina A (1), B (2), C (3) e D (4).....	22
Figura 3 - Estrutura química do Paclitaxel (Taxol).....	25
Figura 4 - Estruturas químicas dos compostos: microsfaerona A (1) e B (2).....	26
Figura 5 - Cromatograma do extrato da fermentação do <i>Microsphaeropsis</i> sp.....	43
Figura 6 – Estrutura química do ergosterol	45
Figura 7 – Estrutura química do estigmasterol	45
Figura 8 – Atividade antioxidante do extrato da fermentação do <i>Microsphaeropsis</i> sp. e os respectivos controles positivos	48
Figura 9 – Atividade antiproliferativa do extrato da fermentação do fungo <i>Microsphaeropsis</i> sp. CML 1765	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fungos isolados do <i>Theobroma cacao</i> L.	17
Tabela 2 - Fungos endófitos e seus metabólitos bioativos.....	28
Tabela 3 - Fungos endófitos do cacau.....	31
Tabela 4 - Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa	38
Tabela 5 – Código, espécie, diâmetro dos halos formados e rendimentos do extratos dos fungos endófitos isolados do cacau	40
Tabela 6 - Composição química do extrato da fermentação do fungo <i>Microsphaeropsis</i> sp.....	43
Tabela 7 - Concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM) do extrato da fermentação de <i>Microsphaeropsis</i> sp.....	46
Tabela 8 - Determinação da inibição parcial e total do crescimento (GI ₅₀ e TGI) de linhagens de células tumorais do extrato da fermentação de <i>Microsphaeropsis</i> sp. CML 1765.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	FUNGOS ENDÓFITOS	13
2.2	O CACAU E OS FUNGOS ENDÓFITOS.....	16
2.2.1	O Cacau	16
2.2.2	Fungos endófitos do cacau.....	17
2.3	ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS FUNGOS ENDÓFITOS	19
2.3.1	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	19
2.3.2	Atividade Antioxidante	22
2.3.3	Atividade antiproliferativa	23
2.3.4	Outras atividades de fungos endófitos	26
2.4	O FUNGO <i>Microsphaeropsis</i>	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1	MICROORGANISMOS.....	31
3.2	SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDÓFITOS PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	31
3.2.1	Culturas	32
3.2.2	Fermentação e Extração dos Metabólitos Bioativos.....	32
3.2.3	Seleção das Linhagens Fúngicas através da Determinação da Atividade Antimicrobiana por Teste de difusão em ágar (Halo de Inibição)	33
3.3	OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS BIOATIVOS DO EXTRATO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO <i>Microsphaeropsis</i> sp.	33
3.3.1	Produção do extrato da fermentação do <i>Microsphaeropsis</i> sp.....	33
3.4	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO <i>Microsphaeropsis</i> sp.	34
3.4.1	Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM)	34
3.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO <i>Microsphaeropsis</i> sp	35
3.5.1	Determinação da Atividade Antimicrobiana <i>in vitro</i>	35
3.5.1.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	35
3.5.1.2	Concentração Bactericida Mínima (CBM)	36

3.5.2	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método do poder sequestrante de radicais DPPH	36
3.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA <i>IN VITRO</i>	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1	SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDÓFITOS PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS	40
4.2	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO <i>Microsphaeropsis</i> sp.	43
4.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO <i>Microsphaeropsis</i> sp.	46
4.3.1	Determinação da concentração inibitória e bactericida mínima (CIM/CBM) do extrato da fermentação do fungo <i>Microsphaeropsis</i> sp.	46
4.3.2	Determinação da Atividade Antioxidante do extrato da fermentação do fungo <i>Microsphaeropsis</i> sp.....	48
4.3.3	Atividade antiproliferativa do extrato da fermentação do fungo <i>Microsphaeropsis</i> sp.....	49
5	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais continuam sendo a mais importante fonte de pesquisas, no intuito de descobrir drogas potentes. Várias substâncias isoladas de seres vivos, dentre plantas, micro-organismos e seres de origem marinha têm sido testados na procura de compostos bioativos no tratamento de diversas doenças. A variedade e complexidade destas moléculas produzidas por organismos vivos têm se revelado terapêuticamente atraentes (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). As penicilinas e cefalosporinas utilizadas como antibióticos, a mevinolina, como agente redutor de colesterol, a avermectina b, como antihelmíntico de largo espectro, dentre outros, são exemplos de fármacos produzidos por micro-organismos, e são amplamente explorados e produzidos em larga escala pela indústria farmacêutica.

Pesquisadores vêm explorando microrganismos como fungos filamentosos, bactérias e leveduras, na tentativa de descobrir novos quimioterápicos. Entre estes micro-organismos, os endófitos representam um grupo particularmente interessante para pesquisa. Os micro-organismos endófitos habitam o interior dos tecidos vegetais vivos de plantas, habitam plantas saudáveis sem causar alterações aparentes e podem proteger o hospedeiro de agressões externas. Estes micro-organismos são candidatos altamente promissores a agentes de controle biológico, por produzirem diferentes compostos, tais como os antimicrobianos, as enzimas hidrolíticas e os sideróforos que podem atuar negativamente sobre os fitopatógenos (ZAMPIERI et al., 2005).

Esses estudos mais aprofundados sobre fungos como fonte de compostos bioativos vem sendo amplamente favorecidos com o avanço da biotecnologia e de técnicas analíticas e microbiológicas.(VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A produção de metabólitos dos fungos endófitos é influenciada pelo habitat, ou seja, pelo nicho ecológico em que vivem, além de estabelecer relações de mutualismo, comensalismo, simbiose ou até mesmo parasitismo com a planta hospedeira.

Estas substâncias, produzidas por fungos endófitos, são entidades químicas bioativas de diversas classes terapêuticas e estruturas químicas variadas, que são isoladas, identificadas e testadas quanto ao seu potencial farmacológico como

medicamentos como os antibióticos, antioxidantes e antitumorais, entre outros (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Dentre as espécies vegetais já estudadas como habitat de micro-organismos endófitos, encontra-se o cacau (*Theobroma cacao* L.)

O cacau (*T. cacao* L.) é uma planta de clima tropical, originária da América do Sul, que possui várias substâncias de interesse terapêutico como os polifenóis e flavonóides. Estudos comprovam seu efeito antioxidante, redutor da concentração de lipoproteínas de baixa densidade (colesterol ruim), modulador da ativação de plaquetas, auxiliando na manutenção da saúde cardiovascular, além de ser fonte de vitaminas, gorduras e metilxantinas (EFRAIM, 2007). Rubini et al. (2005) relataram em seus estudos que endófitos do cacau são capazes de proteger a planta contra infecções causadas por fitopatógenos, além de proporcionar resistência à planta.

Assim, este trabalho teve por objetivo a triagem de fungos endófitos do cacau (*T. cacao* L.) produtores de metabólitos bioativos com atividade antimicrobiana. Além disso, o extrato fúngico mais promissor também foi avaliado quanto à sua composição química e as atividades antioxidante e antiproliferativa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGOS ENDÓFITOS

Atualmente, os fungos são os micro-organismos endófitos mais isolados e são vistos como excelente fonte de bioativos e habitam milhões de nichos ecológicos podendo ser saprófitas, patógenos, oportunistas e simbiontes da planta hospedeira (STROBEL et al., 2004).

Como estas interações ecológicas ainda não são muito bem compreendidas, sabe-se que as relações simbiontes oferecem vantagens interessantes como proteção à seres vivos herbívoros, estresse abióticos, ataque de insetos e controle de outros microorganismos (SOUZA et al., 2004).

O comensalismo e o mutualismo representam uma interação balanceada entre as plantas e os micro-organismos. O comensalismo caracteriza-se quando o micro-organismo é beneficiado com o habitat do tecido da planta e os nutrientes fornecidos, sem afetar a planta hospedeira. E o mutualismo é definido como uma interação benéfica para ambas as partes, planta e micro-organismo. Neste caso, além de nutrientes, os micro-organismos fornecem um aumento da resistência e defesa à alguns patógenos (KOGEL; FRANKEN; HUCKELHOVEN, 2006).

O termo “endófito” é um termo utilizado para classificar organismos que vivem inclusos em outros organismos vivos como as plantas. Durante um período de sua vida, esse micro-organismo coloniza os mais variados tecidos vivos internos de plantas. Há aproximadamente 250.000 espécies de plantas em todo o planeta. A estimativa é que existe 1 milhão de endófitos, mas somente 100.000 espécies de fungos endófitos já foram descritos quanto à produção de compostos (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Em alguns casos, os fungos endófitos sobrevivem de forma patogênica e latente, causando infecções ao hospedeiro por um longo período e os sintomas somente aparecem em condições fisiológicas e ecológicas que favorecem a virulência (FIRÁKOVÁ; STURDÍKOVÁ; MÚCKOVÁ, 2007).

Fungos endófitos são encontrados em quase todas as plantas. Estes incluem árvores, grama, algas e plantas herbáceas. A maioria dos fungos endófitos pertence a classe dos Ascomycetes. Em circunstâncias normais, vivem dentro da planta

hospedeira sem causar notáveis sintomas da doença. Além disso, os fungos endófitos não são considerados saprófitas, uma vez que estão associados com tecidos vivos, e podem de alguma forma contribuir para o bem-estar da planta. Ou seja, a planta é considerada um fornecedor de nutrientes para o micro-organismo, enquanto que o micro-organismo pode produzir fatores que protegem a planta hospedeira de ataques de animais, insetos ou outro micro-organismo (HUANG et al., 2001).

Dentre as espécies comumente encontradas como endófitas destacam-se, principalmente, membros do filo Ascomycota. Na literatura, os fungos endófitos são divididos em dois grupos principais: *balansiaceous* e não-*balansiaceous*. Endófitos *balansiaceous* são fungos ascomicetos pertencentes aos gêneros *Epichloë* e *Balansia* que se desenvolvem de forma sistêmica e intercelular em todos os órgãos de gramíneas e são transmitidos verticalmente através de sementes. Produzem uma série de metabólitos secundários, dentre os quais, as peraminas e lolinas (alcalóides inseticidas) e as lolitrem B e ergovalinas (alcalóides anti-vertebrados) (SCHULZ et al., 2005). A relação entre fungos *balansiaceous* e seus hospedeiros é considerada mutualista, sendo que o fungo beneficia-se com o ganho nutricional e proteção contra estresse abiótico enquanto a planta beneficia-se pela proteção contra herbivoria através da produção de alcalóides tóxicos por parte do fungo (SAIKKONEN et al., 1998; SAIKKONEN et al., 2004).

Endófitos não-*balansiaceous* representam um grupo diverso, formado, em sua maioria, por espécies de diferentes famílias do filo Ascomycota, sendo isoladas de todos os órgãos de praticamente todas as plantas terrestres (BACON; WHITE, 2000). São transmitidos horizontalmente (ARNOLD et al., 2003) e são cosmopolitas ocorrendo em ambientes temperados e tropicais, sendo os gêneros: *Acremonium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Guignardia*, *Phyllosticta*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis*, *Phoma*, *Pleospora*, frequentemente isolados de um grande número de hospedeiros (ARNOLD et al., 2000; SURYANARAYANAN; VENKATESAN; MURALI, 2003).

Recentemente, a pesquisa de novos metabólitos fúngicos concentra principalmente na triagem aleatória de isolados. Para otimização destes novos metabólitos bioativos secundários é relevante considerar que: 1) os fungos sintetizam seus metabólitos secundários correspondente ao respectivo nicho

ecológico; e 2) a interação metabólica pode aumentar a síntese de metabólitos secundários. Desta maneira, a seleção de fungos deve ser originária de fungos que não foram isolados para fins bioquímicos e metabólicos e sim de interações com o meio ambiente. Este é um exemplo de rastreamento inteligente e é uma estratégia para explorar o potencial desconhecido de metabólitos secundários que os fungos oferecem (SCHULZ et al., 2002).

Cafeu et al. (2005) afirmaram que os fungos filamentosos, onde os endófitos estão incluídos, constituem um grupo de micro-organismos que biossintetizam uma quantidade fantástica de metabólitos secundários, chegando a uma produção de até 73% superior a de outras classes de micro-organismos.

Além disso, Strobel e Daisy (2003) relata que há pequena informação da interação bioquímica e fisiológica entre a planta hospedeira e o endófito. E muitos fatores influenciam a ação dos endófitos como o tempo, idade, meio ambiente, e o local, e estas interações são quimicamente mediadas pelo propósito da natureza.

