

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Susanne Pedroso Druzian

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE
FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE FUNGOS ISOLADOS DOS BIOMAS
PAMPA E MATA ATLÂNTICA**

Santa Maria, RS
2016

Susanne Pedroso Druzian

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIOXIDANTES A PAR IR DE
FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE FUNGOS ISOLADOS DOS BIOMAS PAMPA E
MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Industriais e Ambientais, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química.**

Orientadora: Prof^a Dr^a. Lisiane de Marsillac Terra

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Raquel Cristine Kuhn

Santa Maria, RS
2016

Susanne Pedroso Druzian

**PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE
FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE FUNGOS ISOLADOS DOS BIOMAS PAMPA E
MATA ATLÂNTICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), Área de Concentração em Desenvolvimento de Processos Industriais e Ambientais, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química.**

Aprovado em 26 de Agosto de 2016:

Lisiane de Marsillac Terra, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Raquel Cristine Kuhn, Dra. (UFSM)
(Coorientadora)

Leila Queiroz Zepka, Dra. (UFSM)

Rosana Goldbeck, Dra. (UNICAMP)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Oneide Pedroso Druzian, por todo incentivo ao estudo, apoio incondicional, imenso amor que sempre me dedicou e, principalmente, por não desistir de mim nos momentos que mais preciso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder saúde e condições que me permitiram chegar até aqui;

Ao meu pai, Gilberto Forgiarini Druzian (*in memoriam*), pelo amor e carinho que me dedicou durante os anos que dividimos juntos e por ter sido minha referência de integridade e honestidade;

À minha orientadora, prof^a Lisiane de Marsillac Terra, pela competência e disponibilidade na orientação de mais este trabalho e pelo exemplo de pessoa e profissional no qual me inspiro;

À minha coorientadora, prof^a Raquel Cristine Kuhn, pela competência, apoio e especial atenção nas revisões e sugestões, oportunizando meu aprendizado e crescimento profissional;

Ao programa de pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de desenvolver este projeto;

Às colegas, Luíza Pinheiro e Nathália Susin, por toda ajuda na realização dos experimentos de laboratório que foi essencial para a conclusão deste trabalho;

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química da UFSM, pela amizade e por proporcionarem um ambiente de pesquisa agradável;

À Valéria Dal Prá, Denise Tonato e Jair Daniel pelos ensinamentos e sugestões que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho;

Aos técnicos Gustavo Ugalde e Mariana Bassaco pela ajuda em etapas importantes do projeto;

Aos colegas da pós-graduação em Engenharia Química e Engenharia Agrícola por tornarem meus dias de mais alegres;

Aos meus familiares Solange Denardi, Volnei Pedroso, Rozani Druzian, Docelina Druzian, Roselaine Druzian, Luis Druzian, Júlia Maria Druzian e Tatiane Druzian por todo amor e apoio tão importantes para mim;

Ao meu padrasto Carlinhos José Bortoluzzi pelas caronas até a universidade e pela amizade;

À amiga de infância Paola Cristine Ferigolo por toda amizade dedicada, confiança compartilhada e ajuda técnica prestada para a conclusão deste trabalho;

Aos amigos Dison Franco, Eric Severo, Jair Daniel e Letícia Cortês por terem tornado essa jornada mais leve e pela grande amizade construída;

À amiga Taynara Andrea Osmari por ter me incentivado a fazer o mestrado;

Aos amigos de longa data Izabel Cristine de Freitas, Leonardo Silveira, Cátia Armany, Lauren Machado e Cristiano Vieira da Costa, por toda incentivo e companheirismo em todos esses anos;

À Capes pelo apoio recebido para a realização deste trabalho.

“O mais importante da vida não é a situação em que estamos, mas a direção para a qual nos movemos.”

(Oliver Holmes)

RESUMO

PRODUÇÃO DE METABÓLITOS ANTIOXIDANTES A PARTIR DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DE FUNGOS ISOLADOS DOS BIOMAS PAMPA E MATA ATLÂNTICA

AUTORA: Susanne Pedroso Druzian
ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Lisiane de Marsillac Terra
COORDENADORA: Prof^ª. Dr^ª. Raquel Cristine Kuhn

Fungos endofíticos se destacam pela produção de compostos com diversas atividades biológicas, como a antioxidante. Compostos antioxidantes desempenham um importante papel na dieta humana, em produtos alimentícios e cosméticos por sua capacidade de prevenir o dano oxidativo ocasionado por espécies reativas de oxigênio. A partir disso, esse trabalho teve como objetivo principal selecionar uma cepa com potencial para a produção de antioxidantes a partir de recursos biológicos dos biomas Pampa e Mata Atlântica e otimizar o processo de fermentação submersa para uma maior produção dos compostos. Para isto, foram isolados 53 fungos endofíticos a partir de plantas, sendo avaliados o sobrenadante da fermentação quanto a sua atividade antioxidante frente aos radicais DPPH, superóxido e hidroxil. O fungo que apresentou maior potencial para a produção de compostos antioxidantes, dentro das condições estudadas, foi identificado molecularmente como *Botryosphaeria dothidea*. A qualificação dos compostos presentes no sobrenadante apontou a presença dos compostos hexahidro-3-pirrolizina, éster bis-2(metil-propil) do ácido 1,2-benzenodicarboxílico e 3,6-di-isobutil-2,5-piperazinodiona. A partir dos resultados obtidos da etapa de *screening*, foi delineado um planejamento experimental do tipo Plackett Burman, onde foram avaliadas as variáveis concentração de glicose (10-20 g.L⁻¹), concentração de extrato de levedura (5-10 g.L⁻¹), concentração de peptona (8-12 g.L⁻¹), pH (4,5-6,5), temperatura (20-30°C) e agitação (80-160 rpm) sobre a inibição dos radicais DPPH, superóxido e hidroxil. Os fatores que apresentaram efeito significativo (concentração de glicose e concentração de peptona) foram otimizados a partir de um delineamento composto central rotacional. O maior valor de inibição do radical DPPH foi 95,35%, empregando-se 33 g.L⁻¹ de glicose e 14 g.L⁻¹ de peptona. Utilizando-se 51 g.L⁻¹ de glicose e 14 g.L⁻¹ de peptona, obteve-se 95,08% de inibição do superóxido, e 89,2% de inibição do hidroxil, com 20,23 e 18,26 g.L⁻¹ de glicose e peptona, respectivamente. Estes resultados indicam o grande potencial deste fungo como produtor de metabólitos antioxidantes por via fermentativa.

Palavras-chave: Seleção de fungos. *Botryosphaeria dothidea*. Antioxidantes. Fermentação submersa.

ABSTRACT

PRODUCTION OF ANTIOXIDANTS METABOLITES FROM SUBMERGED FERMENTATION OF FUNGI ISOLATED FROM THE PAMPA E ATLANTIC FOREST BIOMES

AUTHOR: Susanne Pedroso Druzian
ADVISOR: Prof^ª. Dr^ª. Lisiane de Marsillac Terra
CO-ADVISOR: Prof^ª. Dr^ª. Raquel Cristine Kuhn

Endophytic fungi stands out for the production of compounds with diverse biological activities like antioxidant. Antioxidant compounds play an important role in the human diet, in food and cosmetic products for its ability to prevent oxidative damage caused by reactive oxygen species. From this, this work aimed to select a strain with potential for the production of antioxidants from biological resources of the biomes Pampa and Atlantic Forest and optimize the submerged fermentation process for it increases the production of the compounds. For this, it was isolated 53 endophytic fungi from plants and evaluated the supernatant of fermentation for antioxidant activity against the DPPH radical, superoxide and hydroxyl. The fungus that showed the greatest potential for the production of antioxidant compounds within the conditions studied was identified molecularly as *Botryosphaeria dothidea*. The qualification of the compounds presents in the supernatant showed the presence of hexahydropyrrolizin-3-one, 1,2-benzenedicarboxylic acid bis(2-methylpropyl) ester and 3,6-bis(2-methylpropyl)-2,5-piperazinedione. From the results obtained from the screening stage, it was design an experimental planning Plackett Burman, where it was evaluated the variables glucose concentration (10-20 g L⁻¹), yeast extract concentration (5-10 g L⁻¹), peptone concentration (8-12 gL⁻¹), pH (4,5-6,5), temperature (20-30°C) and agitation (80-160 rpm) on inhibition of DPPH, superoxide and hydroxyl radicals. The factors that showed significant effects (concentration of glucose and peptone concentration) were optimized from a central composite rotational design. The greatest amount of inhibition of DPPH was 95.35%, using 33 g.L⁻¹ of glucose and 14 g.L⁻¹ of peptone. Using 51 g.L⁻¹ of glucose and 14 g.L⁻¹ of peptone, there was obtained 95.08% inhibition of superoxide, and inhibition of 89.2% hydroxyl with 20.23 and 18.26 g.L⁻¹ of glucose and peptone, respectively. These results indicate the great potential of this fungus as a producer of antioxidants metabolites by fermentation.

Keyword: screening of fungi. *Botryosphaeria dothidea*. Antioxidants. Submerged Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1 – Representação cartográfica dos biomas presente no estado do RS..... 19
Figura 2 – Doenças associadas ao estresse oxidativo..... 25

ARTIGO 1

- Figura 1 – Porcentagem de inibição do radical DPPH das 53 cepas isoladas. 37
Figura 2 – Fungo *Botryosphaeria dothidea* cultivado em meio batata dextrose ágar. 40
Figura 3 – Porcentagem de inibição frente a diferentes concentrações de sobrenadante. 41
Figura 4 – Porcentagem de inibição frente a diferentes concentrações de ácido ascórbico. 42

ARTIGO 2

- Figura 1 – Efeitos estimados das variáveis independentes na inibição do radical DPPH. 54
Figura 2 – Efeitos estimados das variáveis independentes na inibição do radical superóxido. 55
Figura 3 – Efeitos estimados das variáveis independentes na inibição do radical hidroxil. 56
Figura 4 – Superfície de contorno da inibição do radical hidroxil em função da concentração de glicose (g.L^{-1}) e concentração de peptona (g.L^{-1}). 59
Figura 5 – Superfície de resposta da inibição do radical hidroxil em função da concentração de glicose (g.L^{-1}) e concentração de peptona (g.L^{-1}). 60

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos.....	23
Tabela 2 – Espécies reativas de oxigênio.	26

ARTIGO 1

Tabela 1 – Porcentagem de inibição do radical DPPH pelos fungos isolados.	38
Tabela 2 – Porcentagem inibitória dos radicais superóxido (%) e hidroxil (%).	39
Tabela 3 – Identificação dos compostos presentes na fração orgânica resultante da extração líquido-líquido do sobrenadante produzido pelo fungo <i>Botryosphaeria dothidea</i>	43

ARTIGO 2

Tabela 1 – Níveis reais e codificados do DCCR.	50
Tabela 2 – Matriz experimental de Plackett Burman para avaliar a influência do meio de cultura e das condições de processo na inibição dos radicais DPPH, superóxido e hidroxil. ...	53
Tabela 3 – Variáveis independentes do DCCR e respectivos valores de inibição dos radicais DPPH, superóxido e hidroxil como respostas.	57
Tabela 4 – ANOVA para a porcentagem de inibição do radical hidroxil.	58

ANEXO A

Tabela 1 – Localidade, espécie, nome popular e família botânica das plantas e seus respectivos fungos isolados avaliados quanto à produção de compostos antioxidantes.	74
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
TBA	ácido tiobarbitúrico
TCA	ácido tricloroacético
ANOVA	análise de variância
R^2	coeficiente de determinação
IC ₅₀	concentração inibitória média
DCCR	delineamento composto central rotacional
ERO	espécies reativas de oxigênio
F _{cal}	F de Fisher-Snedecor calculado
F _{tab}	F de Fisher-Snedecor tabelado
SSF	fermentação em estado sólido
SmF	fermentação submersa
GPx	glutathiona-peroxidase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
NBT	nitroazul de tetrazólio
PB	Plackett Burman
AA _{DPPH}	porcentagem de inibição do radical DPPH
AA _{OH}	porcentagem de inibição do radical hidroxil
AA _{O2}	porcentagem de inibição do radical superóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidrazila

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	BIOMAS PAMPA E MATA ATLÂNTICA	19
3.2	FUNGOS	20
3.2.1	Fungos Endofíticos	21
3.2.2	Fermentação	21
3.2.3	Metabolismo dos fungos	22
3.2.4	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	23
3.3	ESTRESSE OXIDATIVO	24
3.4	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	25
3.4.1	Radicais Livres	27
3.5	SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE	27
3.5.1	Defesas Antioxidantes Enzimáticas	28
3.5.1.1	<i>Superóxido dismutase</i>	29
3.5.1.2	<i>Catalase</i>	29
3.5.1.3	<i>Glutathiona-peroxidase</i>	29
3.5.1.4	<i>Glutathiona-reductase</i>	29
3.5.2	Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas	30
4	ARTIGO 1	31
4.1	INTRODUÇÃO.....	31
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.2.1	Seleção e isolamento dos fungos	32
4.2.2	Fermentação submersa	32
4.2.3	Atividade antioxidante	33
4.2.3.1	<i>Capacidade sequestradora do radical DPPH</i>	33
4.2.3.2	<i>Capacidade sequestradora do radical superóxido (O_2^-)</i>	34
4.2.3.3	<i>Capacidade sequestradora do radical hidroxil (OH)</i>	34
4.2.4	Identificação do micro-organismo	35
4.2.5	Extração	36
4.2.6	Análise cromatográfica (GC-MS)	36
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
4.3.1	Screening	36
4.3.2	Atividade antioxidante	40
4.3.3	Identificação dos compostos	42
4.4	CONCLUSÃO.....	44
4.5	REFERÊNCIAS	44
5	ARTIGO 2	48
5.1	INTRODUÇÃO.....	48
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	49
5.2.1	Micro-organismo	49
5.2.2	Fermentação submersa	49
5.2.3	Planejamento experimental Plackett Burman	50
5.2.4	Delineamento composto central rotacional	50
5.2.5	Atividade antioxidante	50
5.2.5.1	<i>Capacidade sequestradora do radical DPPH</i>	50
5.2.5.2	<i>Capacidade sequestradora do radical Superóxido (O_2^-)</i>	51

5.2.5.3	<i>Capacidade sequestradora do radical Hidroxil (OH)</i>	52
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.3.1	Planejamento Plackett Burman	52
5.3.2	Delineamento composto central rotacional	56
5.4	CONCLUSÃO.....	61
5.5	REFERÊNCIAS	61
6	DISCUSSÃO	64
7	CONCLUSÃO	65
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	66
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXO A	74

1 INTRODUÇÃO

A biodiversidade possui grande valor científico e é uma potencial fonte de uso econômico. Entre os países com complexas heterogeneidades, o Brasil é considerado um dos mais importantes do planeta, pois é detentor de uma grande variedade biológica e conta com alguns dos biomas mais ricos em espécies vegetais. Contudo, essa biodiversidade é ainda pouco conhecida, sendo fundamental o aumento de pesquisas na busca de melhor aproveitamento deste imenso patrimônio natural (CORADIN et al., 2011).

O Rio Grande do Sul é constituído por dois biomas: a Mata Atlântica e o Pampa, representado cerca de 37 e 63% do território, respectivamente (IBGE, 2004), sendo este último localizado exclusivamente neste estado, dentro do território nacional. As regiões de transição entre estes biomas e as zonas biogeográficas distintas resultam em um ecossistema diversificado, com espécies de diferentes centros de origem e um número considerável de endemismos (GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, 2008). Ademais, destaca-se por apresentar um número elevado de espécies de micro-organismos (FORZZA, 2010), que atualmente ainda são pouco exploradas e que poderiam ser utilizadas no desenvolvimento de novos produtos e processos.

Micro-organismos e plantas cultiváveis são as principais fontes de moléculas bioativas e terapeuticamente úteis (SANTOS, 2012), sendo responsáveis pela produção de diversos compostos, como antitumorais e antibióticos, entre outros (BÉRDY, 2005; OLANO et al., 2011). Historicamente compostos químicos produzidos por esses seres vivos têm sido usados para o tratamento de doenças, sendo que mais de 60% das drogas presentes no mercado são de origem natural (MOLINARI, 2009). Os endofíticos correspondem a uma fonte de produtos naturais inovadores e bioativos com um número significativo de substâncias descritas, sendo que várias dessas estruturas apresentam alguma atividade biológica (SCHULZ et al., 2002; CHAPLA et al., 2013). Esse tipo de fungo tem a capacidade de produzir diversos compostos de relevância biotecnológica e o recente número de artigos que têm surgido na literatura evidenciam o interesse nesses produtos.

Fármacos com importantes papéis no tratamento de doenças humanas têm sido descobertos a partir de triagem de fontes naturais na busca de agentes farmacologicamente ativos (CRAGG et al., 1997; NOGUEIRA, 2012; SHU, 1998). Quando a fonte natural corresponde a um micro-organismo, a seleção de uma cepa apropriada para a produção do composto de interesse corresponde a uma etapa crucial do processo. Nesse caso, o *screening* vem sendo muito utilizado na busca de cepas com potencial para a produção de determinado

produto. Portanto, o isolamento e seleção de micro-organismos potencialmente produtores de moléculas bioativas a partir de recursos biológicos dos biomas Pampa e Mata Atlântica se mostra estrategicamente muito interessante, dado o potencial da grande biodiversidade dessas regiões.