Strobel e Daisy (2003), comentaram que há dados estatísticos que afirmam que os fungos endófitos de clima tropical produzem mais compostos bioativos do que os fungos endófitos de regiões de clima temperado.

Em geral, as condições do meio ambiente têm influenciado no número e variedade da população de micro-organismos endófitos nas plantas hospedeiras, e pode-se dizer que, em torno de 51 % das substâncias biologicamente ativas isoladas de fungos endófitos são desconhecidas (FIRÁKOVÁ; STURDÍKOVÁ; MÚCKOVÁ, 2007).

Firakova, Sturdiková e Múcková (2007) comentaram que as substâncias bioativas isoladas de fungos endófitos originam das mais variadas rotas biossintéticas, pertencendo aos mais diversos grupos, como por exemplo terpenos, alcalóides, esteróides, fenóis, cumarinas, entre outros, sendo de grande importância para a indústria farmacêutica e produção de produtos biotecnológicos.

Suryanarayanan et al. (2009) relata que em 5 anos, do ano de 2000 a 2005, 23 novos medicamentos introduzidos no mercado foram obtidos de plantas e/ou micro-organismos para tratamento de várias doenças humanas como câncer, desordens neurológicas, infecciosas e as doenças cardiovasculares, doenças metabólicas e imunológicas e distúrbios genéticos. Desde 1993, cerca de 1.500

metabólitos têm sido relatados a partir de fungos para atividade antitumoral ou antibiótica.

2.2 O CACAU E OS FUNGOS ENDÓFITOS

2.2.1 O Cacau

O cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) é uma espécie nativa da floresta tropical úmida da América, pertencente à família *Sterculiaceae*, sendo o provável centro de origem as bacias dos rios Amazonas e Orinoco, onde foi primeiramente cultivado. Hoje em dia, a planta existe em toda a América Central até o Sul do México, sendo encontradas também no Brasil e nas Guianas (MAKI, 2006).

O frutos de *Theobroma cacao* L. (FIGURA 1) constituem uma matéria-prima essencial para produção de vários alimentos e cosméticos e como toda planta, há uma comunidade de fungos endófitos que habita seus tecidos e, naturalmente, produzem compostos bioativos que podem ter atividade benéfica ou tóxica (MAKI, 2006).



Figura 1 - *Theobroma cacao* L.
Fonte: www.incaper.es.gov.br/.../22_08_2007_1.

Relatos indicam que os principais flavonóides encontrados no cacau, flavan-3-ol e seus derivados oligoméricos, as procianidinas, tem uma variedade de ações benéficas, incluindo a proteção antioxidante e moduladora da homeostasia vascular. Estes resultados são apoiados por pesquisas similares em outros alimentos ricos em flavonóides (STEINBERG; BEARDEN; KEEN, 2003).

2.2.2 Fungos endófitos do cacau

Assim como toda planta, o cacau tem micro-organismos endófitos que vivem no interior dos tecidos vegetais e que podem ser patógenos à planta, reduzindo a produtividade e a vida da planta. A interação entre estes endófitos pode colaborar com um possível biocontrole de agente causadores de doenças (RUBINI et al., 2005).

Estudo feito por Rubini et al. (2005) sobre fungos endófitos do cacau (*Theobroma cacao* L.) demonstraram uma grande diversidade, sendo as famílias *Botryosphaeriaceae*, *Valsaceae*, *Nectriaceae* mais freqüentes e *Fusarium* sp., o gênero mais dominante, mas nenhuma correlação entre grupos de fungos e categorias de plantas foi observada. A tabela 1 mostra diversos fungos endófitos isolados de caules do cacau.

Tabela 1 – Fungos isolados de caules do *Theobroma cacao* L.

Continua

Fungos isolados do cacau
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
<i>Cordyceps sobolifera</i>
<i>Crinipellis perniciososa</i>
<i>Diaporthe helianthi</i>
<i>Diaporthe phaseolorum</i>
<i>Fusarium chlamydosporum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>
<i>Fusarium polyphialidicum</i>
<i>Fusarium</i> sp
<i>Gibberella fujikuroi</i>
<i>Gibberella zeae</i>
<i>Giberella moliniformis</i>

Fungos isolados do cacau

*Lasiodiplodia theobromae**Phomopsis* sp*Pseudofusarium purpureum**Rhizopycnis vagum*

Fonte: Adaptado de Rubini et al., 2005 p.29.

Um estudo comparativo de fungos endófitos do cacau de folhas e hastes do cacau nativo da região de Manaus e de monocultivo, foi realizado por Costa (2008) na região da cidade de Itabuna no estado da Bahia e demonstrou que o sistema de monocultivo parece não interferir na biodiversidade de fungos endófitos do cacau. Cerca de 114 espécies foram isoladas e identificadas, dos quais 65 espécies foram encontradas no cacau cultivado e 70 no cacau nativo. As espécies predominantes foram *Phomopsis* e *Glomerella cingulata*. A espécie *Lasiodiplodia theobromae* predominou nas hastes do cacau.

Muitas das espécies endófitas de *Trichoderma* isoladas do cacau estão sendo estudadas para verificação de sua potencial ação protetora contra doenças. Podridão-parda (*Phytophthora* sp), Vassoura de bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) e Podridão-morena (*Moniliophthora roreri*) são doenças graves do cacau que podem colonizar os tecidos acima do solo. Todas as três doenças ocorrem na América Central e do Sul. A maior parte de fungos endófitos é comum em folhas, com exceção das espécies de *Trichoderma*, sendo que alguns fungos endófitos de folhas foram analisados e seus metabólitos foram capazes de proteger o cacau contra espécies de *Phytophthora*. (BAILEY; STREM; WOOD, 2009).

2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS FUNGOS ENDÓFITOS

Os micro-organismos podem produzir uma variedade muito grande de metabólitos tanto primários quanto secundários, incluindo enzimas, aminoácidos, vitaminas, antibióticos e pigmentos, agentes moduladores de respostas imunológicas, toxinas, agentes antitumorais, fatores de crescimento de plantas, anti-helmínticos e antimicóticos (LIU et al., 2001; STROBEL et al., 2001).

Pesquisas têm sido realizadas na busca de novas substâncias bioativas como antibióticos, agentes quimioterápicos e agroquímicos, com menor toxicidade e menor impacto ambiental. As atividades biológicas destas substâncias bioativas também são investigadas contra doenças como AIDS e do sistema imune, e para o tratamento de infecções por parasitas (STROBEL; DAISY, 2003).

Strobel et al. (2004) comenta que há tempos cientistas estudam metabólitos secundários ativos produzidos por micro-organismos com atividades de interesse, desde a descoberta de Pasteur através da fermentação de alimentos e de Fleming, responsável pela era dos antibióticos.

Segundo Momesso et al. (2006), os fungos endófitos que colonizam tecidos vegetais são grande fonte para descoberta de novos bioativos e, em seus experimentos, isolaram fungos endófitos da planta *Viguiera robusta* conseguindo comprovar que estes fungos produzem substâncias bioativas de elevada atividade citotóxica.

Foram isolados novos metabólitos bioativos significativos de fungos marinhos de manguezais do Mar da China Meridional que provaram ser uma rica fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos (HUANG et al., 2008).

2.3.1 Atividade antimicrobiana

Strobel e Daisy (2003) afirma que muitos compostos antibióticos e antitumorais são produzidos por fungos, como por exemplo, pelo fungo *Triterigeum*

wilfordii que produzem metabólitos bioativos com estrutura química e atividades já estudadas e identificadas.

Segundo Li et al. (2005) metabólitos de fungos endófitos são vistos como um arsenal versátil de agentes antimicrobianos, pois alguns endófitos demonstraram possuir capacidades biossintéticas superiores devido a sua provável recombinação genética com o hospedeiro, enquanto residem e se reproduzem dentro dos tecidos de plantas saudáveis. Os autores identificaram o *Aspergillus* sp., um fungo endófito de atividade importante de um total de 32 fungos endófitos isolados da planta medicinal *Cynodon dactylon* (Poaceae) e examinados *in vitro* para atividade anti-*Helicobacter pylori*. Como metabólitos secundários deste fungo, foram isolados quatro compostos: o ácido helvólico, monometilsulocrina, ergosterol e 3 β -hidroxi-5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,22-diene, sendo que o metabólito mais ativo contra *H. pylori* foi o ácido helvólico.

O fungo endófito *Penicillium janthinellum* isolado dos frutos de *Melia azedarach* foi cultivado, e policetídeos (citrinina, emodina, 1,6,8-triidroxi-3-hidroximetilantraquinona e uma nova antraquinona modificada: a janthinona) foram produzidos. Essas substâncias foram ensaiadas contra as bactérias *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (MARINHO et al., 2005).

Fungos endófitos de plantas do gênero *Garcinia* representam uma boa fonte de exploração para novas drogas antimicobacterianas. Com isso, extratos de fungos endófitos de *Garcinia* são testados em *Mycobacterium tuberculosis* causadores da tuberculose, uma das infecções mais sérias em pacientes imunocomprometidos como os aids. O resultado destes estudos tem claramente confirmada a alta diversidade de fungos endófitos de *Garcinia* sp que produzem compostos bioativos (PHONGPHAICHIT et al., 2007).

A busca sistemática de novas estruturas bioativas de fungos endófitos, o *Acremonium* sp. foi isolado de *Plantago lanceolata*, e cultivado para a obtenção de metabólitos. Da mesma forma, um Ascomiceto não identificado, isolados de *Erica arborea*, foi selecionado para testes químicos e biológicos, devido à forte atividade antifúngica do extrato bruto contra *Botrytis cinerea*, bem como a boa atividade antibacteriana e algicida (HUSSAIN et al., 2007).

Weber et al. (2007) isolaram e identificaram seis compostos bioativos dos extratos de cinco espécies de fungos endófitos. A atividade antifúngica, contra

Candida albicans, de quatro compostos foi comparável à da anfotericina B, usada como padrão.

Firáková, Sturdíková e Múcková (2007) apresentam uma visão geral dos metabólitos secundários isolados de endófitos nos últimos cinco anos. Alguns exemplos: isopestacina isolada do fungo endófito *Pestalotiopsis microspora* da planta *Terminalia morobensis*, com atividade antimicrobiana (HARPER et al., 2003); kakadumicina A, do fungo *Streptomyces* NRR1 30566 da planta *Grevillea pteridifolia*, com amplo espectro de atividade antibiótica, especialmente contra bactérias Gram-positivas e acentuada atividade contra o parasito da malária (CASTILLO et al., 2003); pomol do fungo endófito *Phomopsis* spp da planta *Erythrina cristagalli*, com atividade antifúngica e antibacteriana (WEBER et al., 2004); coronamicina, do fungo *Streptomyces* sp da planta *Monstera* sp com atividade contra fungos patógenos humanos como o *Cryptococcus neoformans* e atividade contra *Plasmodium falciparum* (STROBEL et al., 2004); asperfumoide, do fungo endófito *Aspergillus fumigatus* CY 018, da planta *Cynodon dactylon*, inibiu o crescimento de *Candida albicans* (LIU et al., 2004); griseofulvina, do fungo *Xylaria* sp F0010, da planta *Abies holophylla*, com atividade antifúngica e antibiótica (PARK et al., 2005).

Extratos de *Thitonia diversifolia* e *Viguiera arenaria* têm sido testados contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* e estão sendo usados em testes para inibição de células leucêmicas, e inibição de enzimas que participam de metabolismos da *Leishmania tarentolae* e *Trypanosoma cruzi* (GUIMARÃES et al., 2008).

Compostos bioativos a partir de fungos endófitos com atividade antimicobacteriana forte contra o *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37Ra) foi demonstrado pelo extrato de *Phomopsis* sp. PSU-D15, isolado das folhas de *Garcinia dulcis* (Roxb.) Kurz (RUKACHAISIRIKUL et al., 2008).

Yoganathan et al. (2008) relata que a busca por novos agentes com atividade antibacteriana contra a MRSA (*methicillim-resistant Staphylococcus aureus*), duas linhagens do fungo anamórfico *Microsphaeropsis*, F2076 e F2078, foram coletados em Cingapura a partir de sedimento do lago, levou à identificação de quatro novos dímeros benzofenona e microsfaerinas A-D (1 a 4). O composto microsfaerina D apresentou atividade antibacteriana contra várias bactérias gram positivas e negativas em uma baixa faixa de μM (FIGURA 2).