Entre estas moléculas bioativas, surgem os antioxidantes que vêm despertando grande interesse em função de sua atuação sobre os radicais livres do organismo (DELMONDES et al., 2013; REZENDE, 2010), que causam o aumento do estresse oxidativo e têm sido associados a diversas condições fisiológicas e patológicas, como envelhecimento, câncer, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, diabetes, entre outras (PREISER, 2012). Este estresse oxidativo corresponde à formação em excesso e/ou a insuficiente remoção de espécies reativas derivadas do oxigênio, ou seja, decorre de um desequilíbrio entre a formação de oxidantes e a atuação das defesas antioxidantes (PREISER, 2012; BARBOSA et al., 2010; BIESEK et al., 2015; BRITO et al., 2007; SIES, 1993). Os organismos vivos estão frequentemente sujeitos à ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e seus danos oxidativos incluem danos a qualquer molécula biológica, podendo ser proteínas, lipídios ou DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

Antioxidantes são substâncias que têm a capacidade de retardar ou inibir a ação de um oxidante sobre um substrato, mesmo quando em baixas concentrações (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; DOLINSKY, 2009; BIANCHI e ANTUNES, 1999). Sua função no organismo corresponde em inibir e/ou reduzir os danos causados por espécies reativas, como os radicais livres (FULLER, 2016; KOURY e DONANGELO, 2003). O excesso dessas espécies no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo próprio organismo ou absorvidos de fontes exógenas (REZENDE, 2010), e a inclusão desses compostos na dieta é de grande importância na tentativa de diminuir os riscos de desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (VASCONCELOS et al., 2014).

Diversos trabalhos na literatura reportam a utilização de fungos endofíticos na produção de diferentes compostos bioativos com atividades farmacológicas proeminentes, como a antioxidante, sendo produzidos compostos como ácido cajainestilbeno, luteolina e palmarumicina C3, que apresentam notáveis atividades antioxidantes (ZHAO et al., 2012a; MOU et al., 2013; ZHAO et al., 2014). Logo, esses micro-organismos correspondem a promissoras fontes de metabólitos secundários com atividade antioxidante (SILVA, 2014b).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo geral selecionar uma cepa, a partir de recursos biológicos dos biomas Pampa e Mata Atlântica, visando a produção, por fermentação submersa, de compostos com atividade antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

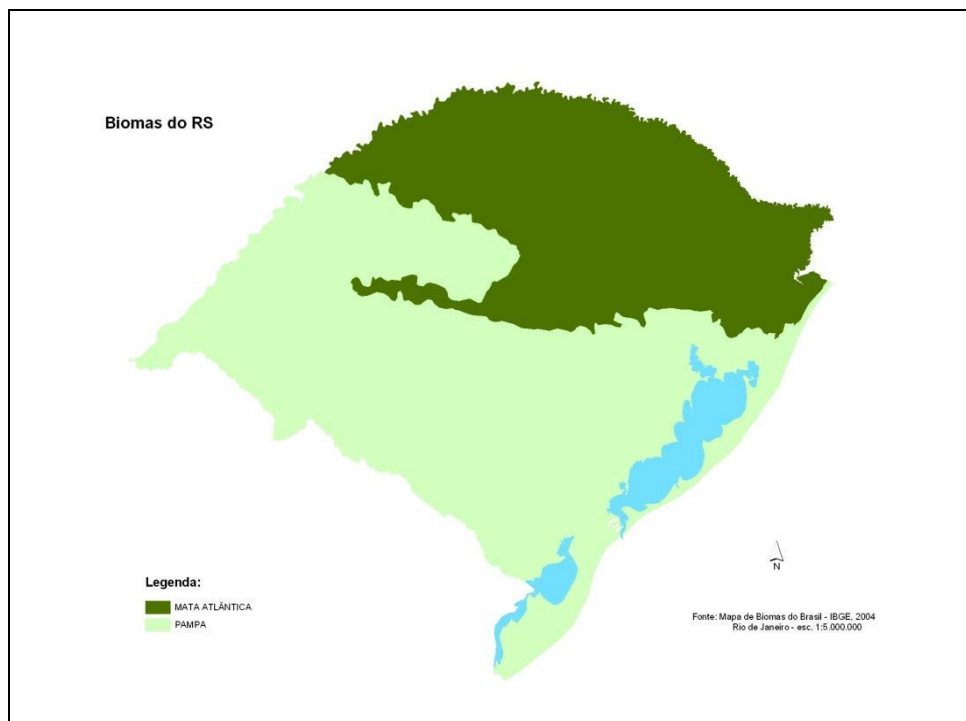
- Isolar fungos endofíticos a partir de recursos biológicos dos biomas Pampa e Mata Atlântica;
- Selecionar um fungo endofítico com potencial para a produção de compostos antioxidantes através de processo fermentativo, avaliando a atividade antioxidante do caldo de fermentação produzido frente aos radicais DPPH, superóxido e hidroxil;
- Identificar molecularmente o fungo com maior potencial para a produção de compostos antioxidantes;
- Identificar os compostos presentes no caldo de fermentação através de análise cromatográfica;
- Avaliar os efeitos da composição do meio e condições do processo fermentativo sobre a produção de compostos antioxidantes;
- Otimizar as condições da fermentação submersa para a produção de compostos antioxidantes.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOMAS PAMPA E MATA ATLÂNTICA

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2004), bioma corresponde a “*um conjunto de vida (vegetal e animal) constituído pelo agrupamento de tipos de vegetação contíguos e identificáveis em escala regional, com condições geoclimáticas similares e história compartilhada de mudanças*”. O Brasil é constituído de 6 diferentes biomas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica e Pampa. O estado do Rio Grande do Sul é dividido entre os biomas Pampa e Mata Atlântica, que ocupam 63 e 37% da área do estado, respectivamente (IBF, 2016), e sua representação cartográfica pode ser verificada na Figura 1.

Figura 1 – Representação cartográfica dos biomas presente no estado do RS.



Fonte: IBGE 2004.

O bioma Pampa compreende a uma área de 176,5 mil km², ocupando territórios do Brasil, Argentina e Uruguai. Este bioma também é conhecido pelos nomes de Campos Sulinos ou Campos do Sul, e é constituído, em sua grande maioria, por vegetação campestre (IBF, 2016). Campos nativos são predominantes nas paisagens naturais desse bioma, que

também são compostas por matas de encosta, matas ciliares, formações arbustivas, entre outras. Por apresentar um conjunto de ecossistemas muito antigos, o bioma Pampa apresenta grande biodiversidade, que ainda não foi totalmente descrita pela ciência. Segundo estimativas, sua flora conta com aproximadamente 3000 espécies de plantas, e sua fauna com quase 500 espécies de aves e 100 espécies de mamíferos terrestres (MMA, 2016). Os micro-organismos presentes no solo do bioma Pampa interagem de forma a contribuir com o equilíbrio dos agrossistemas, desenvolvendo um importante papel nos ciclos da comunidade deste bioma (KÖNIG et al., 2014).

O bioma Mata Atlântica ocupa inteiramente os estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Santa Catarina, 98% do Paraná e porções de mais 11 estados da federação (IBGE, 2004). Este bioma corresponde ao ecossistema que mais foi deteriorado com os impactos ambientais dos ciclos econômicos da história do país. Originalmente ocupava uma área que se estendia do Ceará ao Rio Grande do Sul, porém em função dos impactos ambientais sofridos teve sua área reduzida a apenas 7% da área original (IBF, 2016). Em termos de diversidade biológica, a Mata Atlântica representa um dos conjuntos de ecossistemas mais ricos do planeta (BRASIL, 2003). Apesar disso, ainda são escassos os trabalhos com relação a diversidade de fungos filamentosos, suas distribuições geográficas e interações ecológicas em áreas da Mata Atlântica (CAVALCANTI e MILAZES, 2007).

3.2 FUNGOS

Os fungos são organismos eucarióticos heterotróficos de grande diversidade ecológica, fisiológica e morfológica. São descritas no mundo aproximadamente 98 mil espécies distintas de fungos, apesar de um levantamento estimar que existam cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas (TORTORA et al., 2012; SADAVA et al., 2009; AZUL, 2010; KIRK et al., 2008). Podem ser encontrados em diversos habitats como solo, ar e água, ou mantendo relações de competição, parasitismo, comensalismo ou mutualismo com outros seres do ecossistema (HÖFLING e GONÇALVES, 2016; TRIGIANO et al., 2011). Por não produzirem clorofila, a associação de fungos com outros seres vivos é, em alguns casos, necessária para a sua sobrevivência (HÖFLING e GONÇALVES, 2016). Esses micro-organismos são, em sua grande maioria, seres aeróbios, porém alguns podem ser anaeróbios facultativos (JORGE, 2012).

3.2.1 Fungos Endofíticos

Os fungos são classificados como endofíticos quando colonizam e se desenvolvem no interior de tecidos de uma planta hospedeira sem causar sintomas aparentes de doença por pelo menos uma parte do seu ciclo de vida (SATYANARAYANA et al., 2012). Esses fungos diferem-se dos epifíticos, que habitam a superfície dos órgãos e tecidos das plantas, e dos fitopatógenos, que são causadores de enfermidades nas plantas, apesar de muitas vezes ocorrer a sobreposição entre esses grupos (AZEVEDO, 1998). Primeiramente o termo endofítico foi utilizado para designar fungos que viviam no interior das plantas, sem distinção dos fitopatógenos (SATYANARAYANA et al., 2012). Porém, o termo pode ser empregado para fungos que podem ser encontrados em plantas aparentemente sem enfermidades em um determinado momento, não levando em consideração o futuro status da interação entre a planta e o micro-organismo. Supõe-se que essa interação seja equilibrada entre o poder de virulência do fungo e a defesa da planta, sendo que uma diminuição na defesa da planta possa gerar um aumento na virulência do fungo (SCHULZ e BOYLE, 2005).

Os fungos endofíticos podem produzir uma vasta quantidade de compostos orgânicos devido ao seu metabolismo secundário particularmente ativo consequente da sua interação metabólica com a planta hospedeira. Isso faz com que esses fungos sejam considerados fontes em potencial de novos compostos bioativos de interesse para diferentes indústrias (STROBEL e DAISY, 2003). Esses compostos químicos produzidos favorecem a adaptação da planta perante condições não favoráveis (NASCIMENTO, 2006).

3.2.2 Fermentação

O cultivo de micro-organismos corresponde ao favorecimento do crescimento das populações através da garantia de suas funções vitais por meio de condições adequadas. Quando ocorre na presença de oxigênio, o cultivo é denominado “respiração”, enquanto na ausência de oxigênio, denomina-se “fermentação”. Porém, como ambos os processos correspondem à oxidação do substrato, onde o oxigênio molecular pode ser ou não o receptor final dos íons hidrogênio, o termo “fermentação” pode ser utilizado para ambos os cultivos aeróbios ou anaeróbios (HISS, 2013).

O processo de fermentação consiste em converter substratos complexos em compostos simples pela ação de micro-organismos. Os micro-organismos envolvidos em processos fermentativos são fungos, leveduras e bactérias, e os compostos produzidos são altamente benéficos a indivíduos e indústria (BARRAGÁN et al., 2016). A produção de metabólitos

secundários por processo fermentativo depende das condições de fermentação e da capacidade do micro-organismo de sintetizar as moléculas. A manipulação dos parâmetros do processo fermentativo pode estimular a produção de diversos metabólitos secundários. Meios de cultura com diferentes componentes promovem a produção de diferentes metabólitos, e outros parâmetros do processo fermentativo, como temperatura e pH, também podem influenciar nos rendimentos desse processo. (YARBROUGH et al., 1993).

Na fermentação submersa (SmF) os micro-organismos e substratos estão submersos no meio líquido, diferentemente do processo de fermentação em estado sólido (SSF), no qual os micro-organismos crescem em uma superfície sólida com umidade limitada. Esse processo apresenta muitas vantagens quando comparada à fermentação em estado sólido como, por exemplo, melhor transferência de calor e massa, maior facilidade no aumento de escala e mais fácil controle das reações (RAO, 2010; BAILEY et al., 2009).

O cultivo submerso provém vários produtos biológicos de grande utilidade nas indústrias química, alimentícia e farmacêutica. Quando se trata do cultivo em meio líquido de fungos filamentosos, este pode ser realizado em frascos agitados ou reatores *Stirred-Tank*. Apesar do cultivo em reatores permitir melhor controle e monitoramento do estado fisiológico das culturas, o cultivo submerso em frascos agitados ainda é muito utilizado por apresentar vantagens como menor custo de investimento e menor complexidade experimental (NITSCHKE e MEYER, 2014).

3.2.3 Metabolismo dos fungos

Os micro-organismos na fermentação industrial produzem uma série de metabólitos divididos em primários e secundários. Classificam-se como metabólitos primários aqueles os quais sua curva de produção acompanha a curva de crescimento celular, enquanto os metabólitos secundários só começam a ser produzidos quando o micro-organismo entra na fase estacionária do ciclo de crescimento (TORTORA et al., 2012). Os metabólitos secundários derivados de plantas desempenharam um papel muito importante na medicina e agricultura no último século. Contudo, devido a certas limitações na obtenção de novos metabólitos derivados de plantas, os fungos endofíticos vêm sendo considerados uma fonte inesgotável de novos metabólitos secundários (CHANDRA, 2012).

Abordagens inovadoras na busca por metabólitos secundários são necessárias para aumentar as chances de descoberta de compostos bioativos, uma vez que a redescoberta de metabólitos secundários tem se tornado um problema na química dos produtos naturais

(HERTWECK, 2009; ZERIKLY e CHALLIS, 2009). Na Tabela 1 são apresentados alguns metabólitos secundários produzidos por fungos que apresentam atividade biológica.

Tabela 1 – Metabólitos secundários bioativos produzidos por fungos.

Fungo	Metabólito Secundário	Atividade biológica	Fonte
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina	Antibacteriana	TORTORA, 2012
<i>Fusarium proliferatum</i>	Ácido Cajainestilbeno	Antioxidante	ZHAO et al., 2012a
<i>Berkleasmium sp.</i>	Palmarumicina C3	Antioxidante	MOU et al., 2013
<i>Aspergillus fumigates</i>	Luteolina	Antioxidante	ZHAO et al., 2014
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Altenusin; Djalonensone	Antioxidante	XIAO et al., 2014
<i>Penicillium sp.</i>	Adenina; Adenosina; Desoxiadenosina	Antioxidante	YUAN et al., 2014
<i>Fusarium oxysporum</i>	Beauvericina	Anticancerígena	WANG et al., 2011
<i>Stemphylium globuliferum</i>	Altersolanol A	Anticancerígena	TEITEN et al., 2013
<i>Talaromyces flavus</i>	Talaperoxide B e D	Anticancerígena	LI et al., 2011
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Taxol	Anticancerígena	PANDI et al., 2011
<i>Hyalodendriella sp.</i>	botrallin	Antimicrobiana	ZHONG et al., 2011
<i>Chaetomium globosum</i>	flavipina	Antifúngica	XIAO et al., (2013)
<i>Gliomastix murorum</i>	ergosta-5,7,22-trien-3-ol; 2,3-dihidro-5-hidroxi-alfa,alfa-dimetil-2 benzofuranmetanol	Antimicrobiana	ZHAO et al., (2012b)

Fonte: A autora.

3.2.4 *Botryosphaeria dothidea*

O gênero *Botryosphaeria* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Dothideomycetes, ordem Botryosphaeriales e família Botryosphaeriaceae (LIU, 2011). Espécies pertencentes à família Botryosphaeriaceae englobam uma gama de fungos patógenos, endofíticos e sapróbios, que podem ser encontrados em quase todas as regiões globais, e tem despertado grande interesse devido sua patogenicidade em plantas (PHILLIPS,

et al, 2013). São considerados importantes patógenos em várias espécies de plantas lenhosas e não-lenhosas (GONÇALVES et al., 2016).

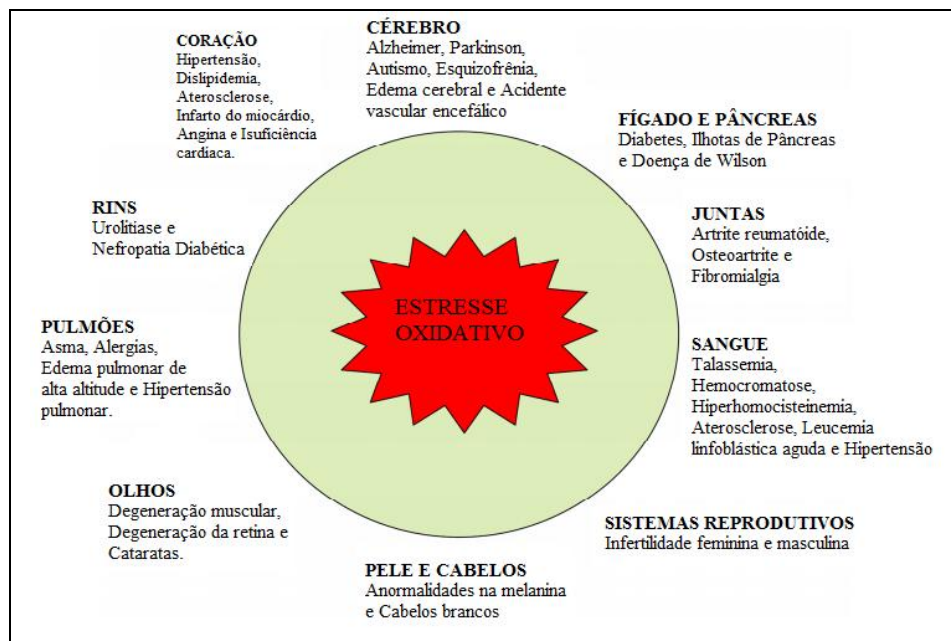
A espécie *Botryosphaeria dothidea* é considerada um importante patógeno causador de diversas doenças em plantas, entre elas cancro, morte de haste e podridão de frutos (WANG et al., 2014). Xiao et al. (2014) estudou as atividades antifúngica, antibacteriana, antioxidante e citotóxica dos metabólitos secundários produzidos por fermentação em estado sólido pelo fungo *Botryosphaeria dothidea*, isolado da planta *Melia azedarach*. A partir de sua fermentação, foram identificados 18 compostos diferentes, sendo dois metabólitos e um produto natural não identificados anteriormente. Os metabólitos altenuene e djalonensone apresentaram marcante atividade sequestradora do radical DPPH, com valores de IC₅₀ de 17,6 e 18,7 µM, respectivamente.

3.3 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio molecular (O₂), que é essencial para a vida dos organismos aeróbios (BAYNES e DOMINICZAK, 2015), pode ser potencialmente prejudicial e faz com que os sistemas biológicos estejam constantemente sob o ataque oxidativo de espécies reativas de oxigênio. Essas espécies são formadas continuamente como subproduto do metabolismo e têm sido implicadas em uma série de processos patológicos, como danos ao DNA, proteínas, lipídeos e morte celular. Assim um organismo aeróbico apenas sobrevive à toxicidade do oxigênio devido a suas defesas antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

O desequilíbrio nos níveis de espécies reativas de oxigênio e atividade dos mecanismos antioxidantes, em favor da produção excessiva dessas espécies, provoca uma condição denominada estresse oxidativo (PREISER, 2012; RAHMAN et al., 2012). Altos níveis de estresse oxidativo vêm sendo associados com um elevado número de condições fisiológicas e patológicas (PREISER, 2012). Pesquisas científicas recentes apontam relações entre essa condição e a progressão de grandes problemas de saúde em seres humanos, o que conduz a diversas doenças como câncer, Mal de Alzheimer, Mal de Parkinson, entre outras (Figura 2) (RAHMAN et al., 2012).

Figura 2– Doenças associadas ao estresse oxidativo.



Fonte: RAHMAN, 2012.

3.4 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O oxigênio (O_2) é um elemento imprescindível para a existência de organismos aeróbios. Embora na maioria das vezes seja apresentado como uma molécula diatômica com duas ligações entre os átomos sabe-se que à temperatura corporal, o O_2 é birradicalar com dois elétrons desemparelhados. Em torno de 90% do O_2 que é consumido na cadeia respiratória pelo organismo humano, é utilizado na fosforilação oxidante, enquanto os 10% são consumidos nas reações de hidroxilação e oxigenação. Porém uma fração residual, menor que 1%, gera substâncias químicas chamadas de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, embora desempenhem um papel na regulação do metabolismo e nas defesas imunológicas, causam dano crônico para as biomoléculas dos tecidos (BAYNES e DOMINICZAK, 2015).

Espécie reativa de oxigênio é o termo utilizado para dar nome aos radicais livres derivados do oxigênio molecular e às espécies que também derivam do oxigênio molecular, porém não são radicais livres. Essas espécies são popularmente conhecidas pelo termo oxidantes (HALLIWELL, 1997). As principais espécies reativas de oxigênio são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Espécies reativas de oxigênio.

Radical livre	Não Radical livre
Superóxido, O ₂ ^{•-}	Peróxido de hidrogênio, H ₂ O ₂
Hidroxil, OH [•]	Ácido hipocloroso, HClO
Peroxil, RO ₂ [•]	Ácido Hipobromoso, HBrO
Alcoxil, RO [•]	Ozônio, O ₃
Hidroperoxil, HO ₂ [•]	Oxigênio singlet, ¹ Δg

Fonte: HALLIWELL, 1997.

As principais espécies reativas de oxigênio são o radical superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxil (OH[•]) e oxigênio singlet (O₂¹) (GARCEZ et al., 2004). O radical superóxido é formado quando a molécula de O₂ recebe um único elétron, ficando com um elétron desemparelhado. Esta espécie pode se formar por diversas vias e experiências *in vitro* mostraram que pode causar danos a algumas biomoléculas. Em meio aquoso, o superóxido pode reagir formando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por uma reação conhecida por “dismutação”. Esta espécie, apesar de não ser considerada um radical, causa muitos danos às células pela sua facilidade de penetração nestas. A formação do peróxido de hidrogênio se dá de acordo com a Equação 1.



Na presença de formas reduzidas de certos metais, como ferro (II) e cobre (I), o peróxido de hidrogênio se decompõe formando o radical livre hidroxil (OH[•]). O radical hidroxil (OH[•]) é altamente reativo e tem capacidade de danificar o DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985). As Equações 2 e 3 demonstram o peróxido de hidrogênio sendo decomposto em radical hidroxil e íon hidroxil.



O oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$) é a forma excitada do oxigênio molecular. O estado triplet corresponde ao estado em que as moléculas possuem os pares mais externos de elétrons em rotação paralela, e o estado *singlet* corresponde ao estado em que as moléculas possuem os pares mais externos de elétrons em rotação antiparalela. Quando o oxigênio está no estado triplet e absorve energia suficiente para reverter a rotação de um dos elétrons não pareados, a molécula passa para um estado excitado e se torna altamente reativa (LOPES e SIQUEIRA, 2015). Essa ERO é uma espécie reativa que pode ser formada por fagócitos ou indução luminosa, entre outras formas, e tem a capacidade de modificar o DNA diretamente e causar danos às proteínas devido a oxidação de grupos essenciais de aminoácidos. Essa espécie também é responsável pela formação dos radicais alcoxila ($\text{RO}\cdot$) e peroxila ($\text{ROO}\cdot$), pois dá início à peroxidação lipídica (GARCEZ et al., 2004).

3.4.1 Radicais Livres

HALLIWELL e GUTTERIDGE (2015) definiram radicais livres como “qualquer espécie capaz de existir de forma independente que contenha um ou mais elétrons desemparelhados”. Os radicais livres são formados quando o oxigênio reage com compostos do organismo, e isso é um processo natural do corpo. Porém fatores ambientais como, por exemplo, radiação, tabagismo e poluição também podem contribuir para a formação destes radicais (SIZER e WHITNEY, 2004). O fato de possuírem elétrons desemparelhados pode lhes conferir uma alta reatividade, apesar de existir uma grande variedade na reatividade química desses radicais (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

A ação dos radicais livres vem sendo muito estudada em função da sua associação com inúmeras doenças como câncer, aterosclerose, envelhecimento, entre outras (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Esses radicais são criados dentro das células por absorção de energia radiante, metabolismo enzimático de substâncias químicas exógenas, reações de redução-oxidação que ocorrem em processos metabólicos normais e reações catalisadas por metais de transição. Mediadores químicos, como o óxido nítrico, também podem atuar como radicais livres e serem convertidos em ânions altamente reativos (KUMAR et al., 2010).

3.5 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

A definição de um antioxidante é “qualquer substância que, quando presente a baixas concentrações comparadas a do substrato oxidável, atrasa ou previne significativamente a oxidação desse substrato” (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989). Estes compostos têm a

capacidade de interceptar os radicais livres, produzidos pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, e inibir a ação desses radicais em lipídeos, proteínas, ácidos graxos poli-insaturados e bases de DNA, contendo a lesão e perda de integridade celular (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Antioxidantes também podem ser definidos como substâncias que retardam ou inibem a oxidação e deterioração de alimentos (TSAO, 2015). Essas substâncias têm estruturas químicas muito variadas e podem ter diferentes mecanismos de ação (POKORNY et al., 2001). Durante o processamento, manipulação e estocagem dos produtos alimentícios, os lipídeos se deterioram por oxidação, que pode ser catalisada por calor, luz, etc, ocorrendo uma diminuição na vida útil e no valor nutritivo dos produtos. Logo, antioxidantes sintéticos e naturais são utilizados nos alimentos com a finalidade de retardar esse processo de oxidação (MADHAVI et al., 1995).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com a sua fonte em naturais, sintéticos ou sintéticos idênticos aos naturais (TSAO, 2015). Enzimas, vitaminas, compostos fenólicos e polifenólicos, quelantes, carotenoides e carnosina fazem parte do grupo dos antioxidantes naturais (SHAHIDI, 1997). Dentre os mais importantes consumidos no mundo estão as vitaminas C e E e a *Ginkgo biloba*. O grupo dos antioxidantes sintéticos é constituído, em sua maioria, por fenóis, impedidos e butilados, e polifenóis. Esses antioxidantes são mais baratos comparados aos naturais e também bastante efetivos em retardar o processo de oxidação (MUKHOPADHYAY, 2006), porém existe grande preocupação com relação aos possíveis potenciais mutagênicos e cancerígenos de alguns desses antioxidantes, o que vêm estimulando a pesquisa por antioxidantes naturais (CHLUDIL et al., 2008; LU, et al, 2002; BOTTERWECK et al., 2000).

3.5.1 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

O sistema de defesa antioxidante é constituído pelos sistemas enzimático e não enzimático (LYAL e BELFORT, 2012). O sistema de defesa antioxidante enzimático contribui para minimizar os danos do estresse oxidativo e é representado pelas enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathiona-peroxidase e glutathiona-redutase (BORELLA e VARELA, 2004).

3.5.1.1 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase é uma metaloenzima responsável por catalisar a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio, que é uma espécie menos reativa. Essas enzimas são classificadas de acordo com o componente metálico presente em seu sítio ativo e se dividem em quatro tipos: superóxido dismutase – cobre/zinco, superóxido dismutase – manganês, superóxido dismutase extracelular e superóxido dismutase – ferro (BORELLA e VARELA, 2004).

3.5.1.2 Catalase

A catalase é a enzima responsável por catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água (FRIDOVICH, 1998). Em função da sua velocidade na decomposição do peróxido de hidrogênio e sua vasta disseminação, esta enzima é considerada fundamental nos sistemas que capacitam os organismos a existirem em ambientes aeróbicos (MALLICK e MOHN, 2000).

3.5.1.3 Glutathiona-peroxidase

A glutathiona reduzida consiste de um tripeptídeo que contém cisteína responsável por eliminar redutivamente o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos. Essas reações de eliminação dos peróxidos são catalisadas pela enzima glutathiona-peroxidase (GPx) (VOET et al., 2014). As enzimas glutathiona-peroxidases podem ser classificadas em duas classes distintas – GPx selênio-dependente e GPx selênio-independente (SILVA, 2014a). As GPx selênio-dependentes são responsáveis por catalisar a reação de destoxificação do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos no organismo, além de outras funções (LYAL e BELFORT, 2012), enquanto as GPx selênio-independentes não apresentam grande capacidade de reduzir o peróxido de hidrogênio (SILVA, 2014a).

3.5.1.4 Glutathiona-redutase

A glutathiona reduzida, após a reação de destoxificação do peróxido de hidrogênio, se oxida a glutathiona e essa forma oxidada não apresenta propriedades protetoras como a glutathiona reduzida. Logo, a glutathiona-redutase tem como função catalisar a reação de regeneração da glutathiona reduzida, utilizando o NADPH como fonte de elétrons (HARVEY e FERRIER, 2012).

3.5.2 Defesas Antioxidantes Não Enzimáticas

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, existem também as defesas antioxidantes não enzimáticas que compreendem as vitaminas A, C e E, β -caroteno, glutatona e compostos polifenólicos (KLAUNING e KAMENDULIS, 2012; SPADA e SILVA, et al, 2004; PORAWSKI, 2002), entre outras. Esses antioxidantes atuam de maneira direta ou indireta na manutenção do equilíbrio celular e podem ser obtidos a partir da dieta, através de alimentos ricos em vitaminas, compostos fenólicos e outras substâncias (SANTOS, 2006).

A grande exposição a fatores externos que propiciam a formação de espécies oxidantes no organismo tem criado uma necessidade eminente de desenvolvimento de novas tecnologias com a finalidade de obtenção de compostos antioxidantes de fontes naturais (NOVAES et al., 2013). Evidências indicam que uma dieta onde há o consumo apropriado de antioxidantes pode reduzir os riscos das principais doenças humanas (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Logo, um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres é a utilização de antioxidantes, de origem natural ou mesmo sintéticos, que também podem ser empregados em diferentes indústrias, como a de alimentos, de cosméticos, e até mesmo na medicina (MUKHOPADHYAY, 2006)

4 ARTIGO 1– ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* DE COMPOSTOS PRODUZIDOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DE FUNGOS ISOLADOS DOS BIOMAS PAMPA E MATA ATLÂNTICA

ABSTRACT: Antioxidantes são compostos capazes de inibir a ação de radicais livres, exercendo assim um importante papel na dieta humana, na proteção de componentes de alimentos, em produtos cosméticos antienvhecimento, entre outros. Fungos endofíticos têm se destacado na produção de metabólitos com atividade biológica, como a antioxidante. O objetivo principal deste trabalho foi selecionar um fungo isolado a partir de recursos biológicos dos biomas Pampa e Mata Atlântica com capacidade para a produção de compostos antioxidantes por fermentação submersa. A atividade sequestradora dos compostos presentes nos caldos fermentados foi determinada frente aos radicais DPPH, superóxido e hidroxil. O fungo com maior atividade antioxidante foi identificado molecularmente, enquanto os metabólitos da fermentação foram identificados por cromatografia gasosa com espectrometria de massas acoplada (GC-MS). O fungo *Botryosphaeria dothidea* apresentou, dentre os aspectos considerados, o maior potencial para a produção de antioxidantes, produzindo os compostos hexahidro-3-pirrolizina, éster bis-2(metil-propil) do ácido 1,2-benzenodicarboxílico e 3,6-di-isobutil-2,5-piperazinodiona.

4.1 INTRODUÇÃO

Antioxidantes são substâncias que tem a capacidade de retardar ou inibir significativamente o processo de oxidação, mesmo quando usadas em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Estes compostos têm a capacidade de interagir com radicais livres prevenindo o dano oxidativo às moléculas vitais pela interrupção das reações em cadeia provocadas por esses radicais (MANCINI et al, 2006). Sua importância se dá por diversas razões, das quais se podem destacar a proteção de componentes dos alimentos contra o processo oxidativo, os efeitos benéficos que podem exercer quando presentes na dieta humana, sua utilização pela cosmetologia nos produtos antienvhecimento, entre outros (HALLIWELL, 2002; SCOTTI et al., 2007).

Uma grande diversidade de compostos pode ser provida pela natureza através de milhões de espécies de plantas, animais e micro-organismos. Contudo, as plantas apresentam certas limitações como fontes de novos metabólitos, enquanto os micro-organismos, em especial os fungos, destacam-se como uma inesgotável, reprodutível e facilmente renovável fonte de metabólitos bioativos com propriedades terapêuticas (CHANDRA, 2012). Esses

seres vivos são capazes de produzir compostos bioativos com diversos papéis funcionais (GUO, et al, 2008) e exercem uma importante função na produção de uma vasta gama de metabólitos, antibióticos e enzimas (EL-MANSI et al., 2012).

Os micro-organismos endofíticos possuem uma enorme diversidade biológica e capacidade de biossíntese de metabólitos secundários bioativos (KUSARI et al., 2012). Os fungos pertencentes a este grupo vêm sendo relatados como possíveis produtores de compostos com atividades biológicas interessantes, como anticancerígena, antiviral, antimicrobiana e antioxidante (SILVA, 2014b).

O isolamento de fungos merece destaque com o intuito de avaliar a atividade biológica de metabólitos produzidos por estes fungos isolados a partir da exploração da heterogeneidade de diferentes ecossistemas. Podendo-se destacar neste sentido, os biomas Pampa e a Mata Atlântica pertencentes ao estado do Rio Grande do Sul por apresentarem um ecossistema diversificado, sendo conhecidos por sua grande biodiversidade, onde a Mata Atlântica correspondente a umas das regiões mais ricas do mundo em diversidade biológica (BRASIL, 2016).

Baseando-se nesses aspectos, o objetivo principal deste trabalho foi selecionar um fungo isolado dos biomas Pampa e Mata Atlântica com potencial para a produção de compostos antioxidantes e identificar os compostos metabólicos produzidos durante a fermentação submersa.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Seleção e isolamento dos fungos

Na etapa de seleção e isolamento dos fungos, foram coletadas plantas das regiões dos biomas Pampa e Mata Atlântica. Essas plantas foram acondicionadas e mantidas a 4°C até o momento do isolamento dos micro-organismos, em meio batata-dextrose-ágar (BDA), sendo realizadas repicagens sucessivas até obtenção de culturas puras (ALFENAS e MAFIA, 2007). Essas culturas foram armazenadas em criotubos contendo BDA inclinado à 4°C.