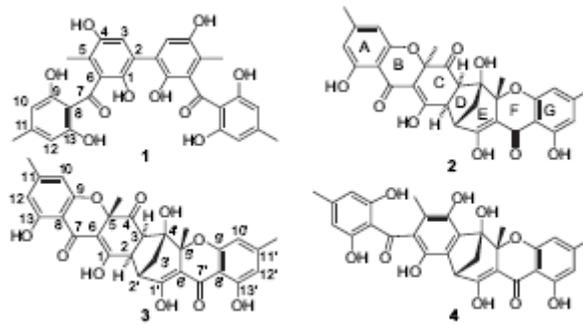


Figura 2 - Estruturas químicas: microsfaerinas A(1), B(2), C(3) e D(4)
Fonte: Yoganathan et al., 2008.

Kusari et al. (2008) relataram pela primeira vez o isolamento de um fungo endófito de plantas do gênero *Hypericum*. Tal endófito produziu os compostos emodim e hipericina através de fermentação. Foi determinada a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato bruto do endófito e dos compostos isolados contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* ssp., contra as Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* ssp *azaenae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* e *Escherichia coli* e também contra *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Todos os microrganismos foram consideravelmente suscetíveis aos dois compostos hipericina e emodin, mostrando que este endófito possui significativo potencial industrial e científico para suprir a demanda farmacêutica por hipericina.

2.3.2 Atividade Antioxidante

Segundo Harper et al. (2003), foi extraído de um fungo endófito, *Pestalotiopsis microspora* (um fungo nativo de florestas da Papua, Nova Guiné), um produto chamado pestacin de nome químico 1,3-dihidro isobenzofurano, que tem moderadas propriedades antifúngicas e atividade antioxidante onze vezes maior que a vitamina E.

Liu et al. (2007) sugerem que o fungo endófito *Xylaria* sp YX-28 é uma potencial fonte de antioxidantes naturais. Isto é relatado pela primeira vez que um endófito *Xylaria* sp a partir de *Ginkgo biloba* tem a atividade antioxidante utilizando radical DPPH e ácido linoléico - β caroteno. No entanto, a toxicidade dos extratos

endófitos com alta atividade antioxidante deve ser testada para confirmar a sua segurança para uso como alimento e aditivos. Além disso, as características fitoquímicas e os mecanismos antioxidantes do extrato devem ser mais estudados, para ganhar mais compreensão da sua atividade antioxidante em sistemas alimentares.

Huang, W. Y. et al. (2007) estudaram 1.160 isolados fúngicos endófitos obtidos de diferentes tecidos de 29 plantas da medicina tradicional chinesa. O objetivo dos autores foi explorar fungos endófitos que produzissem *in vitro* compostos bioativos com potente atividade antioxidante. Foi investigada a capacidade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais de 292 isolados fúngicos morfológicamente distintos. Observou-se uma correlação positiva, revelando que metabólitos produzidos por fungos endófitos em cultura podem ser uma potencial fonte de antioxidantes naturais.

2.3.3 Atividade antiproliferativa

Fungos endófitos isolados de plantas medicinais da China. *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei*, *Torreya grandis* foram o objetivo de estudo de Huang et al. (2001) para selecionar fungos com atividade antitumoral e antifúngica. 172 fungos foram isolados, sendo que 107 fungos endófitos da planta *T. mairei*, 30 de *C. fortunei* e 35 fungos de *T. grandis*. e testados suas atividades citotóxicas. Oito caldos fermentados dos fungos endófitos apresentaram atividade citotóxica contra cinco linhagens de células, dentre elas: HL-60, KB, Hela, SPC-A-1, MCF-7. Destes oito fermentados, dois apresentaram somente para uma linhagem de célula tumoral: HL-60.

No decorrer da busca contínua para antitumorais potentes foram descobertos produtos naturais a partir de fungos de manguezais na costa do Mar do Sul da China. O extrato do fungo endófito extraído da planta *Kandelia candel* identificado pelo nº1893 apresentou citotoxicidade para linhagens de células NCI4460 e Bel-7402, e grande atividade contra *Heliothis armigera* (Hühner) e *Sinergasilus* spp. Foram isoladas duas novas lactonas: 1893A e 1893B, juntamente com 5 - (p-hidroxi-

hidantoína) benzílico e dois cyclodipeptídeos, ciclo-(Ser-Leu) e ciclo (Phe-Gly), a partir do caldo de fermentação do fungo (CHEN et al., 2003).

De acordo com Li et al. (2005), foram isolados e testados 130 fungos endófitos de 12 plantas da medicina tradicional chinesa, coletadas no sudoeste da China. Foram avaliadas quanto à atividade antifúngica e anticancerígena em linhagens BGC-823 de células tumorais gástricas humanas e quanto à inibição do crescimento contra sete fungos fitopatogênicos. Destes, 9,2% dos isolados demonstraram atividade antitumoral e 30% exibiram atividade antifúngica.

Guimarães et al. (2008) testaram e compararam o extrato bruto do fungo *Glomerella cingulata* e compostos isolados utilizando o metotrexato como controle, e os resultados afirmam que existe um sinergismo citotóxico entre derivados de ácidos graxos e os compostos presentes no extrato bruto. Demonstrou-se que os ácidos graxos insaturados podem ser usados como moduladores de tumor de células quimiossensíveis.

Extratos do fungo endófito *Ampelomyces* sp foram utilizados para isolamento e identificação de quatorze substâncias bioativas, com atividade citotóxica contra células L5178Y (linfoma) e antimicrobiana contra microrganismos Gram positivos e negativos. As diferenças na composição química dos extratos resultam em uma diferença de atividade citotóxica (ALY et al., 2008).

Qin et al. (2009), em contínuo rastreamento de metabólitos secundários biologicamente ativos de microrganismos endófitos, investigaram metabólitos secundários produzidos pelas culturas do fungo endófito *Chaetomium globosum* presentes nas folhas de *Ginkgo biloba*. A atividade do extrato de acetato de etila das culturas do fungo com boa atividade citotóxica (*Artemia salina*) levou ao isolamento de quatro metabólitos: duas azapilonas chaetomugilinas, e dois alcalóides cetoglobosinas e citocalasanas.

Certos fungos endófitos associados com plantas do gênero *Taxus* produzem paclitaxel (taxol). O paclitaxel é um potente agente antineoplásico com excelente atividade contra uma variedade de cânceres. O paclitaxel pode ser produzido por síntese química total, a partir do seu precursor semi-sintético, plantas e cultura de tecidos vegetais. É uma droga atraente, porém seus efeitos tóxicos são estudados *in vivo* (LI; TAO, 2009).

Taxol é um alcaloide diterpeno complexo com atividade antitumoral, que foi isolado pela primeira vez a partir de *Taxus brevifolia*, a 28 anos atrás. O mecanismo do taxol é inibir e despolimerizar a microtubulina, desarranjar a função de microtúbulos, afetando a formulação de eixo, que inibe a mitose da célula tumoral. O taxol tem sido usado para curar muitos tumores malignos, como câncer de mama, câncer de ovário, coriocarcinoma e estereomioma (PANDI; MANIKANDAN; MUTHUMARY, 2010).

O Paclitaxel (taxol) (FIGURA 3) e seus derivados representam o primeiro e maior grupo de agentes anticancerígenos produzidos por fungos endófitos. Vários fungos como *Taxomyces andreanae* são capazes de produzi-los, entre outros fungos de variadas espécies de plantas (STROBEL; DAISY, 2003).

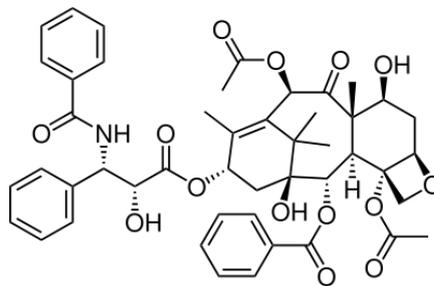


Figura 3 - Estrutura química do Paclitaxel (Taxol)
Fonte: Strobel; Daisy, 2003

Pandi, Manikadan e Muthumary (2010) comentam que o taxol têm sido produzido com sucesso por vários fungos endófitos isolados de diferentes espécies de plantas medicinais. Existem estudos sobre a atividade citotóxica deste taxol fúngico. O fungo endófito *Botrydiplozia theobromae* Pat. isolado da planta *Morinda citrifolia* Linn foi alvo de seus estudos por apresentar o taxol em sua composição. Foi utilizado o 7,12-dimetil benz(a) antraceno (DMBA) – indutor carcinogênico da glândula mamária em ratos e os resultados foram expressivos mostrando atividade citotóxica por apoptose.

2.3.4 Outras atividades de fungos endófitos

Segundo Holler, König e Whight (1999), o fungo *Microsphaeropsis* sp. encontrado em associação com esponjas marinhas foi isolado e cultivado para investigação de sua atividade biológica. As estruturas químicas dos compostos isolados microsphaeropsisina, (*R*)-melleina, (*3R,4S*)- hidroximelleina, (*3R,4R*)-hidroximelleina e 4,8-dihidroxi-3,4-dihidro-2*H*- naftalen-1-ona foram determinadas e a atividade antimicrobiana demonstrou ser significativa pelo teste de difusão em ágar.

Outros compostos também foram isolados por Wang et al. (2002), a microsfaerona A (1) e B (2) (FIGURA 4) do fungo *Microsphaeropsis* sp. extraído de esponjas do Mediterrâneo *Aplysina aerophoba*. Conforme analisado, a composição química de substâncias produzidas pelo fungo *Microsphaeropsis* sp. varia por razões conhecidas como por exemplo: a planta hospedeira, o clima, o tecido vegetal em que o fungo se encontra, entre outros. É comum substâncias levarem nomes derivados de seus gêneros e/ou espécies quando são primeiramente identificadas, e, se a técnica e os equipamentos utilizados forem capazes de separar, isolar e identificar tais substâncias poderão ser verificadas em outras amostras.

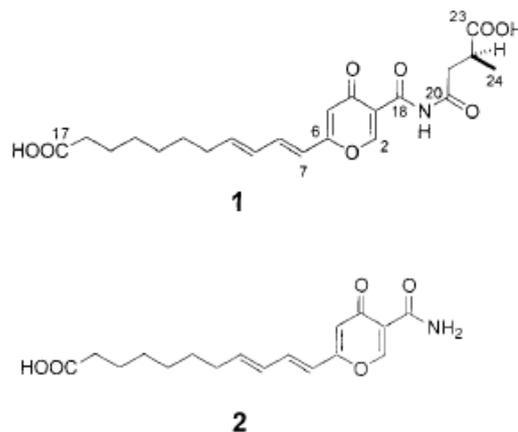


Figura - 4 Estruturas químicas dos compostos: microsfaerona A (1) e B (2)
Fonte: Wang et al., 2002, p. 772.

Outros bioativos com atividades como inseticidas, antidiabéticos, imunossupressores, têm sido isoladas de diversos fungos com enorme potencial terapêutico. O maior problema do futuro, certamente será a diminuição das florestas

e com isso, a biodiversidade de micro-organismos capazes de metabolizar substâncias importantes (STROBEL; DAISY, 2003).

Triagens revelaram que os fungos são fontes potenciais de imunossupressores como a ciclosporina A, FK506 e rapamicina, porém esses agentes também mostram alguns indesejáveis efeitos colaterais, tais como a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (KUMAR et al., 2004).

Programas de pesquisa para detecção e identificação de substâncias antimicrobianas bioativas, têm sido isoladas de várias plantas do gênero *Garcinia* do sul da Tailândia. Outras atividades biológicas são investigadas como antioxidantes, antimaláricas, antivirais e citotóxicas, usando métodos de identificação molecular (PHONGPAICHIT et al., 2007).

Há uma urgência necessária de drogas eficientes para o tratamento de infecções provocadas por nematódeos e protozoários tais como a malária, leishmaniose, tripanossomíase e filariose, por isso, a investigação de fungos endófitos para descobrimento de novos produtos naturais. Extratos fúngicos extraídos das plantas *Viguiera arenaria* e *Tithonia diversifolia* foram testados pelo método da inibição enzimática da gGPDH do *Trypanosoma cruzi* e APRT da *Leishmania tarentolae* para determinação da atividade antiparasitária, obtendo resultados satisfatórios sugerindo que fungos endófitos são produtores de compostos antiparasitários (GUIMARÃES et al., 2008). O composto álcool 3-cloro-2,5-dihidroxibenzil, um potente composto antimicrobiano, foi isolado a partir do derivado marinho *Ampelomyces* sp é efetivamente inibidor seletivo da larva *Hydroides elegans* (ALY et al., 2008).

O gênero *Phomopsis* é uma fonte rica de metabólitos secundários biologicamente ativos, incluindo phomopsidina com ação antimicrotubular, phomoxanthonas com ação antimalárica e antituberculose, phomoxanthona A e phomodiol, de ação antifúngica, phomosinas, herbicidas e algicidas, derivados da phomalactona, inibidores da produção de citocinas, phomopsichalasininas antimicrobianas e citocalasina H de ação reguladora do crescimento vegetal (RUKACHAISIRIKUL et al., 2008).

Alguns fármacos recentemente aprovados de origem fúngica são micafungina, um metabólito antifúngico de *Coleophoma empetri*, micofenolato, um produto do *Penicillium brevicompactum*, utilizados para prevenção da rejeição de

transplante renal, a rosuvastatina de *Penicillium citrinum* e *P. brevicompactum* usados para tratar as dislipidemias e CEF pivoxil ditoren, um antibiótico de largo espectro derivado do *Cephalosporium* sp. Derivados da fumagillina, um antibiótico produzido por *Aspergillus fumigatus*, e Illudin-S um sesquiterpeno do *Omphalotus illudens* apresentam atividade anticancerígena (SURYANARAYANAN et al., 2009).

Fungos endófitos produzem metabólitos variados como terpenóides, esteróides, xantonas, chinonas, fenóis, isocumarinas, benzopirranonas, tetralonas, citocalasinas e enniatinas (SCHULZ et al., 2002). As atividades dos metabólitos são por exemplo, inibidoras de oxidase, inibidoras de acetilcolinesterase, inseticidas, aceleradores de crescimento de raiz, antiinflamatório e agentes ativadores de receptores de insulina (GUANATILAKA, 2006). A Tabela 2 mostra alguns fungos endófitos e seus metabólitos isolados e identificados com variadas atividades biológicas (SURYANARAYANAN et al., 2009).

Tabela 2 – Fungos endófitos e seus metabólitos bioativos

Fungos endófitos	Metabólitos bioativos
<i>Phomopsis</i> sp	Phomopsolida A
	Phomopsolida B
<i>Chaetomium</i> sp.	Chaetoglobosina A
	Chaetoglobosina C
	Chaetoglobosina D
	Chaetoglobosina G
<i>Alternaria alternata</i>	Prosalanapirone I
	Prosalanapirone II
	Prosalanapirone III
	Solanopirone A, B, C, D, E, F, G
<i>Nigrospora oryzae</i>	Apidicolin
	Apidicoleno
	Apidicolaneodiol
	Apidicolanatriol
	Apidicolanepentol
<i>Curvularia</i> sp	Citocalasin B

Continua

		Conclusão
Fungos endófitos	Metabólitos bioativos	
<i>Fusarium</i> sp.	Citocalasin F Apicidina Enniatina A1 Enniatina B Enniatina E	

Fonte: SURYANARAYANAN et al. 2009, p. 13.

2.4 O FUNGO *Microsphaeropsis*

O *Microsphaeropsis* é um fungo filamentosso anamórfico pertencente ao filo Ascomycota da classe do Coelomicetos, normalmente com conídios pigmentados. É um fungo endófito encontrado em diversas espécies de plantas podendo ser um saprófita, parasita, oportunista ou até mesmo um patógeno. Há relatos que foram encontrados em lesões de pequenos animais e humanos imunossuprimidos. Como a maioria dos fungos, o *Microsphaeropsis* são produtores de compostos bioativos de atividade importante como bioherbicida, antibacteriana, antifúngica entre outras. Para melhor produção de seus metabólitos secundários, o fungo *Microsphaeropsis* necessita ser cultivado principalmente em condições ótimas de temperatura e tempo de incubação, substrato adequado para germinação e solventes apropriados para extração (CARISSE; BERNIER, 2002; KLUGER et al., 2004; DAÍ et al., 2007; PENG; CHEN, 2008; HALL et al., 2009; KROCKENBERGER et al., 2010).

Análises realizadas na busca de novos agentes antivirais extraídos de actinomicetos e fungos têm sido alvo das pesquisas de Fukami et al. (2000). Um antivirótico 10-norparvulenona foi extraída de suspensão de fungos do gênero *Microsphaeropsis* sp FO-5050 com estrutura diferente dos antiviróticos conhecidos como amaritadine, rimantadina e zanamivir. Este composto não apresentou atividade antimicrobiana contra os microrganismos *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus*, *Mycobacterium smegmatis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, *Bacteroides fragilis*, *Acholeplasma laidlawii*, *Pyricularia oryzae*, *Aspergillus niger*, *Mucor racemosus*, *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*,

mas mostrou ter concentração-dependente efetiva inibindo a replicação do vírus influenza A/PR/8/34.

Segundo Carisse e Bernier (2002) 189 fungos foram isolados a partir de folhas secas de maçã, algumas destas foram selecionadas para inibir a produção de ascósporos em testes *in vitro*. A partir desta avaliação, cinco casos, incluindo duas espécies de *Microsphaeropsis* (P130A e P176A) foram selecionados. Os agentes potenciais de biocontrole foram testados em condições no pomar. O isolado P130A obteve a redução mais confiável na produção dos ascósporos, e foi descrita como nova espécie *M. ochracea*.

Alguns pesquisadores examinaram a germinação de conídios de *Microsphaeropsis amaranthi*, *Phomopsis amaranthicola* e a mistura dos dois microrganismos *in vitro*, utilizando técnicas para avaliação da compatibilidade dos organismos com pesticidas ou com adjuvantes, em condições do ambiente favoráveis à germinação. Foi testada a atividade bioherbicida contra oito espécies de microrganismos patogênicos do gênero *Amaranthus*, algumas delas resistentes a herbicidas utilizados normalmente no combate de pragas de grãos (ORTIZ-RIBBING; WILLIAMS II, 2006).

Microsphaeropsis arundinis é um fungo que normalmente habita plantas terrestres, é presente no solo e na água fresca. É um membro da classe Coelomicetos, que está surgindo como patógeno causador de infecções em tecidos moles em pacientes imunocomprometidos. Infecções secundárias mais comuns surgem por inoculação traumática, que pode progredir e propagar por via subcutânea. Dois relatórios de caso de infecções dos tecidos moles foram previamente descritos na Austrália, mas as infecções por este organismo ainda não foram descritas nos Estados Unidos (HALL et al., 2009).

Outras espécies de *Microsphaeropsis* têm implicações em infecções dos tecidos moles. *Microsphaeropsis olivacea* foi relatada como causadora de lesão de pele e também foi isolada a partir do olho de um homem com ceratite ocular. (KROCKENBERGER et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

Foram utilizadas neste trabalho, linhagens de fungos endófitos de diferentes gêneros isolados de folhas e hastes do *Theobroma cacao* L. Os micro-organismos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ludwig H. Pfenning, responsável pelo Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos e Patologia Florestal do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As culturas foram mantidas em incubadoras a 25°C, crescidas em tubos de ensaio contendo meio Agar Malte 2%.

3.2 SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDÓFITOS PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS

3.2.1 Culturas

Antes do início da seleção, as culturas foram repicadas em placas de petri contendo meio Agar Malte 2% e incubadas a 28°C até crescimento satisfatório (10-12 dias). Os fungos endófitos do cacau que foram utilizados para seleção estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Fungos endófitos do cacau

continua

CÓDIGO (CML)	GÊNERO/ESPÉCIE
1521,1523,1524,1525,1526,1527, 1528,1530,1531,1532, 1533,1534,1535,1636,1540, 1544 1609, 1688,1697 1610	<i>Phomopsis</i> sp. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Virgatospora echinofibrosa</i>

conclusão	
CÓDIGO (CML)	GÊNERO/ESPÉCIE
1614,1769	<i>Paraconiothyrium</i> sp.1
1621 ,1696 ,1770	<i>Phoma levellei</i>
1670,1820	<i>Clonostachys roseo</i>
1692	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
1698	<i>Mirothecium roridum</i>
1702, 1765	<i>Microsphaeropsis</i> sp.
1720 ,1721,1722	<i>Fusarium subglutinans</i>
1764	<i>Phoma sorghina</i>
1766	<i>Paraconiothyrium</i>
1768	<i>Phoma herbarum</i>

3.2.2 Fermentação e Extração dos Metabólitos Bioativos

Fragmentos de Agar Malte 2% obtidos conforme o item 3.2.1 foram inoculados em erlenmeyers de 250 mL contendo 10g de farelo de trigo umedecido com água destilada na proporção 1:2 (m/v) e incubados a 28°C até crescimento satisfatório. Os produtos da fermentação em meio sólido foram extraídos adicionando-se 100 mL de diclorometano, deixando-o em maceração durante 60 minutos e agitando periodicamente. Este procedimento foi repetido por mais uma vez, ou seja, o resíduo foi retomado e novamente foi macerado com o diclorometano. Os extratos foram filtrados duas vezes em papel de filtro e concentrados em evaporador rotativo. Após total evaporação do diclorometano, os extratos foram diluídos em 250 µL de álcool absoluto.

3.2.3 Seleção das Linhagens Fúngicas através da Determinação da Atividade Antimicrobiana por Teste de difusão em ágar (Halo de Inibição)

Os extratos da fermentação obtidos no item 3.2.2 foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana contra os micro-organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) Gram positivo, *Escherichia coli* (ATCC 25922) Gram negativo e *Candida albicans* (ATCC 10231) fungo, gentilmente cedidos pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Unifal-MG.. Para tal, foram preparadas suspensões microbianas padronizadas de forma a obter um crescimento na superfície do ágar de $3,19 \times 10^6$ UFC/mL. Alíquotas (1% de inóculo) dessas suspensões foram inoculadas em meio ágar Mueller-Hinton (à 40°C) para as bactérias e ágar Sabouraud (à 40°C), para a levedura, em seguida, a mistura homogeneizada através de um agitador magnético. Após a homogeneização, 30 mL do meio, inoculado com os micro-organismos, foram imediatamente vertido em placas de Petri previamente esterilizadas. Após a solidificação do ágar, foram feitas perfurações/poços no meio de cultura onde foi colocada uma alíquota de 20 µL dos extratos já diluídos em álcool absoluto (2000µg/20µL). As placas, então, foram incubadas por 24 horas à 37°C.

Com base nos resultados obtido no teste difusão em ágar, foi selecionado uma linhagem para dar continuidade no trabalho.

3.3 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS BIOATIVOS DO EXTRATO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO *Microsphaeropsis* sp.

3.3.1 Produção do extrato da fermentação do *Microsphaeropsis* sp.

Fragmentos de Agar Malte 2% obtidos conforme o item 3.2.1 foram inoculados em Erlenmeyers de 1000 mL contendo 100g de farelo de trigo umedecido com água destilada destilada na proporção 1:2 (m/v) e incubado a 28°C até

crescimento satisfatório. A fermentação e extração foram realizadas conforme descrito no item 3.2.2.

3.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO *Microsphaeropsis* sp.

3.4.1 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM)

A análise por CG-EM foi conduzida em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu QP 2010 *Plus*. Para a derivatização foram pesados 5 mg do extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. isenta de água e adicionado 100µL do reagente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA). A mistura foi homogeneizada e levada em estufa à 70°C, durante 10 minutos, para ocorrer a reação. Em seguida, o reagente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio e o produto da derivatização (derivados do trimetilsilil – TMS) foi rediluído em hexano (600 µL). Após homogeneização, o sobrenadante foi transferido a outro *vial* que seguiu para injeção imediata no CG-EM.

A amostra foi separada em coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25 µm). A programação de temperatura iniciou em 80°C (1 minuto), a taxa de aquecimento de 20°C/minuto alcançou 250°C (1 minuto), passou a 300°C (5 minutos) a taxa de 6°C/minuto, a 310°C (5 minutos) a taxa de 15°C/minuto, a 320°C (10 minutos) a taxa de 20°C/minuto, totalizando 40 minutos de análise. Hélio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 280°C e o volume de injeção foi de 0,5 µL no modo “*splitless*”. A interface foi mantida a 280°C e o detector operou no modo “*scanning*” (*m/z* 40-800). A integração foi feita por meio do *software* LabSolutions-GCMS. Os compostos foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões autênticos silanizados e eluídos nas mesmas condições e com a biblioteca Wiley 8.

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO *Microsphaeropsis* sp.