4.2.2 Fermentação submersa

Após a etapa de isolamento, a partir de 150 culturas iniciais, foram selecionadas 53 culturas puras para o cultivo submerso e posterior avaliação da atividade antioxidante frente aos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), superóxido e hidroxil. As fermentações

submersas foram realizadas em frascos agitados contendo 150 ml de meio composto por 10 g.L⁻¹ de glicose, 7,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura; 10 g.L⁻¹ de peptona; 2 g.L⁻¹ de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄; 1 g.L⁻¹ de sulfato ferroso (FeSO₄.7H₂O); 1 g.L⁻¹ de sulfato de manganês (MnSO₄.H₂O) e 0,5 g.L⁻¹ de sulfato de magnésio (MgSO₄.7H₂O) (PARRA et al., 2005; PENARIAL et al., 2008; PIMENTEL et al., 2010; SELBMANN et al., 2002; YU et al., 1998). Como inóculo foi adicionado um disco de 1,5 cm de diâmetro para cada 50 ml de meio de cultura. Os discos foram obtidos através da biomassa do fungo crescido em meio BDA em placas de Petri, após 7 dias de incubação a 28°C no escuro. O cultivo submerso foi conduzido em agitador orbital durante 7 dias, a 120 rpm e 28°C. Após a fermentação, a separação do micélio e sobrenadante foi realizada por centrifugação e filtração a vácuo.

4.2.3 Atividade antioxidante

4.2.3.1 Capacidade sequestradora do radical DPPH

A capacidade do sobrenadante de sequestrar o radical DPPH foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Dal Prá et al. (2015) com algumas modificações. A metodologia se baseia no princípio de que o radical livre DPPH possui coloração violeta e, quando colocado à frente de uma molécula capaz de reduzi-lo a hidrazina, há uma mudança na sua coloração para amarelo pálido (ALVES et al., 2010). A análise consistiu na adição de 1500 µl de amostra a ser analisada a 1480 µl de uma solução etanólica de DPPH (10⁻⁴ M) previamente preparada, junto a 20 µl de etanol. A solução formada foi mantida em repouso por 30 minutos e um ensaio em branco foi conduzido utilizando-se etanol para substituir os 1500 µl de sobrenadante. Após o tempo de repouso, a absorbância das amostras foi determinada a 522 nm utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu modelo IR-Prestige-21). A atividade antirradicalar (AA_{DPPH}) do sobrenadante, ou porcentagem de inibição do DPPH, foi determinada utilizando a Equação 1.

$$AA_{DPPH} = \left(\frac{A_{DPPH} - (A - A_B)}{A_{DPPH}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde A, A_{DPPH} e A_B correspondem aos valores de absorbância da amostra, da solução de DPPH e do branco, respectivamente.

A concentração inibitória média (IC₅₀) correspondente à concentração capaz de inibir 50% da atividade do DPPH, sendo calculada por meio da análise da regressão linear entre a

concentração do composto e a porcentagem de inibição (SOUSA et al., 2007). Para isto, os caldos de fermentação produzidos foram diluídos em água destilada nas concentrações de 5, 10, 15, 50% (v/v), de acordo com ensaios preliminares.

4.2.3.2 Capacidade sequestradora do radical superóxido (O_2^-)

A capacidade do sobrenadante de sequestrar o radical superóxido foi avaliada a partir da metodologia proposta por Zhao et al. (2006), com algumas modificações. Esta metodologia utiliza o sistema enzimático hipoxantina/xantina oxidase e parte de uma solução de reação constituída de 100 μ l de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (30 mM), 100 μ l de solução de hipoxantina (3mM) e 200 μ l de solução de nitroazul de tetrazólio (NBT) (1,42 mM). Uma amostra de 100 μ l de sobrenadante foi adicionada à solução de reação e, após 3 minutos de repouso, adicionou-se 100 μ l de solução de xantina oxidase 0,75 U/ml. A solução foi completada com tampão fosfato (0,05M) (pH 7,4) até 3 ml, e mantida em repouso por 40 minutos para que se completasse a reação. Para o cálculo da atividade antirradicalar foi necessária a realização paralela de um branco de cada amostra, um controle e um branco do controle. No branco, substituiu-se o NBT por etanol, enquanto no controle substituiu-se o sobrenadante por etanol. Após o tempo reacional, a absorbância das amostras foi determinada utilizando um espectrofotômetro UV-visível a 560 nm (Shimadzu modelo IR-Prestige-21). A atividade antirradicalar (AA_{O_2}) do sobrenadante, ou porcentagem de inibição do superóxido, foi determinada conforme Equação 2.

$$AA_{O_2} = \left(1 - \frac{(A - A_B)}{(A_C - A_{BC})} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde A, A_B , A_C e A_{BC} correspondem aos valores de absorbância da amostra, branco da amostra, controle e branco do controle, respectivamente.

4.2.3.3 Capacidade sequestradora do radical hidroxil (OH)

A capacidade do sobrenadante de sequestrar o radical hidroxil foi avaliada utilizando o método da 2-desoxi-D-ribose proposto por Zhao et al. (2006), com algumas modificações. A solução de reação constituiu-se de 100 μ l de sobrenadante, 100 μ l de solução de EDTA (1 mM), 100 μ l de solução de cloreto férrico hexaidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) (1 mM), 100 μ l de solução de 2-desoxi-d-ribose (36 mM), 100 μ l de solução de peróxido de hidrogênio (10

mM) e 100 µl de solução de ácido L-ascórbico (1 mM) em tampão fosfato (0,025 M) (pH 7,4). O volume da solução de reação foi completado com tampão fosfato até o volume de 1,0 ml e mantido a 37°C em banho-maria durante 1 hora. Terminado o tempo de reação, 1,0 ml de solução de tricloroacético (TCA) (10%) e 1,0 ml de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1%) foram adicionados em tampão fosfato. As amostras foram recolocadas em banho-maria à temperatura em torno de 70°C por 15 minutos e, em seguida, resfriadas em refrigerador até temperatura ambiente. Por fim, água deionizada foi adicionada às amostras até que se completasse o volume de 5 ml. A absorbância das amostras foi determinada a 532 nm em espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu modelo IR-Prestige-21). A atividade antirradicalar (AA_{OH}) do sobrenadante, ou porcentagem de inibição do hidroxil, foi calculada conforme a Equação 3.

$$AA_{OH} = \left(1 - \frac{(A - A_B)}{(A_C - A_{BC})} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde A, A_B , A_C e A_{BC} correspondem aos valores de absorbância da amostra, do branco, do controle e do branco do controle, respectivamente.

4.2.4 Identificação do micro-organismo

A identificação do micro-organismo selecionado foi realizada pelo Laboratório de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, São Paulo - SP, Brasil. O reagente CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) foi utilizado para a extração do DNA fúngico, conforme Doyle e Doyle (1987), a partir do micélio cultivado em meio batata-dextrose e triturado em microtubos com auxílio de pistilo. Após a extração do DNA genômico, este foi submetido à reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação da região ITS (internal transcribed spacer), utilizando os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o fator elongação foram EF-1 e EF-2 (O'DONNELL e CIGELNIK, 1997). A purificação dos produtos amplificados foi realizada através da precipitação com polietilenoglicol (SCHMITZ e RIESNER, 2006). Em seguida, estes foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia, utilizando-se o reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems). A análise foi realizada em sequenciador capilar automático 3500 XL (Applied Biosystems). Os fragmentos sequenciados obtidos foram comparados com sequências de espécimes autênticos depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) através da ferramenta Blastn.

4.2.5 Extração

O sobrenadante obtido a partir do cultivo submerso do fungo selecionado foi submetido à partição líquido-líquido utilizando acetato de etila (PA). A extração foi realizada em balão acoplado a um condensador com adição da razão (1:5) sobrenadante/solvente. O sistema foi mantido sob agitação constante pelo período de 24 horas com o auxílio de um agitador magnético, sendo a temperatura da água de recirculação do condensador mantida a 10°C por meio de um banho termostático. Após, a mistura foi transferida para tubos de ensaio e mantida em repouso por aproximadamente 24 horas para a separação das fases. Uma alíquota da fração correspondente à fase orgânica foi retirada para análise cromatográfica dos compostos voláteis.

4.2.6 Análise cromatográfica (GC-MS)

A fração orgânica foi submetida à análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) em cromatógrafo a gás (GC-MS-QP-2010 da Shimadzu). As temperaturas do injetor e da fonte de íons foram 250 e 260°C, respectivamente. O fluxo de gás hélio foi 1,11 ml/min, split na razão 1/30 e volume de amostra de 1 µl. A coluna cromatográfica utilizada foi a Rtx-5MS(30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Restek) e foi utilizado um autoinjeter AOC-20i. A temperatura da coluna foi mantida a 150°C por 1 min e então aumentada para 230°C a 8°C/min, após 1 min, a temperatura aumentou para 250°C a 7°C/min, na qual foi mantida por mais 1 min, e aumentada para 300°C a 10°C/min.

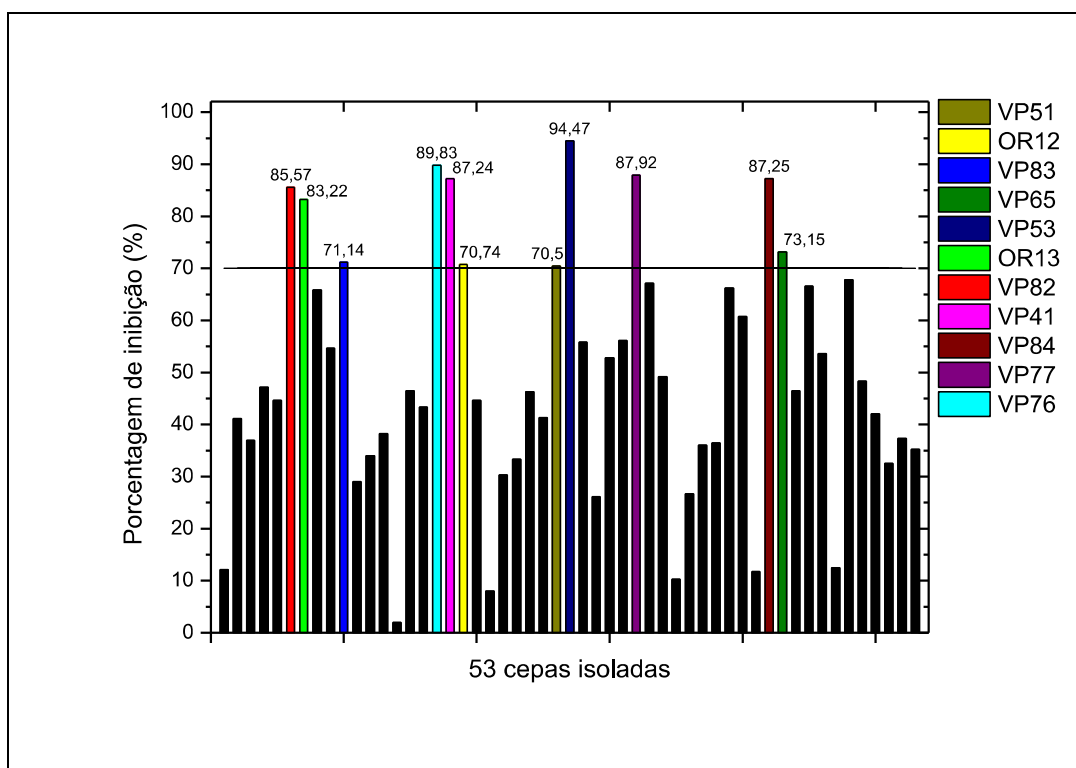
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1 *Screening*

Na etapa de *screening*, 53 fungos endofíticos foram selecionados com o objetivo de avaliar a capacidade de produção de compostos antioxidantes por fermentação submersa. Zeng et al. (2011) investigou a atividade antioxidante in vitro do sobrenadante de 49 fungos endofíticos isolados da planta *Scapana verrucosa*, classificando os fungos *Chaetomium globosum* e *Creosphaeria* sp. como potenciais fontes de antioxidantes naturais. O mesmo foi verificado por Khiralla, et al, (2015) ao avaliar a capacidade antioxidante total do fungo *Aspergillus* sp. isolado da planta medicinal *T. foenum-graecum*.

Os fungos isolados, primeiramente foram testados em relação ao potencial de inibição do radical DPPH, onde os resultados de inibição deste radical frente aos compostos produzidos pelo metabolismo dos fungos podem ser visualizados na Figura 1.

Figura 1 – Porcentagem de inibição do radical DPPH das 53 cepas isoladas.



Testes utilizando radical estável DPPH são comumente utilizados na determinação da atividade antirradicalar de compostos antioxidantes. O radical DPPH sofre redução, por doação de hidrogênio, no contato com compostos sequestradores de radicais, resultando em uma mudança de coloração do roxo para o amarelo e queda na absorbância a um determinado comprimento de onda (JHA et al., 2014). Os resultados de porcentagem de inibição para os caldos de fermentação analisados variaram de 2,00 a 94,47% o que significa que todos os fungos isolados apresentaram atividade frente ao radical DPPH nas condições estudadas. A partir desses resultados, foram selecionados os fungos no qual seu respectivo sobrenadante apresentou resposta inibitória superior a 70% para avaliação da capacidade de sequestrar os radicais superóxido e hidroxil (Tabela 1).

Tabela1– Porcentagem de inibição do radical DPPH pelos fungos isolados.

Código	Inibição (%)
VP82	85,57
OR13	83,22
VP83	71,14
VP76	89,83
VP41	87,24
OR12	70,74
VP51	70,5
VP53	94,47
VP77	87,92
VP84	87,25
VP65	73,15

Os fungos VP82, OR13, VP83, VP76, VP41, OR12, VP51, VP53, VP77, VP84 e VP65 foram selecionados e seus respectivos sobrenadantes foram avaliados quanto à atividade antioxidante frente aos radicais superóxido e hidroxil (Tabela 2).

Tabela2 – Porcentagem inibitória dos radicais superóxido (%) e hidroxil (%).

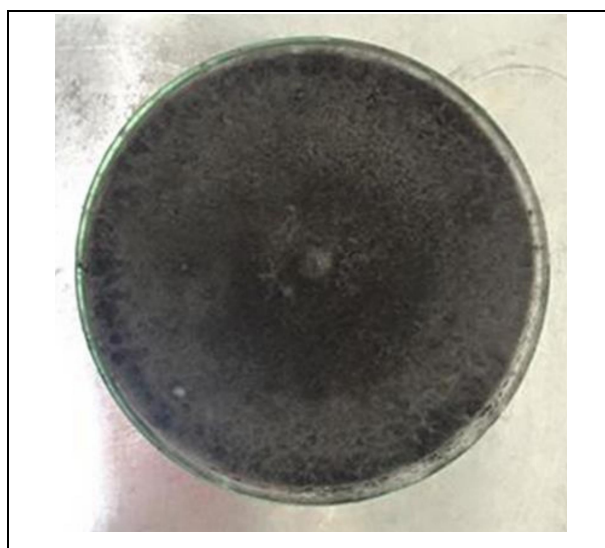
Fungo	Radical superóxido (%)	Radical Hidroxil (%)
VP53	94,87 ^a	89,78 ^{ab}
OR12	89,64 ^a	81,13 ^{bc}
VP77	89,43 ^a	94,87 ^a
VP82	88,92 ^a	75,49 ^{cd}
VP76	83,17 ^{ab}	81,88 ^{abc}
VP65	81,72 ^{ab}	62,63 ^{dc}
VP41	77,83 ^{ab}	76,17 ^c
VP84	76,33 ^{ab}	93,25 ^{ab}
OR13	73,17 ^{ab}	58,59 ^e
VP83	65,30 ^b	57,44 ^e
VP51	64,26 ^b	94,94 ^a

*Letras iguais, as respostas não apresentam diferenças significativas a 95% ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

Os resultados de porcentagem de inibição do radical superóxido variaram de 64,26 a 94,87%, enquanto os resultados do radical hidroxil variaram de 57,44 a 94,94%. Os fungos VP53, OR12, VP77, VP82, VP76, VP65, VP41, VP84 e OR13 apresentaram a maior porcentagem de inibição do radical superóxido e não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$). Os fungos VP51, VP77, VP84, VP53 e VP76 não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$) para os resultados de atividade frente ao radical hidroxil. Os fungos codificados como VP53, VP76, VP77 e VP84 apresentaram os melhores resultados de atividade frente aos radicais superóxido e hidroxil, e assim, selecionou-se o fungo VP53 como aquele que, dentro das condições estudadas, tem o maior potencial para a produção de compostos antioxidantes, com valores de inibição do DPPH, superóxido e hidroxil de 94,47; 94,87 e 89,78%, além de apresentar melhor crescimento no meio BDA. O fungo VP53 foi isolado a partir da planta *Solanum americanum*, popularmente conhecida por “maria-pretinha”, coletada da região de Vila Paraíso, distrito de Santiago - RS, que compreende a região de transição entre os biomas Pampa e Mata Atlântica (IBGE, 2016). A identificação

genética do micro-organismo apontou que este pertence ao gênero *Botryosphaeria*, sendo classificado como da espécie *dothidea*. A Figura 2 ilustra o fungo VP53 isolado cultivado em meio batata dextrose ágar.

Figura2 – Fungo *Botryosphaeria dothidea* cultivado em meio batata dextrose ágar.