3.5.1 Determinação da Atividade Antimicrobiana *in vitro*

3.5.1.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada de acordo com a técnica descrita pela CLSI (2007) e Duarte et al (2003), com modificações, utilizando o extrato da fermentação de *Microsphaeropsis* sp. Colônias do micro-organismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), gentilmente cedidos pelo Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Unifal-MG foram suspensas em 5 mL de solução de NaCl 0,89% esterilizada até atingir uma turbidez com leitura de transmitância de 75% a 660nm, o que equivale a um crescimento bacteriano referente a $3,19 \times 10^6$ UFC/mL.

Um volume equivalente a 1% de inóculo foi adicionado em meio caldo Mueller-Hinton de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de 10^4 UFC/mL e homogeneizada. Imediatamente após a homogeneização, um volume de 4950µL de meio de cultura inoculado foi colocado em cada tubo de ensaio. Um volume de 50µL do extrato da fermentação do *Microsphaeropsis* sp. diluídos em álcool absoluto nas concentrações que variaram de 7,93 a 1000 µg/mL foi acrescentado em cada tubo, resultando em um volume final de 5mL de suspensão. Em seguida, os tubos de ensaio foram agitados e incubados em estufa a 37°C por 18 - 24 horas.

Após a incubação, os tubos foram agitados e a leitura realizada em espectrofotômetro a 660nm. Foram utilizados vários controles: 1) meio de cultura inoculado de microrganismo acrescido de etanol absoluto (v/v); 2) meio de cultura inoculado de microrganismo; 3) meio de cultura sem inóculo. A CIM foi considerada a menor faixa de concentração dos extratos em que não houve crescimento bacteriano visível, ou seja, uma leitura de absorbância a 660nm menor que 0,05.

3.5.1.2 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Com base nos resultados obtidos no teste da CIM, foram utilizados como inóculo as suspensões provenientes dos tubos de ensaio que apresentaram resultados de leitura de absorbância, a 660nm, inferior a 0,05. As placas com o meio de cultura ágar Mueller-Hinton foram semeadas com 50µL de inóculo com o auxílio de micropipeta automática, e estas foram espalhadas com alça de Drigalski. As placas foram incubadas em estufa a 37°C, por 24 horas. A CBM considerada foi a menor concentração do extrato que apresentou CIM e na qual não houve crescimento celular sobre a superfície, ou seja, 99,9% de morte microbiana.

3.5.2 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método do poder sequestrante de radicais DPPH

A determinação da atividade sequestrante de radicais DPPH (α,α -difênil- β -picrilhidrazil) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Yen, Chang e Duh (2005) com modificações.

Foram adicionados em tubos de ensaios 4,0 mL da solução do extrato diluídos em álcool absoluto em concentrações de 250 a 1000ppm (em triplicata) e 1,0 mL de solução do radical DPPH (α,α -difênil- β -picrilhidrazil) (0,5mM). A mistura foi agitada vigorosamente e mantida em repouso, sob proteção da luz por 30 minutos. Em seguida, foram lidas as absorbâncias a 517nm em espectrofotômetro. A capacidade sequestrante foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{CS} = (A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{branco}} \times 100$$

Onde:

%CS representa a porcentagem da capacidade sequestrante;

A_{branco} , a absorbância do branco;

A_{amostra} , absorvância da amostra

A atividade antioxidante do extrato de *Microsphaeropsis* sp. foi analisada pelo teste ANOVA (análise de variância) seguido pelo método de comparação múltipla (teste de Tukey) que comparou estatisticamente as amostras do extrato da fermentação do *Microsphaeropsis* sp. e do farelo de trigo, juntamente com os controles butilhidroxitolueno (BHT) e ácido ascórbico. O teste avalia se os valores são estatisticamente significativos ($p > 0,05$), utilizando o programa Bioestat 5.0.

3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*

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).

Foram empregadas nove linhagens de células tumorais humanas (TABELA 4). Estas linhagens foram cedidas gentilmente pelo National Cancer Institute e mantidas no laboratório de cultura de células do Centro Pluridisciplinar de Pesquisa Química, Biológica e Agrícola – CPQBA/UNICAMP, 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 4 - Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa

Linhagem	Órgão/Doença	Origem Embrionária
U251	SNC; glioma	Ectoderme
UACC-62	Pele; melanoma	Ectoderme
MCF-7	Mama; adecarcinoma	Ectoderme
NCI-ADR/RES*	Ovário; adenocarcinoma	Ectoderme
786-O	Rim; adenocarcinoma	Mesoderme
NCI-H460	Pulmão; carcinoma tipo não pequenas células	Endoderme
PC-3	Próstata; adenocarcinoma	Mesoderme
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma	Mesoderme
HT-29	Cólon; adenocarcinoma	Endoderme
K562	Medula óssea; Leucemia mielóide crônica	Mesênquima

* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos

Foram inoculados 100 μ L/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 penicilina; estreptomicina 1000 μ g/mL; 1000U/mL; 1 mL/L (Nutricell[®]). Após 24h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, foram adicionados 100 μ L/compartimento da amostra a ser testada em quatro concentrações distintas (0,25 μ g/mL, 2,5 μ g/mL, 25 μ g/mL e 250 μ g/mL).

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

Como controle positivo foi utilizado o quimioterápico Doxorrubicina, nas concentrações de 0,025 a 25 μ g/mL do extrato em teste. Neste momento, procedeu-se a 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 μ L/compartimento de TCA a 50% e as placas foram incubadas por 1h a 4°C; a

seguir, as placas foram lavadas quatro vezes consecutivas com água destilada para remoção de resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. Depois de secas completamente, à temperatura ambiente, as placas foram coradas com 50µL/compartimento de 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®), 150 µL, 10 µM e pH 10,5. A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em 540 nm em leitor de microplacas.

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

Se $T > T_1 \rightarrow$ estímulo de crescimento celular;

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

Se $T < T_0 \rightarrow$ atividade citocida: $\%C = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$;

Onde:

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

T_1 = absorbância do branco de células;

T_0 = absorbância do controle de células na placa T_0 .

Foram gerados gráficos de porcentagem de crescimento em função da concentração do extrato, para cada uma das linhagens testadas. As concentrações efetivas denominadas GI_{50} (do inglês *growth inhibition*), concentração necessária para interromper em 50% o crescimento celular, TGI (do inglês *total growth inhibition*), concentração necessária para que ocorra 0% de crescimento celular) foram calculadas por regressão não linear, tipo sigmoideal, utilizando-se software Origin, versão 7.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SELEÇÃO DOS FUNGOS ENDÓFITOS PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A seleção dos fungos endófitos do cacau produtores de compostos bioativos foi determinada conforme descrito no item 3.2, os códigos dos fungos endófitos (CML – Coleção Micológica de Lavras), espécie, resultados dos diâmetros dos halos e rendimentos dos extratos brutos estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 – Código, espécie, diâmetro dos halos formados e rendimentos do extratos dos fungos endófitos isolados do cacau

CÓDIGO (CML)	GÊNERO/ ESPÉCIE	HALO	HALO	HALO	RENDIMENTOS
		(mm) <i>S.aureus</i>	(mm) <i>C.albicans</i>	(mm) <i>E. coli</i>	DOS EXTRATOS (g)
1521	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,010
1523	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,033
1524	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,015
1525	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,026
1526	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,016
1527	<i>Phomopsis</i> sp.	13	30	-	0,024
1528	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,021
1530	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,030
1531	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,031
1532	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,036
1533	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,026
1534	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,019
1535	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,024
1536	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,020
1540	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,027
1544	<i>Phomopsis</i> sp.	-	-	-	0,025
1609	<i>C. gloeosporioides</i>	-	-	-	0,017
1610	<i>V. echinofibrosa</i>	-	-	-	0,023

conclusão					
CÓDIGO	GÊNERO/	HALO	HALO	HALO	RENDIMENTOS
(CML)	ESPÉCIE	(mm)	(mm)	(mm)	DOS
		<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>	<i>E. coli</i>	EXTRATOS (g)
1614	<i>Paraconiothyrium</i> sp.1	-	-	-	0,020
1621	<i>P. levellei</i>	17	-	-	0,029
1670	<i>C. roseo</i>	-	-	-	0,014
1688	<i>C. gloeosporioides</i>	-	-	-	0,040
1692	<i>L. theobromae</i>	9	-	-	0,039
1696	<i>P. levellei</i>	18	-	-	0,020
1697	<i>C. gloeosporioides</i>	-	-	-	0,015
1698	<i>M. roridum</i>	16	-	-	0,031
1702	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	-	-	-	0,046
1720	<i>F. subglutinans</i>	-	-	-	0,011
1721	<i>F. subglutinans</i>	20	-	-	0,019
1722	<i>F. subglutinans</i>	16	-	-	0,036
1764	<i>P. sorghina</i>	-	-	-	0,031
1765	<i>Microsphaeropsis</i> sp.	22	-	-	0,047
1766	<i>Paraconiothyrium</i>	-	-	-	0,028
1768	<i>P. herbarum</i>	-	-	-	0,014
1769	<i>Paraconiothyrium</i> sp.1	-	-	-	0,019
1770	<i>P. levellei</i>	-	-	-	0,030
1820	<i>C. roseo</i>	-	-	-	0,014

A análise dos resultados dos antibiogramas permitiu selecionar os microrganismos produtores de substâncias com atividade antimicrobiana. Dos 37 extratos testados, oito (21,62%) apresentaram a formação de halos de inibição contra *S. aureus*, entre os quais, os extratos da fermentação de *Microsphaeropsis* sp. (CML1765), *Lasiodiplodia theobromae* (CML1692), *Fusarium subglutinans* (CML1721 e CML1722), *Phoma levellei* (CML1621 e CML1696), *Phomopsis* sp. (CML 1527) e *Myrothecium roridum* (CML1698), e um extrato (2,70%), *Phomopsis* sp. (CML 1527), foi efetivo contra *C. albicans*. Nenhum extrato testado apresentou atividade contra *E. coli*.

Após a obtenção destes resultados foi selecionado o fungo *Microsphaeropsis* sp. (CML 1765) para dar continuidade ao trabalho. Apesar do fungo *Phomopsis* sp. (CML 1527) ter apresentado atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e também contra *C. albicans*, optou-se pelo *Microsphaeropsis* sp., pois além de formar o maior halo de inibição contra *S. aureus*, ainda apresentou crescimento uniforme em menor tempo durante processo de fermentação, bom rendimento na produção do extrato, fácil manutenção e boa estabilidade durante o armazenamento.

Fernandes et al. (2009) testaram a atividade antimicrobiana de 22 linhagens de fungos endófitos do café (*Coffea arabica* L.) pelo método de difusão em ágar, sendo que 18 fungos (81,8%) apresentaram halo de inibição contra *S. aureus*, 13 fungos (59,1%) apresentaram halo de inibição contra *E. coli* e oito (36,4%) apresentaram halo de inibição contra *C. albicans*. O fungo selecionado foi o *Alternaria alternata* para dar continuidade aos testes da atividade biológica porque apresentou o maior halo de inibição para dois micro-organismos testados *S. aureus* (27 mm) e *C. albicans* (16 mm). Assim como Phongpaichit et al. (2006) que isolaram e testaram 70 fungos endófitos de *Garcinia* sp pelo método de difusão em Agar, sendo que 18,6% apresentaram atividade antimicrobiana com halos entre 7 e 19 mm. Aproximadamente de 30 a 37 fungos isolados (43-53%) apresentaram atividade contra *S. aureus* e *Cryptococcus neoformans* e 4,3% inibiram *C. albicans*.

É importante ressaltar que linhagens do mesmo gênero e/ou espécie isoladas do *T. cacao* L e testadas neste trabalho, não apresentaram o mesmo resultado no teste antimicrobiano. O fungo CML 1702, também do gênero *Microsphaeropsis* sp., não foi selecionado por não apresentar nenhuma atividade antimicrobiana, assim como as linhagens de *Phomopsis* sp. que, das 16 linhagens testadas, somente uma apresentou atividade antimicrobiana. Estes resultados demonstram a grande diversidade e a dificuldade dos trabalhos de bioprospecção na busca de microrganismos produtores de compostos bioativos.

4.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO *Microsphaeropsis* sp.

A determinação da composição química do extrato da fermentação do *Microsphaeropsis* sp. foi determinada conforme o item 3.4. O cromatograma obtido, bem como a composição química do extrato da fermentação do *Microsphaeropsis* sp. estão apresentados na Figura 4 e na Tabela 6, respectivamente.