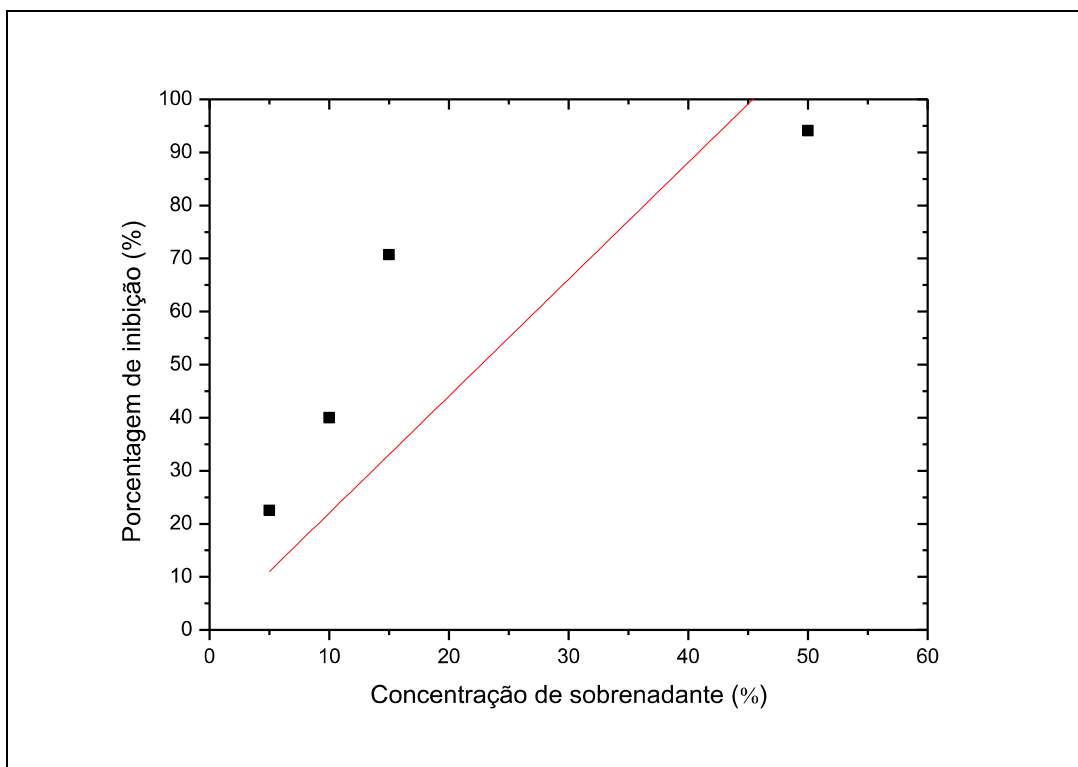


Fonte: A autora.

4.3.2 Atividade antioxidante

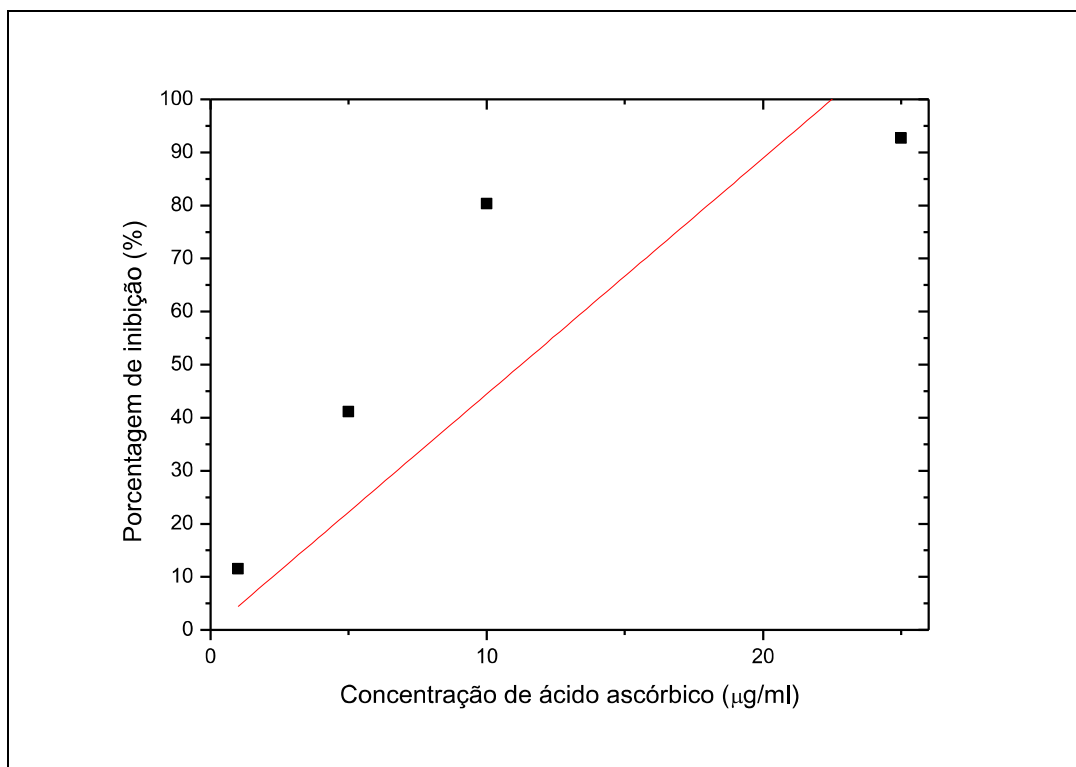
Para o cálculo do IC50, foi realizada uma regressão linear entre a concentração do caldo diluído e a porcentagem de inibição (Figura 3). Analisando a Figura 3, pode-se verificar que as amostras apresentaram uma dose-dependência significativa, ou seja, o percentual de inibição do radical DPPH foi aumentando com o aumento do volume de caldo adicionado. A regressão linear apresentou os valores de 2,20295 para o coeficiente angular e 0 para o coeficiente linear, em função de que a única fonte de compostos capazes de inibir o radical provinha da amostra. O coeficiente de determinação (R^2) encontrado foi de 0,93074, mostrando que a regressão ajusta bem os dados experimentais. A partir desses dados, verificou-se que o IC50 apresentou um valor de concentração de sobrenadante de 22,7%, sendo 340,5 μ l o volume bruto de caldo de fermentação.

Figura3 – Porcentagem de inibição frente a diferentes concentrações de sobrenadante.



O ácido ascórbico foi utilizado como padrão para o ensaio de DPPH, com a finalidade de realizar uma comparação das atividades encontradas. Também conhecido por vitamina C, o ácido ascórbico tem ação antioxidante (GRUNE, 2005) e previne alimentos dos danos oxidativos (KIKUGAWA et al., 1990). A porcentagem de inibição de diferentes concentrações de ácido ascórbico são apresentadas na Figura 4.

Figura4 – Porcentagem de inibição frente a diferentes concentrações de ácido ascórbico.



Ao comparar as Figuras 3 e 4, pode-se verificar que o ácido ascórbico analisado apresentou o mesmo comportamento dose-dependente do caldo de fermentação durante a análise de inibição do radical DPPH. A fim de se determinar o IC50 para o ácido ascórbico, realizou-se uma regressão linear e a equação da reta apresentou um valor de 4,44485 para o coeficiente linear e 0 para o coeficiente angular, pois a única fonte de compostos antioxidantes provinha da amostra de ácido ascórbico. O coeficiente de determinação (R^2) apresentou um valor de 0,93775, logo a regressão ajusta bem os dados experimentais. A partir dos valores de coeficientes obtidos, verificou-se um IC50 de 11,25 µg/ml para o ácido ascórbico. Logo, pode-se afirmar que uma solução aquosa de 22,7% de caldo de fermentação consegue inibir a mesma quantidade de radicais DPPH que uma solução de 11,25 µg/ml de ácido ascórbico.

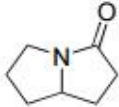
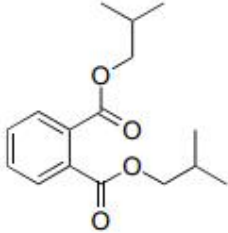
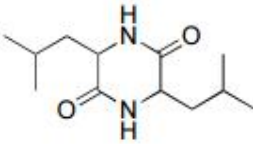
4.3.3 Identificação dos compostos

A identificação dos compostos voláteis obtidos no caldo de fermentação do fungo *Botryosphaeria dothidea* foi realizada através de uma extração líquido-líquido do

sobrenadante com acetato de etila, onde a fração orgânica foi utilizada para a qualificação por cromatografia. Na Tabela 3 estão apresentados os principais compostos identificados.

Xiao et al. (2014) avaliaram as atividades antifúngica, antibacteriana, antioxidante e citotóxica dos metabólitos secundários produzidos pelo fungo *Botryosphaeria dothidea* por fermentação em estado sólido. Ao todo foram identificados 18 metabólitos diferentes, tendo os compostos altenusin e djalonensone apresentado marcante atividade sequestradora de radicais DPPH, com valores de IC50 de 17,6 e 18,7 μM , respectivamente.

Tabela 3 – Identificação dos compostos presentes na fração orgânica resultante da extração líquido-líquido do sobrenadante produzido pelo fungo *Botryosphaeria dothidea*.

Pico	Nome do composto	Estrutura química	% Total
1	Hexahidro-3-pirrolizinona		32,23
2	éster bis-2(metil-propil) do ácido 1,2-benzenodicarboxílico		37,93
3	3,6-di-isobutil-2,5-piperazinodiona		29,84

*TR: Tempo de retenção

O composto Hexahidro-3-pirrolizinona consiste de um alcalóide, que são substâncias nitrogenadas geralmente heterocíclicas que exercem ação fisiológica pronunciada sobre os animais (AMARAL, 1995) e são onipresentes em produtos naturais e biologicamente ativos (HUANG et al., 2011). Alcalóides pirrolizidínicos podem ser encontrados em muitas famílias botânicas e são metabólitos secundários típicos do gênero *Senecio* (MARCANO e HASEGAWA, 2002).

Gao et al. (2015) realizou o cultivo de *Hydrilla verticillata* com algas em um sistema de coexistência e identificou 63 compostos diferentes, entre eles o composto éster bis-2(metil-propil) do ácido 1,2-benzenodicarboxílico. Conhecido por ftalato de di-isobutila (DIBP), este composto foi detectado também entre os compostos ativos do fruto da *Pyrus bretschneideri*Rehd., um tipo de pêra comestível utilizada na medicina popular chinesa para tratar tosse, constipação e alcoolismo (XIA et al., 2012), e no caldo de fermentação do fungo endofítico *Pestalotiopsis clavispora* (DENG et al., 2011).

O composto 3,6-di-isobutil-2,5-piperazinodiona, classificado também como um alcalóide, foi verificado no caldo de cultura da bactéria *Pseudomonas* sp., apresentou atividades citotóxicas e antimicrobiana (ZHENG et al., 2005). Balachandran et al, (2012) investigaram essas atividades no caldo de cultura da bactéria *Methylobacterium* sp., e entre os metabólitos encontrados, verificou-se a presença do composto 3,6-bis(2-methylpropyl)-2,5-Piperazinedione. A Piperazina apresenta uma estrutura molecular semelhante ao composto identificado, sendo utilizada na terapêutica helmintoses, como *Ascaris lumbricoides* e *Enterobius vermicularis*(AUTO et al., 2008).

4.4 CONCLUSÃO

Os fungos endofíticos isolados de plantas de regiões do bioma Pampa e Mata Atlântica se mostraram, em sua grande maioria, produtores em potencial de compostos com atividade antioxidante. O fungo selecionado na etapa de *screening* foi identificado como *Botryosphaeria dothidea*, sendo bastante promissor na produção de compostos com atividade antirradicalar, apresentando um IC₅₀ de 22,7% equivalente a 11,25 µg/ml de ácido ascórbico. Entre os metabólitos identificados, verificou-se a presença de dois alcalóides, que são substâncias onipresentes em produtos naturais e biologicamente ativos, bem como outro composto.

4.5 REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. p.382.

AMARAL, L. do. **A química**. 1 ed. São Paulo: Edições Loyola, 1995.

AUTO, H. F.; CONSTANT, J. M. C.; CONSTANT, A. B. L. **Antibióticos e quimioterápicos**. 5 ed. Maceió: UFAL, 2008.

BALACHANDRAN, C.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Cytotoxic (A549) and antimicrobial effects of *Methylobacterium* sp. isolate (ERI-135) from Nilgiris forest soil, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, V. 2, p. 712-716, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Pampa; Mata Atlântica**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

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

DAL PRÁ, V. et al. Ultrasound-Assisted Extraction and Biological Activities of Extracts of *Brassica oleracea* var. capitata. **Food Technology and Biotechnology**, V.53, p. 102-109, 2015.

DENG, H. Y.; XING, J. G.; LUO, D. Q. Metabolites of endophytic fungus *Pestalotiopsis clavispora* isolated from the stem of *Bruguiera sexangula*. **Mycosystema**, v. 30, p. 263-267, 2011.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, V.19, p. 11-15, 1987.

EL-MANSI, E. M. T.; WARD, F. B.; CHOPRA, A. P. **Microbiology of industrial fermentation**: Central and modern concepts. In: EL-MANSI, E. M. T. et al. *Fermentation microbiology and biotechnology*. 3 ed. Nova Iorque: CRC Press, 2012. p. 10-35.

GAO, H. et al. The possible allelopathic effect of *Hydrilla verticillata* on phytoplankton in nutrient-rich water. **Environmental Earth Sciences**, V. 73, p. 5141-5151, 2015.

GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, V. 44, p. 136-142, 2008.

GRUNE, T., et al. **Primary antioxidante defense**. In: GRUNE, T. *Oxidants and antioxidante defense systems: The handbook of Environmental Chemistry*. V. 2. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2005.

HALLIWELL, B. **Food-derived Antioxidants**: How to Evaluate their importance in food and in vivo. In: CADENAS, E.; PACKER, L. *Handbook of antioxidants*. 2. Ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2002. cap. 1, p. 1-46.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

HUANG, Y. et al. Asymmetric synthesis of chiral trifluoromethylated heliotridane via highly catalytic asymmetric Friedel-Crafts alkylation with β -trifluoromethylated acrylates and pyrroles. **New Journal of Chemistry**, V. 35, p. 2614-2621, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Rio Grande do Sul - Santiago**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

- KHIRALLA, A. et al. A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, V. 8, p. 701-704, 2015.
- KIKUGAWA, K.; KUNUGI, A. KURECHI, T. **Chemistry and implications of degradation of phenolic antioxidants**. In: HUDSON, B. J. F. Food Antioxidants. London: Elsevier Applied Science, p.65-99, 1990.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry and Biology**, V. 19, p. 792-798, 2012.
- MANCINI, A. et al. **Antioxidant systems in human seminal plasma**: Physiopathological meaning and new perspectives. In: PANGLOSSI, H. V. Antioxidants: New research. 1. ed. Nova Iorque: Nova Science: Nova Science Publishers, 2006. p. 131-147.
- MARCANO, D.; HASEGAWA, M. **Fitoquímica Orgânica**. 2 ed. Caracas: Editorial Torino, 2002.
- MOU, Y. et al. Antimicrobial and Antioxidant Activities and Effect of 1-Hexadecene Addition on Palmarumycin C2 and C3 Yields in Liquid Culture of Endophytic Fungus *Berkleasium* sp. Dzf12. **Molecules**, V. 18, 15587-15599, 2013.
- O'DONNELL, K. e CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, V. 7, p. 103-116, 1997.
- PARRA, P.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 37, p. 704-711, 2005.
- PENARIOL, M. C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R. A. Crescimento e esporulação de *Bipolaris euphorbiae* sob diferentes condições nutricionais. **Ciência Rural**, V.38, n. 7, p. 1907-1913, 2008.
- PIMENTEL, F. A. et al. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazonica**, V. 40, n. 1, p. 213-220, 2010.
- SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, V. 354, p. 311-313, 2006.
- SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, V. 43, n. 2, p. 153-166, 2007.
- SELBMANN, L. et al. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, V.153, p. 585-592, 2002.
- SILVA, I. P. da. Fungos endofíticos: Fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, V. 10, p. 3888-3905, 2014b.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, V. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

XIA, L. et al. Study on chemical composition, anti-inflammatory and anti-microbial activities of extracts from Chinese pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). **Food and chemical toxicology**, V. 50, p. 3673-3679, 2012.

XIAO, J. et al. Secondary metabolites from the endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and their antifungal, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, V. 62, p. 3584-3590, 2014.

YU, X.; HALLETT, S.G.; SHEPPARD, J.; WATSON, A.K. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, V. 20, p. 333-338, 1998.

WHITE, T. J. et al. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: INNIS, M. A. et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Nova Iorque: Academic Press, Inc., 1990.

ZENG, P. Y. et al. In vitro antioxidant activities of endophytic fungi isolated from the liverwort *Scapania verrucosa*. **Genetics and Molecular Research**, V. 10, p. 3169-3179, 2011.

ZHAO, H. et al. (2006). Effects of extraction solvent mixtures and antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 54, p. 7277-7286, 2006.

ZHAO, J. T. et al. Endophytic fungi from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] produce antioxidant cajanin stilbene acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 60, p. 4314-4319, 2012.

ZHAO, J. T. et al. In vitro antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Food Research International**, V. 56, p. 243-251, 2014.

ZHENG, L. et al. Hymeniacidon perleve Associated Bioactive Bacterium *Pseudomonas* sp. NJ6-3-1*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, V. 41, p. 29-33, 2005.

5 ARTIGO 2 – PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO SUBMERSA DO FUNGO *Botryosphaeria dothidea*

ABSTRACT: O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de compostos antioxidantes por fermentação submersa utilizando o fungo *Botryosphaeria dothidea*. Parâmetros da fermentação como a concentração de glicose (10-20 g.L⁻¹), concentração de extrato de levedura (5-10 g.L⁻¹), concentração de peptona (8-12 g.L⁻¹), pH (4,5-6,5), temperatura (20-30°C) e agitação (80-160 rpm) foram avaliados frente a inibição dos radicais DPPH, superóxido e hidroxil. Verificou-se que os fatores concentração de glicose e peptona apresentaram efeitos significativos na resposta inibição do DPPH e apenas a concentração de glicose apresentou efeito na inibição do superóxido. A otimização dessas duas variáveis resultou em 95,35 e 89,2% de inibição do DPPH e hidroxil, respectivamente.

5.1 INTRODUÇÃO

O campo da química dos radicais livres tem despertado grande atenção nos últimos anos. Os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio, que são geradas através de vários sistemas endógenos, expõem o organismo humano a diferentes condições físico-químicas e estados patológicos (LOBO et al., 2010). O desequilíbrio entre a geração dessas espécies e a atuação de sistemas de defesa antioxidante origina uma condição denominada estresse oxidativo (BARBOS et al., 2010; PREISER, 2012). Essa condição tem sido associada com diversas doenças, o que justifica o grande interesse na atuação de compostos antioxidantes (REZENDE, 2010).

Antioxidantes são compostos que têm a capacidade de interagir com radicais livres prevenindo o dano oxidativo a moléculas vitais pela interrupção das reações em cadeia provocadas por esses radicais (MANCINI et al., 2006). O consumo de antioxidantes na dieta tem sido relatado como de grande importância visto que está relacionado diretamente com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (VASCONCELOS et al., 2014). Estudos reportam a produção de compostos bioativos com atividades farmacológicas proeminentes, como a antioxidante, por fungos endofíticos. Logo, esses micro-organismos correspondem a promissoras fontes de metabólitos secundários com atividade antioxidante (SILVA, 2014).

A produção de compostos com atividades antifúngica, antibacteriana, antioxidante e citotóxica foi avaliada através de fermentação em estado sólido do fungo endofítico *Botryosphaeria dothidea*. A partir dos seus extratos foram isolados 18 compostos, entre eles

os metabólitos secundários altenuene e djalonensone, que apresentaram marcante atividade sequestradora do radical DPPH (XIAO et al, 2014).

A produção de metabólitos secundários está relacionada com a capacidade de biossíntese do micro-organismo e com as condições do processo fermentativo, sendo a expressão dos compostos produzidos influenciada pelos parâmetros da fermentação (TAKAHASHI e LUCAS, 2008). Condições como o meio, pH, temperatura, agitação e aeração devem ser otimizadas para o micro-organismo de modo que a produção seja eficiente (DUNN-COLEMAN et al., 1992).

Baseado nesses aspectos, o presente trabalho teve como principal objetivo a otimização dos parâmetros de processo de fermentação submersa do fungo *Botryosphaeria dothidea*, isolado de uma região de transição dos biomas Pampa e Mata Atlântica, visando a maior produção de compostos antioxidantes.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Micro-organismo

O fungo endofítico *Botryosphaeria dothidea* foi isolado da planta *Solanum americanum*, coletada da cidade de Santiago – RS, que engloba os biomas Pampa e Mata Atlântica. A manutenção da cultura foi realizada em meio batata-dextrose-água (BDA) (ALFENAS E MAFIA, 2007).

5.2.2 Fermentação submersa

A fermentação submersa foi realizada em agitador orbital utilizando frascos Erlenmeyer contendo 150 ml de meio de cultura. Como inóculo, utilizou-se um disco de 1,5 cm de micélio crescido por 7 dias em meio BDA a 28°C no escuro para cada 50 ml de meio. O meio de cultura foi composto por glicose, extrato de levedura, peptona definidas através do planejamento de experimentos e sais minerais. As concentrações dos sais minerais sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g.L⁻¹), sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0,5 g.L⁻¹); sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (1 g.L⁻¹) e sulfato de manganês ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (1 g.L⁻¹) foram fixadas (PARRA et al., 2005; PENARIOAL et al., 2008; PIMENTEL et al., 2010; SELBMANN et al., 2002; YU et al., 1998).

5.2.3 Planejamento experimental Plackett Burman

Inicialmente foi delineado um planejamento experimental do tipo PlackettBurman (PB) com 12 ensaios mais 3 repetições no ponto central. As variáveis investigadas foram concentração de glicose (10-20 g.L⁻¹), concentração de extrato de levedura (5-10 g.L⁻¹), concentração de peptona (8-12 g.L⁻¹), pH (4,5-6,5), temperatura (20-30°C) e agitação (80-160 rpm).

5.2.4 Delineamento composto central rotacional

Um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi empregado para avaliar os fatores que apresentaram efeito significativo no planejamento Plackett Burman (item 4.2.3). Assim, utilizou-se um DCCR para dois fatores com 3 repetições no ponto central, onde as concentrações de glicose e peptona foram avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Níveis reais e codificados do DCCR.

Variáveis independentes	Níveis codificados				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Concentração de glicose (g.L ⁻¹)	15	20,23	33	45,77	51
Concentração de peptona (g.L ⁻¹)	8	9,74	14	18,26	20

5.2.5 Atividade antioxidante

5.2.5.1 Capacidade sequestradora do radical DPPH

A capacidade do sobrenadante de sequestrar o radical DPPH foi avaliada pelo cálculo da porcentagem de inibição desse radical utilizando a metodologia proposta por Dal Prá et al. (2015), com algumas modificações. A análise consiste no preparo de uma solução contendo 1500 µl de amostra a ser analisada, 1480 µl de uma solução etanólica de DPPH (10⁻⁴ M) e 20 µl de etanol. A amostra analisada foi o caldo de fermentação diluído em água destilada na proporção 1:4. Após o preparo da solução, esta foi mantida em repouso por 30 minutos no escuro. Ensaio em branco e controles foram conduzidos substituindo os 1480 µl de solução de DPPH e os 1500 µl de amostra por etanol, respectivamente. Após o tempo reacional,

aferiu-se a absorbância das soluções a 522 nm utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu modelo IR-Prestige-21). A atividade antirradicalar (AA_{DPPH}) do sobrenadante, ou porcentagem de inibição do radical DPPH, foi determinada utilizando a Equação 1.

$$AA_{DPPH} = \left(\frac{A_{DPPH} - (A - A_B)}{A_{DPPH}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde A, A_{DPPH} e A_B correspondem aos valores de absorbância da amostra, da solução de DPPH e do branco, respectivamente.

5.2.5.2 Capacidade sequestradora do radical Superóxido (O_2^-)

A capacidade do sobrenadante de sequestrar o radical DPPH foi avaliada pelo cálculo da porcentagem de inibição desse radical utilizando a metodologia proposta por Zhao (2006), com algumas modificações. Para esta análise, utilizou-se o sistema enzimático hipoxantina/xantina oxidase, partindo de uma solução constituída de 100 μ l de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 30 mM, 100 μ l de solução de hipoxantina 3mM e 200 μ l de solução de nitroazul de tetrazólio (NBT) 1,42 mM. Uma amostra de 100 μ l contendo caldo de fermentação foi adicionada a solução preparada, seguida pela adição de 100 μ l de solução de xantina oxidase 0,75 U/ml, após 3 minutos. Tampão fosfato 0,05 M (pH 7,4) foi utilizado para completar o volume de solução em 3 ml, que foi mantida em repouso por 40 minutos. Uma amostra em branco, um controle e um branco do controle foram conduzidos paralelamente para o cálculo da atividade antirradicalar. Para as amostras em branco, substituiu-se a solução de NBT adicionada por etanol, e no controle substituiu-se a amostra contendo o caldo de fermentação. Completado o tempo reacional, aferiu-se a absorbância das amostras a 560 nm utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu modelo IR-Prestige-21). A atividade antirradicalar (AA_{O_2}) do sobrenadante, ou porcentagem de inibição do radical superóxido, foi determinada conforme Equação 2.

$$AA_{O_2} = \left(1 - \frac{(A - A_B)}{(A_C - A_{BC})} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde A, A_B , A_C e A_{BC} correspondem aos valores de absorbância da amostra, branco da amostra, controle e branco do controle, respectivamente.

5.2.5.3 Capacidade sequestradora do radical Hidroxil (OH)

A capacidade do sobrenadante de sequestrar o radical DPPH foi avaliada pela metodologia proposta por Zhao (2006), com algumas modificações. Para a análise, foi utilizado o método da 2-desoxi-D-ribose, o qual parte de uma solução de reação constituída de 100 µl de amostra, 100 µl de solução de cloreto férrico hexaidratado (FeCl₃.6H₂O) (1 mM) e 100 µl de solução de ácido L-ascórbico (1 mM) preparadas com água deionizada, 100 µl de solução de peróxido de hidrogênio (10 mM), 100 µl de solução de EDTA (1 mM) e 100 µl de solução de 2-deoxi-D-ribose (36 mM) preparadas utilizando solução tampão fosfato 0,025 M (pH 7,4). A solução reacional foi diluída com a adição de 400 ml da solução de tampão fosfato e mantida em banho-maria por 1 hora. Finalizado o tempo reacional, adicionou-se às soluções 1 ml de solução de tricloroacético (TCA) (10%) e 1,0 ml de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1%), preparadas com a solução de tampão fosfato. Após isto, as soluções reacionais foram colocadas em banho-maria a aproximadamente 70°C por 15 minutos e, por fim, foram resfriadas até temperatura ambiente utilizando um refrigerador e diluídas com água deionizada até completar o volume de 5 ml.

A absorbância das amostras foi aferida a 532 nm utilizando-se um espectrofotômetro UV-visível (Shimadzu modelo IR-Prestige-21). A atividade antirradicalar (AA_{OH}) do sobrenadante, ou porcentagem de inibição do radical hidroxil, foi determinada conforme Equação 3.

$$AA_{OH} = \left(1 - \frac{(A - A_B)}{(A_C - A_{BC})} \right) \times 100 \quad (3)$$

Onde A, A_B, A_C e A_{BC} correspondem aos valores de absorbância da amostra, branco da amostra, controle e branco do controle, respectivamente.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Planejamento PlackettBurman

O planejamento experimental Plackett Burman foi utilizado com a finalidade de se determinar quais variáveis têm efeito significativo sobre a atividade antirradicalar do caldo de fermentação. As variáveis analisadas foram as concentrações de glicose, extrato de levedura, peptona, pH, temperatura e agitação, e, para isto, foi utilizado um planejamento PB de 12

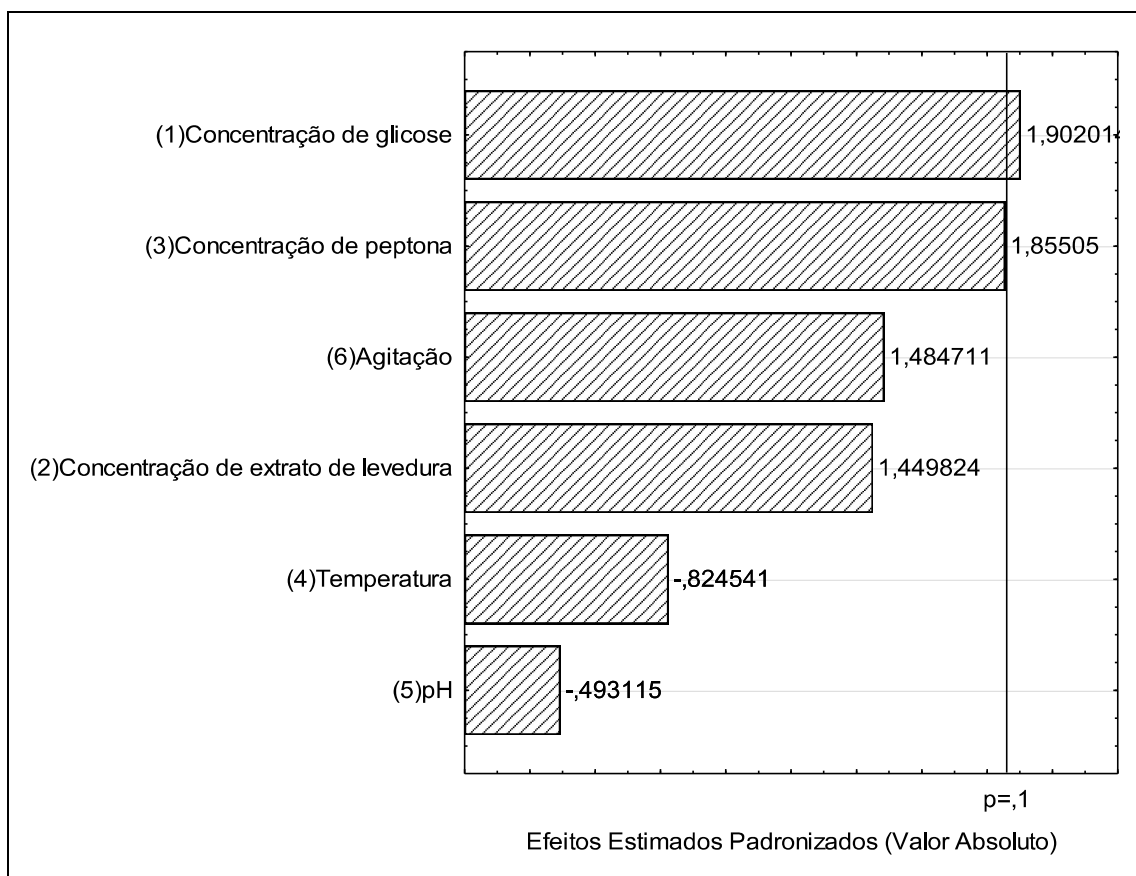
ensaios com 2 níveis de concentração e 3 repetições no ponto central. A matriz experimental do planejamento é apresentada na Tabela 2, junto aos valores de resposta porcentagem de inibição dos radicais DPPH, superóxido e hidroxil.

Tabela 2 – Matriz experimental de Plackett Burman para avaliar a influência do meio de cultura e das condições de processo na inibição dos radicais DPPH, superóxido e hidroxil.

Ensaio	Concent		Concent	Tempera	pH	Agitação	Inibiçã	Inibiçã	Inibiçã
	ração de	ração de							
	glicose	extrato	peptona	tura (°C)		(rpm)	o do	o do	o do
	(g.L ⁻¹)	de	(g.L ⁻¹)				radical	radical	radical
		de					DPPH	superó	hidroxi
		levedura					(%)	xido	l (%)
		(g.L ⁻¹)						(%)	
1	20 (1)	5 (-1)	12 (1)	20 (-1)	4,5 (-1)	80 (-1)	19,97	90,21	69,69
2	20 (1)	10 (1)	8 (-1)	30 (1)	4,5 (-1)	80 (-1)	15,95	85,96	76,84
3	10 (-1)	10 (1)	12 (1)	20 (-1)	6,5 (1)	80 (-1)	17,70	83,27	75,70
4	20 (1)	5 (-1)	12 (1)	30 (1)	4,5 (-1)	160 (1)	25,69	90,33	60,24
5	20 (1)	10 (1)	8 (-1)	30 (1)	6,5 (1)	80 (-1)	18,87	90,55	79,96
6	20 (1)	10 (1)	12 (1)	20 (-1)	6,5 (1)	160 (1)	25,34	92,79	37,03
7	10 (-1)	10 (1)	12 (1)	30 (1)	4,5 (-1)	160 (1)	17,80	88,13	95,15
8	10 (-1)	5 (-1)	12 (1)	30 (1)	6,5 (1)	80 (-1)	17,84	89,98	86,22
9	10 (-1)	5 (-1)	8 (-1)	30 (1)	6,5 (1)	160 (1)	8,22	83,31	92,89
10	20 (1)	5 (-1)	8 (-1)	20 (-1)	6,5 (1)	160 (1)	18,87	92,07	92,28
11	10 (-1)	10 (1)	8 (-1)	20 (-1)	4,5 (-1)	160 (1)	25,66	88,58	73,90
12	10 (-1)	5 (-1)	8 (-1)	20 (-1)	4,5 (-1)	80 (-1)	9,12	84,03	53,86
PC 1	15 (0)	7,5 (0)	10 (0)	25 (0)	5,5 (0)	120 (0)	18,88	89,91	80,18
PC 2	15 (0)	7,5 (0)	10 (0)	25 (0)	5,5 (0)	120 (0)	21,63	91,50	81,28
PC 3	15 (0)	7,5 (0)	10 (0)	25 (0)	5,5 (0)	120 (0)	22,30	90,90	81,42

A porcentagem de inibição do radical DPPH variou de 8,22 a 25,69%, ensaios 9 e 4, respectivamente. Na Figura 1 é possível observar a estimativa dos efeitos de cada variável independente na porcentagem de inibição do radical DPPH.