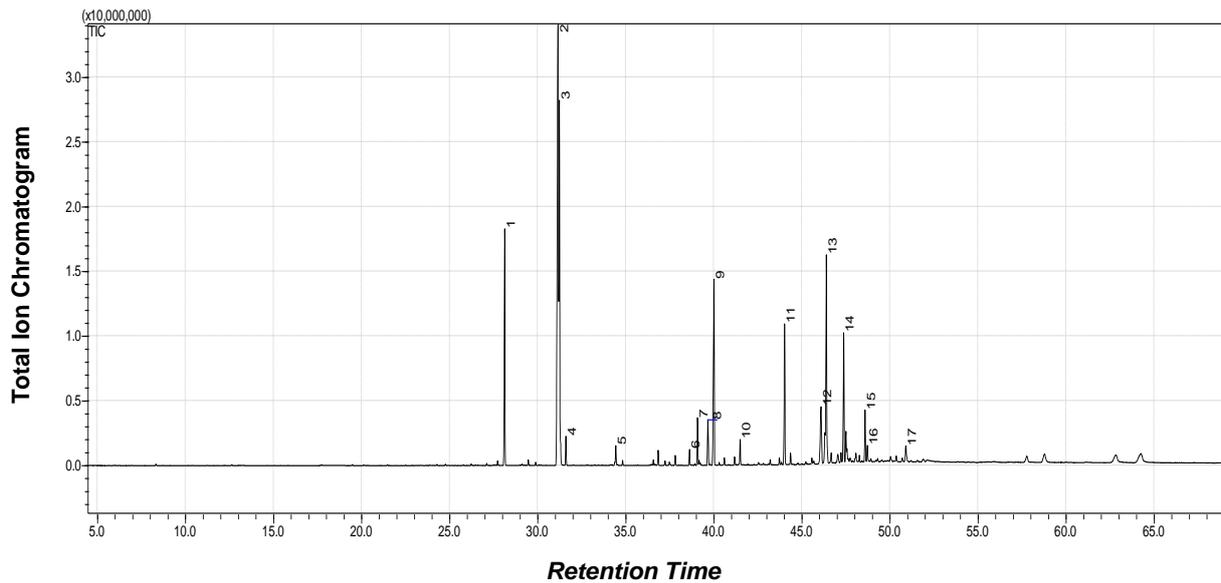


Figura 5 – Cromatograma do extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp.

Tabela 6 – Composição Química do extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp.

<i>Pico nº</i>	<i>Composto</i>	<i>Tempo de Retenção</i>	<i>% Área</i>
1	Ácido hexadecanóico	28.118	9.42
2	Ácido linoléico	31.155	32.78
3	Ácido oléico	31.222	11.50
4	Ácido octadecanóico	31.593	1.02
5	Ácido 11-Eicosanóico	34.427	0.78
6	Não Identificado	38.614	0.62
7	Não Identificado	39.067	1.74

Continua

<i>Pico nº</i>	<i>Composto</i>	<i>Tempo de Retenção</i>	<i>Conclusão % Área</i>
8	2,3-Bis[(Trimetilsilil)Oxi]Propil 9-Octadecenoato	39.652	2.08
9	Não Identificado	40.001	9.50
10	Não Identificado	41.488	0.91
11	Alpha.-Phenil-.Beta.- Trimetilsiloxistireno	44.012	5.86
12	Silano, (Ergosta-5,7,22-Trien- 3.Beta.-Yloxi)Trimetil	46.077	4.10
13	Não Identificado	46.382	10.61
14	Silano, Trimetil[[3.Beta.,22e)- Stigmasta-5,22-Dien-3-Yl]Oxi]	47.368	5.53
15	Não Identificado	48.580	1.92
16	Stigmast-4-En-3-Ona (24r)-4- Stigmasten-3-Ona	48.710	0.72
17	Não identificado	50.893	0.91

O cromatograma do extrato da fermentação do *Microsphaeropsis* sp., é composto de ácidos graxos saturados como o ácido octadecanóico (ácido esteárico – 9,42%), ácido eicosanóico (ácido araquídico - 0,78%), ácido hexadecanóico (ácido palmítico - 9,42%), ácidos graxos insaturados (FIGURA 5) como o ácido oléico (ω -9 - 11,50%) e o ácido linoléico (ω -6 – 32,78%) e 2,3-Bis[(Trimetilsilil)Oxi]Propil 9-Octadecenoato (2,08%). Foram identificados picos de substâncias esteróides como silano, (ergosta-5,7,22-trien-3.beta.-iloxi)trimetil, silano (ergosterol – 4,10%) (FIGURA 6), trimetil[[3.beta.,22e)-stigmasta-5,22-dien-3-yl]oxi] (estigmasterol – 1,92%) (FIGURA 7) e stigmast-4-en-3-ona (24r) -4-stigmasten-3-ona (estigmasterona – 0,72%). Outros compostos não foram identificados pelos padrões autênticos e biblioteca do equipamento.

Alguns compostos semelhantes ao citado acima foram encontrados em extratos fermentados de *Microsphaeropsis*, como mostram os estudos de Peng e Chen (2008), que encontraram conteúdos de glicolipídeos, esfingolipídeos, fosfolipídeos além de ácidos graxos como ácido palmítico (27,3%), esteárico (3,0%), oléico (46,1%), linoleico (20,0%).

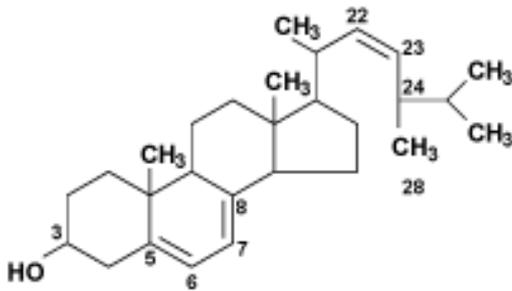


Figura 6 - Estrutura química do Ergosterol
 Fonte: <http://www.answers.com/topic/ergosterol>

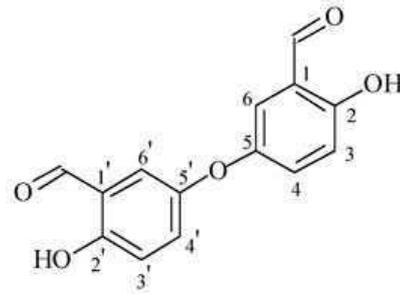


Figura 7 - Estrutura química do Estigmasterol
 Fonte: <http://www.scielo.cl/fbpe/img/bscq/v45n2/img107.jpg>

Outros autores estudando outros fungos do gênero do *Microsphaeropsis*, isolaram e identificaram vários compostos dentre os quais o L-755,80 (LAM. et al., 1996) microsphaeropsisina, (*R*)-melleina, (*3R,4S*)- hidroximelleina, (*3R,4R*)-hidroximelleina e 4,8-dihidroxi-3,4-dihidro-2*H*-naftalen-1-ona (HOLLER, KONIG, WRIGHT, 1999), microsfaerona A e B (WANG et al, 2002) e palmarumicina M1 e M2, ácido piracílico e microsphaeropsinas A e B (DAI et al., 2007).

Frequentemente, extratos fermentados de fungos endófitos apresentam na sua composição química compostos comumente encontrados nos extratos da planta hospedeira como, por exemplo, o taxol, substância encontrada na planta *Taxus brevifolia* e também encontrado no extrato do fungo endófito *Taxomyces andreana* que habita esta planta (STROBEL; DAISY, 2003). O mesmo ocorre com o falcarinol, um composto unicamente encontrado na planta *Panax ginseng* (ginseng), também produzido pelo fungo endófito *Paecilomyce* sp. (XU et al., 2009).

Na composição química do extrato da fermentação do *Microsphaeropsis* sp. do presente trabalho também são encontradas substâncias comuns à planta hospedeira (*T.cacao* L.). Spoladore et al (1983) analisaram a composição química dos óleos extraídos dos cotilédones da amêndoa do cacau, sendo que o teor de ácidos graxos encontrados foi de 28,50% de ácido palmítico, 28,45% de ácido esteárico, 38,43% de ácido oléico, 3,94% de ácido linoléico e 0,67% de ácido linolênico. Bruni et al (2002) estudaram outra planta do mesmo gênero do cacau, o *Theobroma subicanum* e analisaram a composição química de amostras do tegumento, endosperma e embrião das sementes. Foram encontrados ácidos graxos como o palmítico, esteárico, oléico, linoléico, araquídico, berrênico, lignocérico e esqualeno, além dos esteróides esqualeno, campesterol, estigmasterol e sitosterol.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO DA FERMENTAÇÃO DO FUNGO *Microsphaeropsis* sp.

4.3.1 Determinação da concentração inibitória e bactericida mínima (CIM/CBM) do extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp.

O teste microbiológico para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado por macrodiluição conforme descrito no item 3.5.1.1. Os resultados da CIM e da CBM estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Concentração inibitória e bactericida mínima (CIM e CBM) do extrato da fermentação de *Microsphaeropsis* sp.

Amostras	<i>S. aureus</i>	
	CIM ^a	CBM ^a
Extrato de <i>Microsphaeropsis</i> sp. ^b	62,5 - 125	>1000
Extrato do substrato farelo de trigo ^b	**	**
Solvente - álcool absoluto ^b	**	**

^a Valores expressos em µg/mL

** Não apresentou atividade

^b Análises realizadas em triplicata

O extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. apresentou CIM na faixa de 62,5-125 µg/mL e CBM maior que 1000 µg/mL. O extrato do farelo de trigo e o solvente (álcool absoluto) não apresentaram atividade antimicrobiana. Resultado semelhante foi observado por Fernandes et al (2009) que verificaram que o extrato da fermentação do fungo *Alternaria alternata* apresentou CIM de 50-100 µg/mL, sendo a CBM maior que 800 µg/mL. Os resultados obtidos para o extrato da fermentação de *Microsphaeropsis* sp. foram significativos, pois segundo Rios e Recio (2005) são muito interessantes os extratos brutos que apresentam atividade antimicrobiana em concentração abaixo de 100 µg/mL.

Estudos de determinação da CIM de diversos extratos brutos de fungos endófitos isolados de plantas foram realizados, como por exemplo, os resultados descritos por Phongpaichit et al (2007) que avaliaram extratos de fungos endófitos

isolados de espécies do gênero *Garcinia* sp. que apresentaram valores entre 32 µg/mL a 512 µg/mL contra *S. aureus*. O extrato bruto do fungo *Microsphaeropsis olivaceae* foi estudado por Hormazabal e Piontelli (2009) contra os microrganismos *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Tricophyton rubrum* e *Tricophyton mentagrophytes*, que apresentou resultados da CIM de 125 µg/mL, 125 µg/mL, 100 µg/mL e 62,5µg/mL, respectivamente, além da atividade contra os fungos fitopatogênicos *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea* com resultados de CIM de 125 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. Não houve atividade antimicrobiana contra *C. albicans*.

Relacionando a composição química com a atividade antimicrobiana verificou-se que o extrato da fermentação do *Microsphaeropsis* sp. do presente trabalho apresenta compostos como ácidos graxos e esteróides, além de outros não identificados. A atividade antimicrobiana do extrato pode ser explicada pela presença destes compostos como demonstrado por Benkendorff, (2005) e Banday et al. (2010) que avaliaram a atividade antimicrobiana de ácidos graxos e seus análogos contra bactérias gram positivas e negativas. Ainda, esta atividade poderia ser atribuída à presença de esteróides que segundo Keller; Maillard e Hostettmann (1996), Khan; Kim e Kim, (2007) e Yu et al (2010) apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas, negativas e fungos.

Outra explicação quanto à atividade antimicrobiana do extrato da fermentação do *Microsphaeropsis* sp., é com relação aos compostos que não foram identificados quando comparados aos padrões autênticos utilizados no laboratório e na biblioteca do CG/EM. Alguns autores trabalhando com o extrato da fermentação do fungo de mesmo gênero isolaram e identificaram várias substâncias que apresentaram atividade antimicrobiana contra fungos microsphaeropsisina, (*R*)-melleina, (*3R,4S*)-hidroximelleina, (*3R,4R*)-hidroximelleina, e 4,8-dihidroxi-3,4-dihidro-2*H*-naftalen-1-one) (HOLLER; KONIG; WRIGHT, 1999) e bactérias gram positivas (microsphaerina D) (YOGANATHAN, K. et al., 2008), sugerindo que esta atividade poderia estar relacionada à presença destes compostos.

4.3.2 Determinação da Atividade Antioxidante do extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp.

A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de DPPH que baseia-se na redução do radical DPPH (α, α -difênil- β -picrilhidrazil) na presença de um antioxidante conforme descrito no item 3.4.3. A diminuição da absorbância do radical DPPH causado por antioxidantes é devido à doação do hidrogênio. A reação é notadamente visível, pois a solução passa da cor púrpura para amarela. O DPPH é um radical livre que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico (YEN; CHANG; DUH, 2005).

O resultado do teste antioxidante do extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. e do farelo de trigo estão na Figura 8.

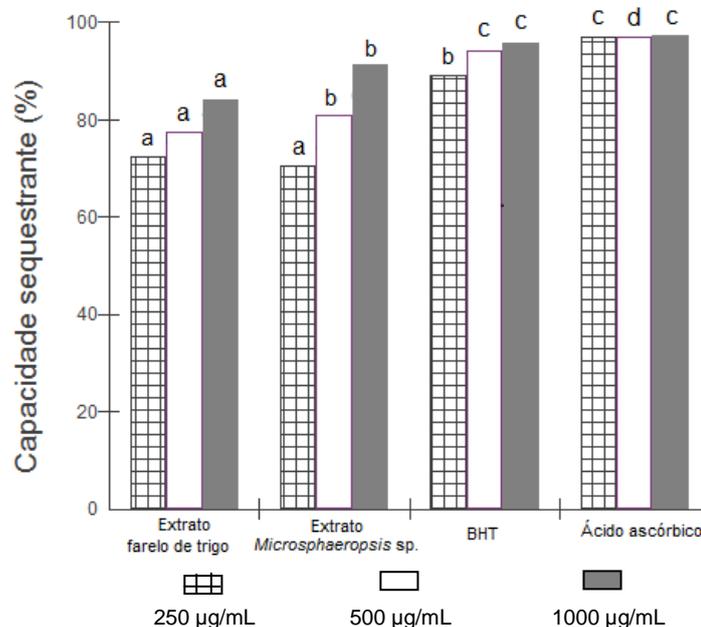


Figura 8 – Atividade antioxidante do extrato da fermentação do *Microsphaeropsis* sp. e os respectivos controles positivos.

Letras diferentes na mesma concentração indicam que os valores da capacidade sequestrante de radicais DPPH apresentaram diferença estatisticamente significativas com valores $p < 0,05$;

O extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. e do farelo de trigo apresentaram uma capacidade sequestrante menor quando comparados aos padrões utilizados, porém o extrato de *Microsphaeropsis* sp. apresentou atividade antioxidante maior ($p < 0,05$) que o extrato do farelo de trigo em concentrações acima de 500µg/mL. O resultado obtido do presente trabalho foi muito semelhante aos resultados da atividade antioxidante do trabalho de Fernandes (2009) utilizando os

métodos do DPPH e ácido linoléico- β caroteno do extrato da fermentação do fungo *Alternaria alternata*. Os mesmos testes foram empregados por Liu et al. (2007) que investigaram a atividade antioxidante do extrato de *Xylaria* sp. YX-28 que exibiu maior atividade que os padrões utilizados (ácido ascórbico e BHT). Segundo os autores, esta atividade antioxidante foi atribuída à presença de compostos fenólicos, ferruginol, além de flavonóides, comumente utilizados com antioxidantes.

Conforme determinado no item 3.5 o extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. do presente trabalho não possui compostos fenólicos e nem flavonóides o que pode explicar em parte, a baixa atividade antioxidante deste extrato.

4.3.3 Atividade antiproliferativa do extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp.

A atividade antiproliferativa foi realizada conforme a metodologia descrita no item 3.5 e os resultados estão apresentados na Figura 9 e Tabela 8.

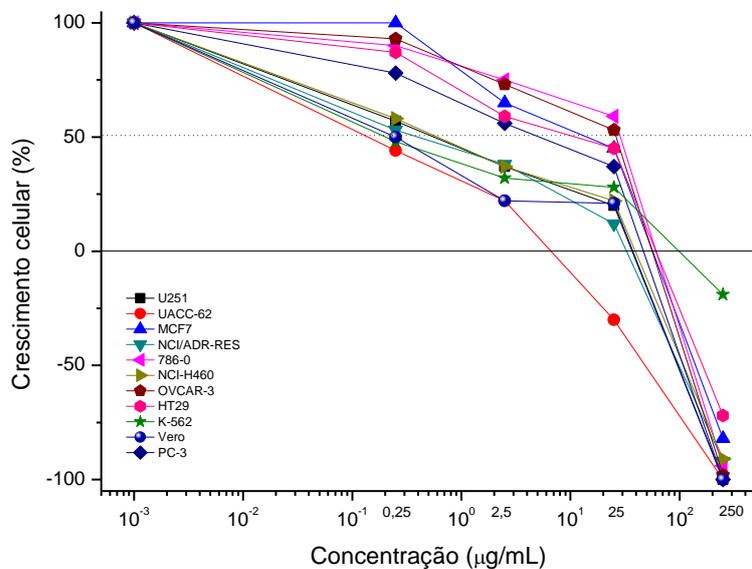


Figura 9 - Atividade antiproliferativa do extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. CML 1765

Tabela 8 – Determinação da inibição parcial e total do crescimento (GI₅₀ e TGI) de linhagens de células tumorais do extrato da fermentação de *Microsphaeropsis* sp. CML 1765.

	<u>U251</u>		<u>UACC-62</u>		<u>MCF-7</u>		<u>NCI-ADR/RES</u>		<u>786-0</u>		<u>NCI-H460</u>		<u>PC-3</u>		<u>OVCAR-3</u>		<u>HT-29</u>		<u>K562</u>	
	GI ₅₀ ^a	TGI ^b																		
DOX ^c	<0.025	0.77	<0.025	0.17	0.078	5.97	0.20	1.53	0.069	4.27	0.012	1.28	0.18	2.18	0.35	5.57	0.19	8.91	<0.025	0.17
1765	0.57	14.1	<0.25	4.0	24.3	48.6	0.46	12.7	26.1	49.1	0.61	15.8	3.1	38.6	25.3	43.2	24.3	49.2	0.36	77.7

^a Concentração que inibe 50% do crescimento de linhagens de células tumorais (GI₅₀ em µg/mL)

^b Concentração que inibe 100% do crescimento de linhagens de células tumorais (TGI em µg/mL) que foram determinadas através da análise de regressão não linear utilizando software Origin 7.5.

^c Doxorubicina (DOX) – controle positivo

2= U251 (glioma, SNC); u = UACC-62 (melanoma); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovário com fenotipo de resistencia a múltiplas drogas); 7 = 786-0 (rim); 4 = NCI-H460 (pulmão, tipo não pequenas células); p = PC-3 (próstata); o = OVCAR-3 (ovário); h = HT-29 (colorretal); k = K562 (leucemia); v = VERO (rim, célula normal, macaco verde

*Inibição total de crescimento celular

O teste antiproliferativo do presente trabalho utilizou como controle positivo a Doxorubicina (DOX), fármaco conhecido por sua atividade antiproliferativa. A DOX liga-se à membrana celular lipídica, inibe a replicação nucleotídica e a ação da DNA e RNA polimerase. Interage com a topoisomerase II formando complexos (atividade citocida), além de alterar as características morfológicas das células.

A Figura 9 mostra o perfil da atividade antiproliferativa do extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. (CML 1765). É possível observar que o extrato tem ação antiproliferativa, de maneira dependente da concentração.

É importante ressaltar que o extrato da fermentação de *Microsphaeropsis* sp. apresentou GI₅₀ (atividade citostática), numa concentração menor que 0,25 µg/mL para as células de melanoma e a maior concentração de extrato que atingiu GI₅₀ (inibição de 50% do crescimento celular) foi na concentração de 26,1 µg/mL para linhagem tumoral humana do rim (786-0).

A análise da concentração necessária para que ocorra inibição total de crescimento celular (TABELA 8) demonstrou que o extrato foi ativo com TGI variando entre 4 e 77 µg/mL, com grande seletividade para a linhagem UACC-62 (melanoma, TGI=4 µg/mL). Já para as linhagens U251 (glioma), NCI-ADR/RES (ovário resistente à múltiplas drogas) e NCI-H460 (pulmão), o extrato apresentou TGI entre 12 e 15 µg/mL. A linhagem menos sensível foi a leucemia (K562, TGI=77,7 µg/mL).

Os resultados obtidos pela análise antiproliferativa do extrato da fermentação de *Microsphaeropsis* sp. foram significativos, principalmente em se tratando de ser um extrato bruto e ainda, altamente seletivo, uma vez que apresentou atividade mais específica sobre a linhagem celular UACC-62 (melanoma). Isto é importante uma vez que substâncias com atividade antiproliferativa e/ou citotóxica são geralmente pouco seletivas, causando danos tanto às células tumorais quanto nas células normais.

O melanoma é um tumor formado por células da pele que tem origem nos melanócitos (células produtoras de melanina) e que sofrem uma transformação e multiplicam-se de maneira desordenada e anormal dando origem à neoplasia. Entre as causas que predispõem ao início desta transformação celular aparece como principal agente a exposição prolongada e repetida à radiação ultravioleta do sol. (http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335).

Os tratamentos para o melanoma podem ser feitos em associação e incluem cirurgia, quimioterapia, terapêutica biológica e radioterapia. Estes tratamentos são designados como tratamentos de suporte, para controle dos sintomas ou cuidados paliativos. Os medicamentos mais utilizados para o tratamento do melanoma são as nitrosuréias (interfere na síntese do DNA) e os triazenos (inibe a síntese do DNA, RNA e síntese protéica) combinados com doxorrubicina (interfere na síntese do DNA e topoisomerasas I e II) (SILVA, 2006).

O extrato da fermentação do *Microsphaeropsis* sp., tem em sua composição química os ácidos graxos e esteróides. Eitsuka et al. (2005) descreveram a atividade antiproliferativa de ácidos graxos principalmente pelo efeito inibitório da telomerase em linhagens de células tumorais de adenocarcinoma colorretal humano (DLD-1). Ácidos graxos apresentaram também redução da incidência de câncer de mama podendo ser utilizado como um suplemento preventivo para este tipo de neoplasia, (ROSE; CONNOLY, 1999) além de ser inibidor do crescimento de células CaCo-2 *in vitro*, mostrando ser dose-dependente e tempo-dependente (HUANG, G. et al., 2007). Além dos ácidos graxos, os esteróides, também possuem atividade antiproliferativa segundo Subbiah e Abplanalp (2003), Slominski et al. (2005) Krzyczkowski et al. (2009), Russo et al. (2010), verificaram que o peróxido de ergosterol apresenta atividade citotóxica contra diferentes linhagens humanas de células tumorais como próstata (DU-145), melanoma (SKMEL-188) e mama, resultados que corroboram com os obtidos neste trabalho. Substâncias isoladas do extrato do *Microsphaeropsis* nomeadas macrosfelídeos apresentaram atividade antiproliferativa contra células leucêmicas humanas (HL60) (SUNAZUKA et al., 2005). A atividade antiproliferativa do extrato fermentado do *Microsphaeropsis* sp. do presente trabalho foi expressiva e merece mais estudos.

A diversidade dos fungos endófitos na natureza é grande e ainda pouco explorada. É possível descobrir compostos com diversas atividades interessantes oriundas de extratos fúngicos, onde o exemplo mais marcante é o taxol. São casos como esse que nos motivam a continuar buscando novos microrganismos capazes de produzir substâncias com atividade biológica.

O fungo *Microsphaeropsis* sp. isolado do cacau produz metabólitos bioativos que necessitam ser pesquisados avaliando outras atividades biológicas, a

identificação dos compostos bioativos no sentido de aprimorar e ampliar o conhecimento sobre este extrato.

5 CONCLUSÃO

Das 37 linhagens de fungos endófitos do cacau (*T. cacao* L.) testadas oito (21,62%) apresentaram halo de inibição contra *S. aureus* e uma (2,70%) apresentou halo de inibição contra *C. albicans*;

O fungo *Microsphaeropsis* sp. foi selecionado para dar continuidade aos testes de atividade antimicrobiana, antioxidante e antiproliferativa;

O extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. atingiu a concentração inibitória mínima nas concentrações de 62,5 a 125 µg/mL contra *S. aureus*;

A concentração bactericida mínima do extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. foi > 1000 µg/mL;

O extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. apresentou atividade antioxidante em concentração acima de 500 µg/mL.