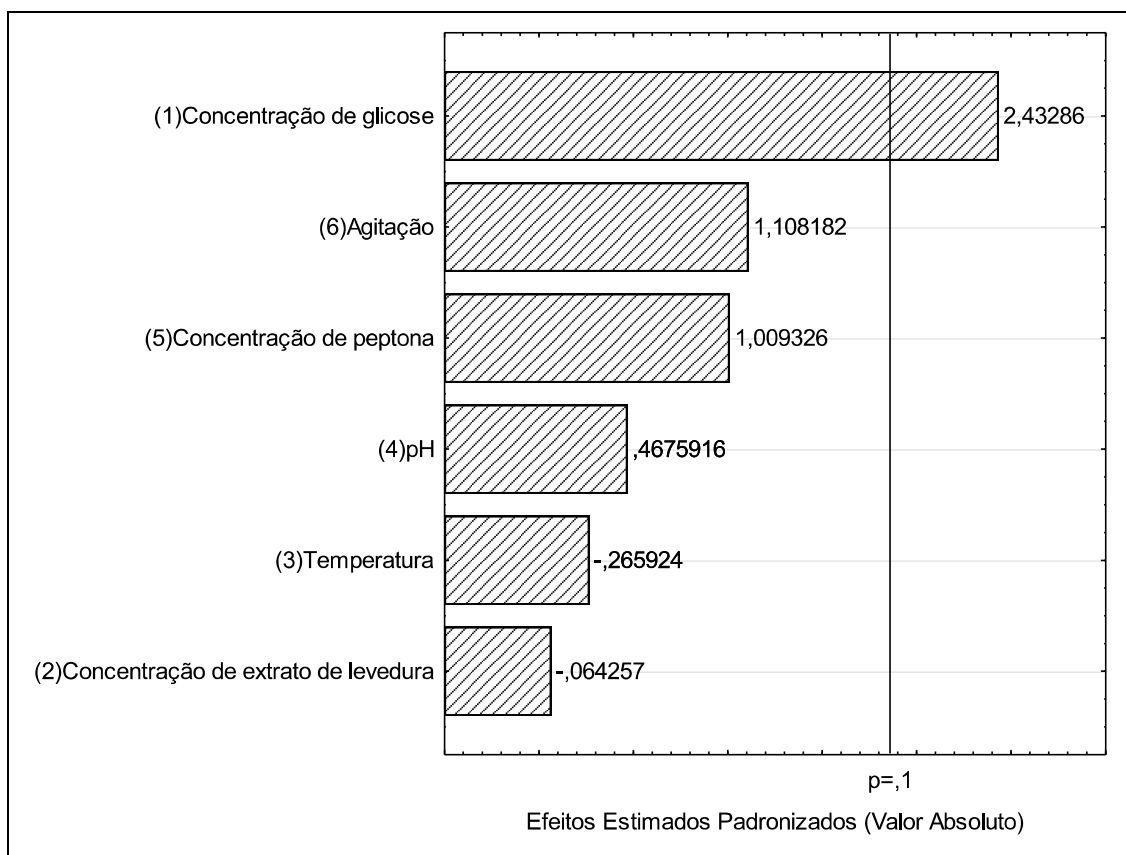
Figura 1 – Efeitos estimados das variáveis independentes na inibição do radical DPPH.



A partir da Figura 1, pode-se verificar que a variável concentração de glicose foi a única variável que apresentou efeito significativo e positivo a 90% de confiança ($p < 0,1$) na inibição do radical DPPH. A concentração de peptona apresenta um efeito positivo, considerando um valor de p de significância (0,100567) muito próximo a 0,1. Assim, dentre as variáveis avaliadas, a inibição do radical DPPH pelos compostos presentes no sobrenadante pode ser melhorada através de um aumento nas concentrações de glicose e peptona do meio de cultura.

Os valores máximo e mínimo de porcentagem de inibição do radical superóxido foram encontrados nos ensaios 6 e 3, e apresentaram valores de 92,79 e 83,27%, respectivamente. Na Figura 2, pode-se observar os efeitos estimados de cada variável na resposta porcentagem de inibição do radical superóxido.

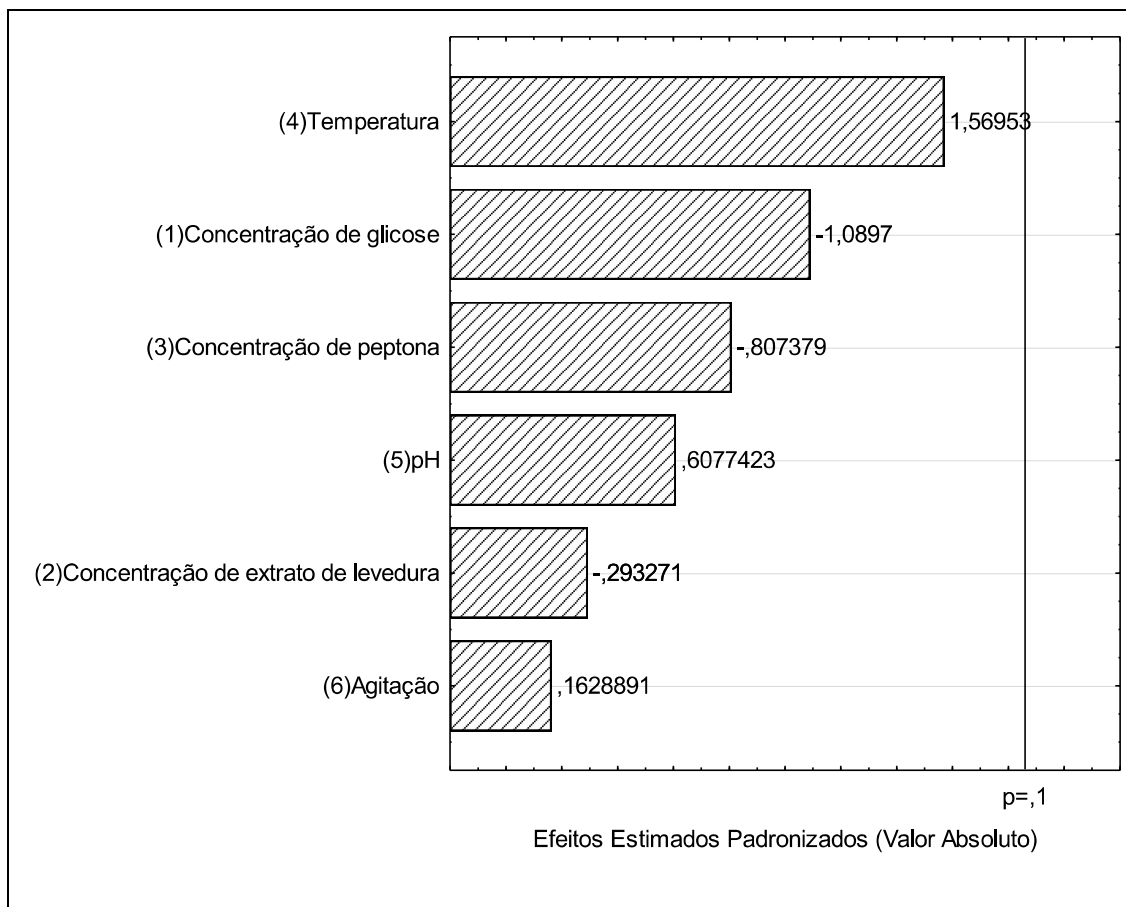
Figura 2 – Efeitos estimados das variáveis independentes na inibição do radical superóxido.



Pode-se verificar, a partir da Figura 2, que a concentração de glicose foi a única variável que apresentou efeito positivo e significativo a 90% de confiança ($p < 0,1$) na inibição do radical superóxido. Desta forma, a inibição do radical superóxido pode ser melhorada pelo aumento da concentração de glicose do meio de cultura.

Através da Tabela 2, pode-se verificar que os valores máximo e mínimo de porcentagem de inibição do radical hidroxil (92,89 e 37,03%) foram encontrados nos ensaios 9 e 6, respectivamente. A estimativa dos efeitos das variáveis independentes nesta resposta pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 – Efeitos estimados das variáveis independentes na inibição do radical hidroxil.



Nenhuma variável independente apresentou efeito significativo a 90% de confiança ($p < 0,1$) na porcentagem de inibição do radical hidroxil. Logo, a variação dentro dos intervalos estudados das concentrações dos componentes do meio de cultura, temperatura, pH do meio e agitação não influenciaram significativamente na resposta.

5.3.2 Delineamento composto central rotacional

Os efeitos das variáveis independentes concentração de glicose e concentração de peptona foram estudados na inibição dos radicais DPPH, superóxido e hidroxil. Neste delineamento, utilizaram-se 8 tratamentos diferentes e mais 3 repetições no ponto central, e sua matriz está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Variáveis independentes do DCCRe respectivos valores de inibição dos radicais DPPH, superóxido e hidroxil como respostas.

Ensaio	Concentração de glicose (g.L ⁻¹)	Concentração de peptona (g.L ⁻¹)	Inibição do radical DPPH (%)	Inibição do radical superóxido (%)	Inibição do radical hidroxil (%)
1	20,23 (-1)	9,74 (-1)	59,57	88,66	77,13
2	20,23 (-1)	18,26 (1)	68,46	92,49	89,20
3	45,77 (1)	9,74 (-1)	62,09	93,31	47,18
4	45,77 (1)	18,26 (1)	84,13	94,54	78,00
5	15,00 (-1,41)	14,00 (0)	57,93	92,62	84,99
6	51,00 (1,41)	14,00 (0)	84,63	95,08	72,88
7	33,00(0)	8,00 (-1,41)	88,89	92,35	61,57
8	33,00(0)	20,00 (1,41)	51,11	92,90	76,55
9	33,00 (0)	14,00 (0)	94,26	94,40	78,91
10	33,00 (0)	14,00 (0)	95,35	94,67	78,09
11	33,00 (0)	14,00 (0)	94,30	89,21	73,30

Para a determinação da melhor condição do delineamento, foi realizada uma análise estatística das respostas, porém não foi possível a utilização do modelo para a construção e análise da superfície para inibição dos radicais DPPH e superóxido, pois estas apresentaram um baixo coeficiente de determinação.

As variáveis que apresentaram efeito significativo ($p < 0,5$) sobre a inibição do radical hidroxil foram os termos lineares da concentração de glicose e da concentração de peptona. Os termos quadráticos e a interação entre os fatores não foram significativos. Os valores preditos para a de inibição do radical hidroxil foram ajustados a partir da Equação 1.

$$\text{Inibição do Hidroxil (\%)} = 74,34545 - 7,29985X_1 + 8,02535X_2 \quad (1)$$

Onde X_1 e X_2 representam as concentrações de glicose e peptona, para os valores codificados.

Pela análise de variância (ANOVA) (Tabela 4) encontrou-se F calculado (Fcal) de 10,417, cerca de 3 vezes superior ao F tabelado de 3,113. Portanto é possível construir superfícies de contorno (Figura 4) e de resposta (Figura 5) para a análise dos resultados, pois o modelo se ajusta bem aos dados experimentais, explicando 72,26% da variação encontrada, o que considerado aceitável para bioprocessos.

Tabela 4 – ANOVA para a porcentagem de inibição do radical hidroxil.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F
Regressão	938,752	2	469,376	10,417
Resíduos	360,453	8	45,057	
Total	1299,205	10		

$$F_{2,8,10\%} = 3,113$$

Figura 4 – Superfície de contorno da inibição do radical hidroxil em função da concentração de glicose (g.L^{-1}) e concentração de peptona (g.L^{-1}).

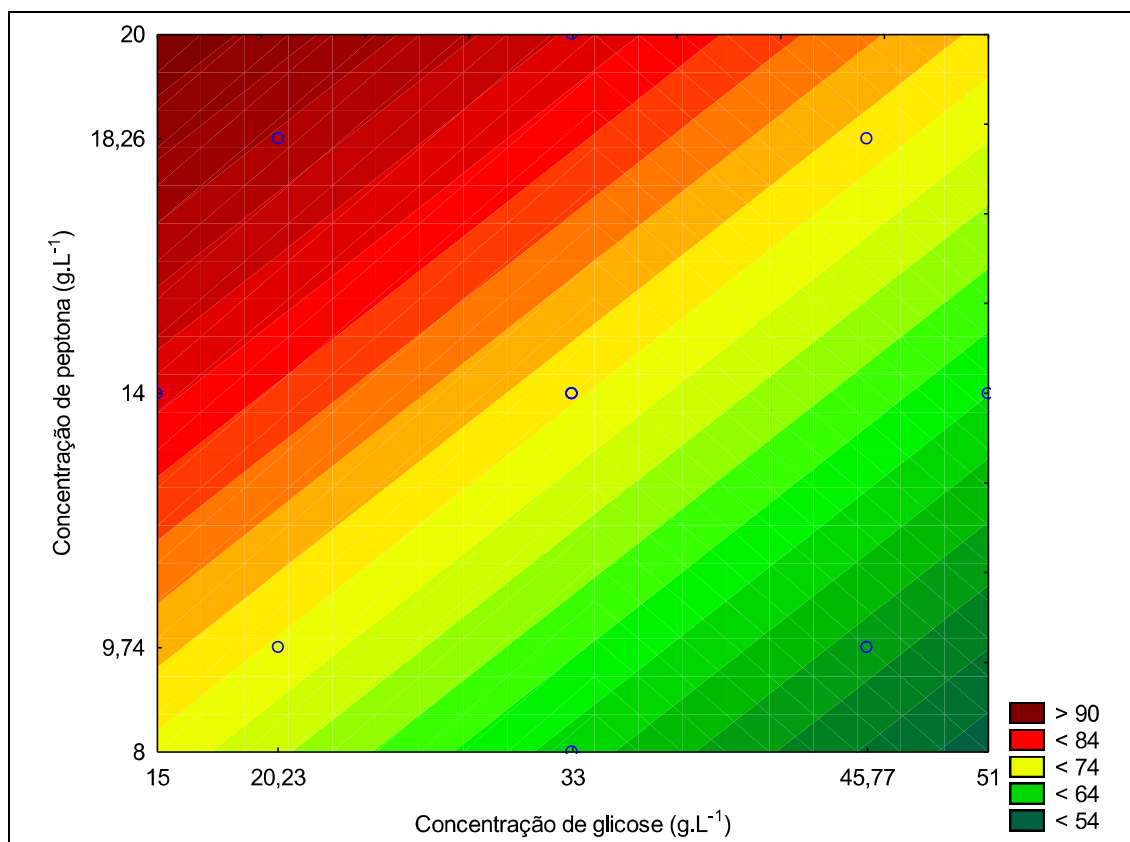
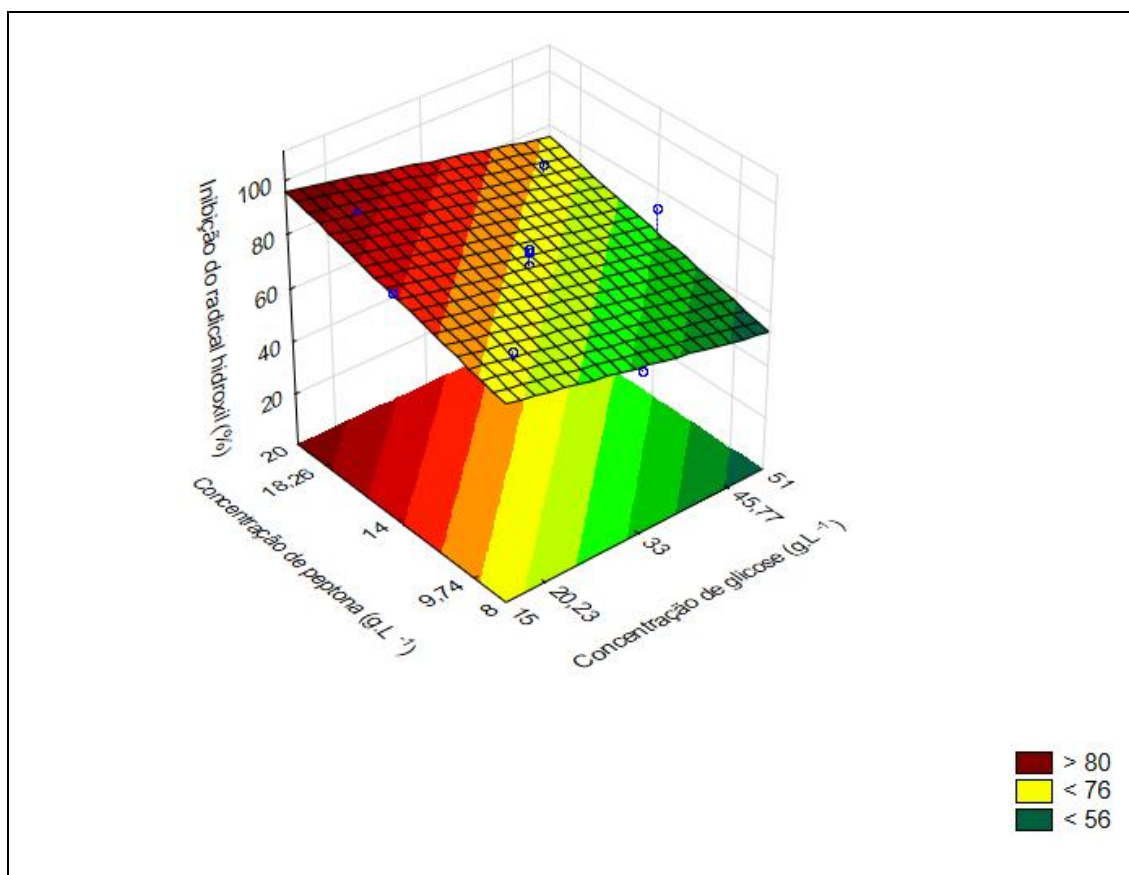


Figura 5 – Superfície de resposta da inibição do radical hidroxil em função da concentração de glicose (g.L^{-1}) e concentração de peptona (g.L^{-1}).