Sobre a atividade antiproliferativa, extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. foi seletivo para a linhagem UACC-62 (melanoma) com TGI=4 µg/mL.

Estes resultados apontam para potencialidade do extrato da fermentação do fungo *Microsphaeropsis* sp. e encorajam a continuidade dos estudos com aprofundamento dos conhecimentos sobre a composição química e sobre os mecanismos de ação envolvidos nas atividades evidenciadas.

REFERÊNCIAS

- ALY, A. et al. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces sp.* Isolates from de medicinal plant *Urospermum picroides*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1716-1725, 2008.
- ARNOLD, A. E. et al. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v.3, p.267-274, 2000.
- ARNOLD, A. E. et al. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 100, p. 15649-15654, 2003.
- BACON, C. W., WHITE, J. F. J. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. **Microbial endophytes**. p. 237–263, 2000.
- BAILEY, A. B.; STREM, D. M.; WOOD, D. Trichoderma species form endophytic association within *Theobroma cacao trichomes*. **Mycological Research**, v. 113, p. 1365-1376, 2009.
- BANDAY, M. R. et al. 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.
- 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.
- BRUNI, R. et al. Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds. **Food Chemistry** (77). p.337-341,2002
- CAFEU, M. C. et al. Substâncias antifúngicas de *Xylaria sp.*, Um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). **Química Nova**, v.28, n. 6, p. 991-995, 2005.
- CASTILLO U. et al. Kakadumicins, novel antibiotics from *Streptomyces sp* NRRL 30556, an endophytic of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 224: p.183–190, 2003.

CARISSE, O.; BERNIER, J. Effect of environmental factors on growth, pycnidial production and spore germination of *Microsphaeropsis* isolates with biocontrol potential against apple scab. **Mycological Research**, v.106 p. 1465-1462, 2002.

CHEN, G. et al. Two new metabolites of a marine endophytic fungus (nº 1893) from an estuarine mangrove on the South China Sea coast. **Tetrahedron**, v.59, p. 4907-4909, 2003.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, M100-S17, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 17th Informational Supplement, **CLSI**, 2007.

COSTA, L. A. **Comunidade de fungos endófitos associados ao cacau em vegetação nativa e sob o sistema de monocultivo**. Fungos endófitos associados ao cacau. 2008. Cap. 2, p. 18-61. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

DAI, J. et al. Metabolic Products of the endophytic fungus *Microsphaeropsis* sp from *Larix decidua*. **European Journal of Organic Chemistry**. p. 4845-4854, 2007.

Disponível em: < <http://www.answers.com/topic/ergosterol> >. Acesso em: 27 de jul. de 2010.

Disponível em: < <http://www.scielo.cl/fbpe/img/bscq/v45n2/img107.jpg> >. Acesso em: 27 de jul. de 2010.

Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=335>. Acesso em: 20 de mai. de 2010.

DUARTE, S. et al. Effect of a Novel Type of Propolis and Its Chemical Fractions on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of Mutans Streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin.**, v.26, p. 527-531, 2003.

EITSUKA, T. et al. Polyunsaturated fatty acids inhibit telomerase activity in DLD-1 human colorectal adenocarcinoma cells: A dual mechanism approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**. v. 1737, p. 1-10, 2005.

EFRAIM, P. **Propriedades Funcionais do Cacau**. In: Workshop sobre Antioxidantes ILSI-BR. Cereal Chocotec-ITAL., São Paulo, 2007.

FERNANDES, M. R. V. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal Pharmaceutical Science** v.45, 2009.

FIRÁKOVÁ, S.; STURDÍKOVÁ, M.; MÚCKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Bratislava**, v. 62/3, p. 251-257, 2007.

FUKAMI, A. et al. A New Anti-influenza Virus Antibiotic, 10- Norparvulenone from *Microsphaeropsis* sp. FO-5050. **The Journal of Antibiotics**. v. 53, p. 1215-1218, 2000.

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

GUIMARAES, D. O., et al. Biological activities from extracts of endophytic fungi isolated from *Viguiera arenaria* and *Tithonia diversifolia*. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 52, p. 134-144, 2008.

HALL, M. et al. *Microsphaeropsis arundinis*: Case report of cutaneous infection. **J. American Academy of Dermatology**, p.2417, 2009.

HARPER, J. K. et al. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, v. 59, n. 14, p. 2471-2476, 2003.

HOLLER, U.; KONIG, G. M.; WRIGHT, A.; D. Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. **Journal of Natural Products**, vol. 62, p. 114-118, 1999.

HORMAZABAL, E.; PIONTELLI, E. Endophytic fungi from Chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 813-819, 2009.

HUANG, Y. et al. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, p. 163-167, 2001.

HUANG, G. et al. Antiproliferative effects of conjugated linoleic acid on human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v.16,p. 432-436, 2007.

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

HUANG, Z. et al. Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. **Phytochemistry**, v. 69, p.1604-1608, 2008.

HUSSAIN, H. et al. Bioactive chemical constituents of two endophytic fungi. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, p. 898-900, 2007.

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.

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

KLUGER et al. Concurrent *Fusarium chlamydosporum* and *Microsphaeropsis arundinis* infection in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 6, p. 271-277, 2004.

KOGEL, K. H.; FRANKEN, P.; HUCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite – what decides? **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 358-363, may 2006.

KROCKENBERGER, B. M. et al. Localised *Microsphaeropsis arundinis* infection of the subcutis of a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.12, p. 231-236, 2010.

KRZYCZKOWSK, W. et al. Isolation and quantitative determination of ergosterol peroxide in various edible mushroom species. **Food Chemistry**, v. 113, p. 351-355, 2009.

KUMAR, S. S. D. et al. In vitro studies of endophytic fungi from *Tripeterygium wilfordii* with anti-proliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 295-300, 2004.

KUSARI, S. et al. An Endophytic Fungus from *Hypericum perforatum* that Produces Hypericin. **Journal Natural Products**, v. 71, p. 159-162, 2008.

LAM, T. Y. K et al. L-755,807, a New Non-peptide Bradykinin Binding Inhibitor from an Endophytic *Microsphaeropsis* sp. **Merck Research Laboratories**, v. 52, p. 1481-1486, 1996.

LI, Y. et al. Anti-helicobacter pylori substances from endophytic fungal cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.553-558, 2005.

LI, Y. C.; TAO, W. Y. Interactions of Taxol-producing endophytic fungus with its host (*Taxus spp.*) during Taxol accumulation. **Cell Biology International**, v.33, p. 106-112, 2009.

LIU, et al. Antifungal activity of *Artemisia annua*, endophyte cultures against phytopathogenic fungi. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 277-282, 2001.

LIU, J. Y. et al. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v.114, p. 279–287, 2004.

LIU, X. et al. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp from *Ginkgo biloba*. **Food Chemistry**, v.105, p. 548-554, 2007.

MAKI, C.S. **Diversidade e Potencial Biotecnológico de Fungos Endofíticos de Cacao (*Theobroma cacao* L.)**. 2006. 128f. Tese (Doutorado em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz ESALQ/USP, Piracicaba, 2006.

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

MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, **Journal of the National Cancer Institute**, v.83, p. 657–661, 1991.

MOMESSO, L. S. et al. Avaliação biológica dos extratos dos fungos endofíticos *Chaetomium globosum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Alternaria* sp. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA (SBQ), **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 21 mai., São Paulo. 2006.

ORTIZ-RIBBING, L.; WILLIAMS II, M.M. Conidial germination and germ tube elongation of *Phomopsis amaranthicola* and *Microsphaeropsis amaranthi* on leaf surfaces of seven *Amaranthus* species: Implications for biological control. **Biological Control**, v.38 p. 356-362, 2006.

PANDI, M.; MANIKANDAN, R.; MUTHUMARY, J. Anticancer activity of fungal taxol derived from *Botryodiplodia theobromae* Pat., and 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.

PARK, J. H. et al. Griseofulvin from *Xylaria* sp. Strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. **Journal Microbiological Biotechnology**, v.15, p. 112–117, 2005.

PENG, X.; CHEN, H. Single cell oil production in solid state fermentation by *Microsphaeropsis* sp from steam-exploded wheat straw mixed with wheat bran. **Bioresource Technology**, v. 99, p.3885-3889, 2008.

PHONGPAICHIT, S. et al. biological activities of extracts from endophytic fungi isolated from *Garcinia* plants. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v.51, p. 517-525, 2007.

QIN, J. et al. Bioactive metabolites produced by *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p. 1572-1574, 2009.

ROSE, D. P.; CONNOLLY, J.M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v.83, p. 217-244, 1999.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.80-84, 2005.

RUBINI, M. R. et al. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, v.1, p.24-33, 2005.

RUKACHAISIRIKUL, V. et al. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp PSU-D15. **Phytochemistry**, v. 69, p. 783-787, 2008.

RUSSO, V. et al. Pro-apoptotic activity of ergosterol peroxide and (22E)-ergosta-7,22-dien-5-hydroxy-3,6-dione in human prostate cancer cells. **Chemico-Biological Interactions**, v.184, p. 352–358, 2010.

SAIKKONEN K. et al. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319–343, 1998.

SAIKKONEN K, et al. Evolution of endophyte–plant symbioses. **Trends in Plant Science**, v.9, p. 275–280, 2004.

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

SILVA, P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 7 ed. ,2006.

SLOMINSKI, A. et al. Enzymatic Metabolism of Ergosterol by Cytochrome P450_{sc} to Biologically Active 17 α ,24-Dihydroxyergosterol. **Chemistry & Biology**, v. 12, 931–939, 2005.

SOUZA, A Q. L. et al. Atividade antimicrobiana de fungos endófitos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **ACTA AMAZONICA**, v.34(2), p. 185-195, 2004.

SPOLADORE, D. S. et al. Composição química de amêndoas fermentadas do cacau. **Revista Científica do Instituto Agrônômico**, v.42, p, 249-253, 1983.

STEINBERG, M. F.; BEARDEN, M. M.; KEEN, L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. **Journal of the American Dietetic Association**, v.103, p. 2, 2003.

STROBEL, G. A. et al. Volatile antimicrobials from *Muscodora albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

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

STROBEL, G. et al. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal Natural Products**, Salt Lake City, v. 67, p. 257-268, 2004.

SUBBIAH, M.T., ABPLANALP, W.. Ergosterol (major sterol of baker's and brewer's yeast extracts) inhibits the growth of human breast cancer cells in vitro and the potential role of its oxidation products. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v.73, p. 19–23, 2003.

SUNAZUKA, T. et al. Absolute stereochemistries and total synthesis of (C)/(K)-macrosphelides, potent, orally bioavailable inhibitors of cell–cell adhesion. **Tetrahedron**, v.61, p. 3789–3803, 2005.

SURYANARAYANAN T. S.; VENKATESAN G. E.; MURALI, T. S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: Diversity and distribution patterns. **Current Science**, v. 885, 2003.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, p. 9-19, 2009.

VIEGAS JR, C. V.; BOLZANI, V. S; BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Natural Moderna. **Química Nova**, vol.29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANG, C. Y. et al. Microsphaerones A and B, Two Novel α -Pyrone Derivatives from the Sponge-Derived Fungus *Microsphaeropsis* sp. **Journal Natural Products**, v. 65, p772-775, 2002.

WEBER, R.W. et al. Brefeldin A production by *Phoma medicaginis* in dead pre-colonized plant tissue: a strategy for habitat conquest? **Mycology Research**, v. 108, p. 662–671, 2004.

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

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, n.3, p.193-200, 2005.

YOGANATHAN, K. et al. Microsphaerins A-D, four novel benzophenone dimers with activity against MRSA from the fungus *Microsphaeropsis* sp. **Tetrahedron**, v.64, p. 10181-10187, 2008.

YU, H. et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. **Microbiological Research**, v. 2006, p. 1-12, 2010.

XU, L. et al. Comparative Research of chemical constituents, antifungal and antitumor properties of ether extracts of *Panax ginseng* and its endophytic fungus. **Phytomedicine**, v. 16, p. 609–616, 2009.

ZAMPIERI, D. et al. **Produção de Sideróforos por Microrganismos Endofíticos do Cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) e o Controle Biológico do Agente Causal da Vassoura de Bruxa *Crinipellis pernicios*** In: XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS, 2005, Caxias do Sul. XIII Encontro de Jovens Pesquisadores da UCS. Caxias do Sul: Gráfica da UCS, 2005.

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