O melhor resultado de inibição do radical hidroxil (89,2%) foi encontrada no ensaio 2, onde foram utilizadas 20,23 e 28,26 g.L^{-1} para as concentrações de glicose e peptona, respectivamente. Através das Figuras 4 e 5, ficam evidentes os efeitos negativo da variável concentração de glicose e positivo da variável concentração de peptona sobre a resposta inibição do radical hidroxil.

O aumento na concentração de glicose provocou uma diminuição na produção de compostos com atividade antioxidante presentes no caldo de fermentação. Segundo alguns trabalhos reportados na literatura, o excesso de glicose ou outra fonte de carbono facilmente fermentável pode reprimir a produção de alguns compostos, como as β -glucanases (GIESE et al., 2003). Logo, o excesso de glicose pode ter inibido o metabolismo de fontes alternativas de carbono presentes no meio de cultura por um fenômeno denominado repressão catabólica. Este fenômeno ocorre quando um micro-organismo está crescendo na presença de um substrato facilmente metabolizável, como a glicose, o que pode limitar a produção de enzimas

responsáveis por catabolizar outros substratos presentes no meio (EVELEIGH e MONTENECOURT, 1979).

Comparando os valores de porcentagem de inibição do radical DPPH obtidos no DCCR com os valores obtidos no PB, verificou-se que houve um aumento expressivo nos valores de porcentagem de inibição frente ao radical DPPH. Os valores de inibição do DPPH variaram de 8,22 (ensaio 9) a 25,69% (ensaio 4) nas respostas do PB, e de 51,11 (ensaio 8) a 95,35% (ensaio 10) no DCCR. Os valores de porcentagem de inibição do superóxido variaram de 83,27 a 92,79% nas respostas do PB, e de 88,66 a 95,08% no DCCR. Comparando as respostas, verificou-se que as concentrações de glicose e peptona não tiveram efeito tão expressivo nos valores de porcentagem de inibição do superóxido como tiveram nos valores de inibição do hidroxil e DPPH.

5.4 CONCLUSÃO

Através do planejamento experimental Plackett Burman, verificou-se que as concentrações de glicose e peptona têm efeito significativo sobre a atividade antirradicalar do caldo de fermentação do fungo *Botryosphaeria dothidea*. A otimização dessas duas variáveis resultou no aumento da inibição dos radicais DPPH e hidroxil, e as maiores inibições desses radicais foram 95,35 e 89,2%, respectivamente.

5.5 REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. p.382.

BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, V. 23, p. 629-643, 2010.

DAL PRÁ, V. et al. Ultrasound-Assisted Extraction and Biological Activities of Extracts of Brassica oleracea var. capitata. **Food Technology and Biotechnology**, V.53, p. 102-109, 2015.

DUNN-COLEMAN, N. S. et al. **Stability of recombinant strains under fermentation conditions**. In: KINGHORN, J. R.; TURNER, G. Applied molecular genetics of filamentous fungi. 1 ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1992.

EVELEIGH, D. E.; MONTENECOURT, B. S. Increasing yields of extracellular enzymes. **Advances in Applied Microbiology**, V. 25, p. 57-74, 1979.

GIESE, E. C.; BARBOSA, A. de M.; SILVA, M. de L. C. da. Glucanases fúngicas: produção e aplicações das β -1,3 e β -1,6 glucanases. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 3 ed. 2003.

MENDES, A. S. et al. Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. **Biotechnology Letters**, V.23, p. 1963-1969, 2001.

MORAES, A. L. L. et al. Produção de isomaltulose a partir da transformação enzimática da sacarose, utilizando-se *Erwinia* sp D12 imobilizada com alginate de cálcio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, V. 25, n. 1, p. 95-102, 2005.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impacto on human health. **Pharmacognosy Reviews**, V.4, n. 8, p. 118-126, 2010.

PARRA, P.; ALDRED, D.; MAGAN, N. Medium optimization for the production of the secondary metabolite. **Enzyme and Microbial Technology**, V. 37, p. 704-711, 2005.

PENARIOL, M. C.; MONTEIRO, A. C.; PITELLI, R. A. Crescimento e esporulação de *Bipolaris euphorbiae* sob diferentes condições nutricionais. **Ciência Rural**, V.38, n. 7, p. 1907-1913, 2008.

PIMENTEL, F. A. et al. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazonica**, V. 40, n. 1, p. 213-220, 2010.

MANCINI, A. et al. **Antioxidant systems in human seminal plasma**: Physiopathological meaning and new perspectives. In: PANGLOSSI, H. V. Antioxidants: New research. 1. ed. Nova Iorque: Nova Science: Nova Science Publishers, 2006.

MOU, Y. et al. Antimicrobial and antioxidant activities and effect of 1-hexadecene addition on palmarumycin C2 and C3 yields in liquid culture of endophytic fungus *Berkleasmium* sp. DZF12. **Molecules**, V. 18, p. 15587-15599, 2013.

PREISER, J. C. **Oxidative stress**. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, V. 36, p. 147-154, 2012.

REZENDE, L. C. de. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia**. Tese de doutorado. Universidade Federal da Bahia. 2010.

SELBMANN, L. et al. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE 5080. **Research in Microbiology**, V.153, p. 585-592, 2002.

SILVA, I. P. da. Fungos endofíticos: Fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, V. 10, p. 3888-3905, 2014.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, V. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

VASCONCELOS, T. B. de. et al. Radicais Livres e antioxidantes: proteção ou perigo. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, V. 16, p. 213-219, 2014.

XIAO, J. et al. Secondary metabolites from the endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and their antifungal, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, V. 62, p. 3584-3590, 2014.

YU, X.; HALLETT, S.G.; SHEPPARD, J.; WATSON, A.K. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, V. 20, p. 333–338, 1998.

ZHAO, H. et al. Effects of extraction solvent mixtures and antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 54, p. 7277-7286, 2006.

ZHAO, J. et al. Endophytic fungi from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] produce antioxidant cajaninstilbene acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 60, p. 4314-4319, 2012.

ZHAO, J. et al. In vitro antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Food Research International**, V.56, p. 243-251, 2014.

6 DISCUSSÃO

Foram selecionados 53 fungos endofíticos isolados com o intuito de determinar sua capacidade de produção de compostos antioxidantes pelo processo de fermentação submersa. Todos os fungos isolados apresentaram capacidade para a produção de compostos com atividade antioxidante, o que confirma o grande potencial dos fungos endofíticos para a produção de compostos com atividades biológicas interessantes. O fungo VP53 foi selecionado, pois apresentou maior potencial para a produção de compostos antioxidantes, dentro das condições estudadas. Este fungo foi identificado como *Botryosphaeria dothidea* e a qualificação dos compostos voláteis presentes no extrato do caldo de fermentação desse fungo identificou a presença dos compostos hexahidro-3-pirrolizina, éster bis-2(metil-propil) do ácido 1,2-benzenodicarboxílico e 3,6-di-isobutil-2,5-piperazina. De acordo com a literatura, essa é a primeira vez que esses compostos são reportados como sendo produzidos por essa espécie. Uma posterior identificação dos compostos não voláteis presentes no caldo de fermentação também se mostra interessante, visto que também podem estar associados à atividade antioxidante do sobrenadante. Isso tudo evidencia a importância do estudo da biodiversidade dos biomas Pampa e Mata Atlântica que ainda é pouco explorada. A otimização das condições do processo fermentativo foi importante para se determinar quais condições maximizam a produção dos compostos antioxidantes. Os planejamentos de experimentos adotados auxiliaram a obter informações sobre o processo com um menor número de experimentos, minimizando os custos e o tempo.

7 CONCLUSÃO

Das 53 cepas fúngicas isoladas de recursos biológicos dos biomas Pampa e Mata Atlântica, todas apresentaram capacidade de produzir compostos com atividade antioxidante, e 11 se destacaram pela sua maior capacidade de inibir o radical DPPH. Quando avaliadas frente aos radicais superóxido e hidroxil, a cepa VP53 se destacou como aquela com maior potencial para produção de compostos antioxidantes. Esse fungo, identificado como *Botryosphaeria dothidea*, foi isolado de uma região de transição entre os biomas Pampa e Mata Atlântica e produziu os compostos hexahidro-3-pirrolizina, éster bis-2(metil-propil) do ácido 1,2-benzenodicarboxílico e 3,6-di-isobutil-2,5-piperazinodiona, nas condições estudadas.

A partir da análise dos efeitos das variáveis do processo fermentativo na capacidade de inibição dos radicais, pode-se verificar que as concentrações de glicose e peptona tiveram efeito significativo sobre a produção de compostos com atividade antioxidante. A otimização do processo resultou em um aumento significativo na capacidade dos compostos presentes no caldo de inibir os radicais DPPH e hidroxil, ou seja, houve um aumento na atividade antirradicalar do caldo de fermentação.

Diante do que foi exposto, pode-se ressaltar o grande potencial do fungo *Botryosphaeria dothidea* para a produção de compostos antioxidantes por fermentação submersa. O desenvolvimento de um bioproduto a partir deste micro-organismo se mostra promissor, apesar deste trabalho se caracterizar como um passo inicial para esse desenvolvimento.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Otimização da fermentação submersa do fungo *Botryosphaeria dothidea* em meio industrial;
2. Identificação dos compostos produzidos após a otimização do processo;
3. Estudo de diferentes métodos para a extração dos compostos produzidos;
4. Isolamento dos compostos produzidos por técnicas cromatográficas;
5. Avaliação da toxicidade dos compostos produzidos isoladamente;
6. Estudo da cinética de crescimento do micro-organismo;
7. Identificação dos compostos não voláteis presentes no caldo de fermentação.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J. L. **Microrganismos endofíticos**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Editora da Embrapa, 1998.
- AZUL, A. M. **Cogumelos do Paul da Madriz**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2010.
- BAILEY, K. L. et al. **Developing weed control technologies with fungi**. In: RAI, M. Advances in fungal biotechnology. Nova Deli: I. K. International Publishing House Pvt. Ltd, 2009.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, V. 23, p. 629-643, 2010.
- BARRAGÁN, L. A. P. et al. **Fermentative production methods**. In: POLTRONIERI, P.; D'URSO, O. F. Biotransformation of agricultural waste and by-products. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2016.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics**, V. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.
- BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, V.12, n. 2, p. 123-130, 1999.
- BIESEK, S.; ALVES, L. A.; GUERRA, I. **Estratégias de nutrição e suplementação no esporte**. 3. ed. Barueri: Manole Ltda, 2016.
- BOTTERWECK, A. A. M. et al. Intake of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene and Stomach Cancer Risk: Results from Analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, V. 38, p. 599-605, 2000.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Atlas da evolução dos remanescentes florestais e ecossistemas associados no domínio da Mata Atlântica no período de 1990-1995**. São Paulo, 2003.
- BRITO, V. B. et al. Long-term sucrose and glucose consumption decreases the δ -aminolevulinatase activity in mice. **Nutrition**, V. 23, p. 818-826, 2007.
- BORELLA, M. L. L.; VARELA, Q. D. **Antioxidantes enzimáticos**. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas: Ed. Ulbra, 2004.
- CAVALCANTI, M. S.; MILANEZ, A. I. Hyphomycetes isolados da água e do solo da reserva florestal de Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, V. 21, n. 4, p. 857-862, 2007.

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

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, V. 5, p. 421-437, 2013.

CHLUDIL, H. D.; CORBINO, G. B.; LEICACH, S. R. Soil quality effects on Chenopodium album flavonoid content and antioxidant potential. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 56, p. 5050-5056, 2008.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: Plantas para o futuro – Região sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p.15-19, 2011.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug Discovery and development. **Journal of Natural products**, V. 60, n. 1, p. 52-59, 1997.

DELMONDES, P. H. et al. Substâncias antioxidantes presentes nos vegetais. **Revista Eletrônica da Univar**, V. 1, n. 9, p. 1-5, 2013.

DOLINSKY, M. **Nutrição funcional**. São Paulo: Roca, 2009.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, V. 43, p. 61-68, 1997.

FORZZA, R. C. et al. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, V. 201, p. 1203-1209, 1998.

FULLER, B. B. **Antioxidants and anti-inflammatories**. In: DRAELOS, Z. Cosmetic dermatology: Products and procedures. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2016.

GARCEZ, M. et al. **Radicais livres e espécies reativas**. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1 ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2004.

GONÇALVES, F. J. T. et al. Patogenicidade de espécies de Botryosphaeriaceae emdofticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará em manga e umbu-cajá. **Summa Phytopathologica**, V. 42, p. 43-52, 2016.

GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL – Secretária de Planejamento e Gestão. **Projeto conservação da biodiversidade como fator de contribuição ao desenvolvimento do estado do Rio Grande do Sul**. 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 5. ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen radicals and the nervous system. **Trends in Neurosciences**, V. 8, p. 22-26, 1985.

HALLIWELL, B. **Introduction: free radicals and human disease – trick or treat?** In: THOMAS, C. E.; KALYANARAMAN, B. Oxygen radicals and the disease process. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HERTWECK, C. Hidden biosynthetic treasures brought to light. **Nature Chemical Biology**, V. 5, p. 450-452, 2009.

HISS, H. **Cinética de fermentações: uma análise matemática da atividade microbiana**. 1 ed. Clube de autores, 2013.

HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. **Isolamento e caracterização de fungos patogênicos de importância médica**. Jundiaí: Paco Editorial, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS. **Bioma Pampa**. 2016. Disponível em: <<http://www.ibflorestas.org.br/bioma-pampa.html>>. Acesso em: 05 mai. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Mapa de biomas do Brasil**. 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 16 jul. 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de biomas e de vegetação**. Comunicação social, 21 de maio de 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 16 jul. 2016.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia e imunologia oral**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KIRK, P. M. et al. **Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi**. 10. ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KLAUNING, J. E.; KAMENDULIS, L. M. **Carcinogênese Química**. In: KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull. 2 ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2012.

KÖNIG, F. et al. Bioma Pampa: Interações entre micro-organismos e espécies vegetais nativas. **Revista de Ciências Agrárias**, V. 37, p. 3-9, 2014.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, V. 16, p. 433-441, 2003.

KUMAR, V. et al. **Robbins & Cotran: Patologia -Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LI, H. et al. Cytotoxic norsesquiterpene peroxides from the endophytic fungus *Talaromyces flavus* isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala*. **Journal of Natural Products**, V. 74, p. 1230-1235, 2011.

LIU, D. **Botryosphaeria and Lasiodiplodia**. In: LIU, D. Molecular Detection of human fungal pathogens. Nova Iorque: CRC Press, 2011.

LOPES, H.; SIQUEIRA, J. F. **Endodontia: biologia e técnica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

LU, H. Effects of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on DNA adduct formation and arylamine N-acetyltransferase activity in human bladder tumour cells. **Journal of Applied Toxicology**, V. 22, p. 37-44, 2002.

LYAL, F.; BELFORT, M. **Pré-eclâmpsia: Etiologia e prática clínica**. Porto Alegre: AMGH, 2012.

MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food antioxidants: Technological, Toxicological and health perspectives**. Nova Iorque: Marcel Dekker, Inc, 1995.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. **Reactive oxygen species: Response of algal cells**. Journal of Plant Physiology, V.157, p. 183-193, 2000.

MINISTÉRIO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE. **Pampa**. 2016. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/pampa>>. Acesso em: 06 mai. 2016.

MOLINARI, G. Natural products in drug Discovery: Present status and perspectives. **Pharmaceutical Biotechnology**, V. 655, p. 13-27, 2009.

MOU, Y. et al. Antimicrobial and antioxidant activities and effect of 1-hexadecene addition on palmarumycin C2 and C3 yields in liquid culture of endophytic fungus *Berkleasmium* sp. DZF12. **Molecules**, V. 18, p. 15587-15599, 2013.

MUKHOPADHYAY, A. K. **Antioxidants: Natural and synthetic**. Kiel: Armani International Publishers, 2006.

NASCIMENTO, A. K. C. L. **Desenvolvimento de um vetor bifuncional para a bactéria endofítica *Enterobacter agglomerans* e *Escherichia coli***. 2006. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2006.

NITSCHKE, B. M.; MEYER, V. **Transcriptomics of industrial filamentous fungi: A new view on regulation, physiology and application**. In: ESSER, K. The mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research - Fungal Genomics. 2. ed. Berlin: Springer, 2014.

NOGUEIRA, L. G. **Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenosquinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori***. 2012. 106 f. Tese (Doutorado Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, SP, 2012.

NOVAES, G. M. et al. Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. **Revista da Universidade do Vale do Rio Verde**, V. 11, p. 535-539 2013.

OLANO, C.; MÉNDEZ, C.; SALAS, J. A. Molecular insights on the biosynthesis of antitumour compounds by actinomycetes. **Microbial Biotechnology**, V. 4, p. 144-164, 2011.

PANDI, M. et al. Isolation and detection of taxol, an anticancer drug produced from *Lasiodiplodia theobromae*, an endophytic fungus of the medicinal plant *Morinda citrifolia*. **African Journal of Biotechnology**, V. 10, p. 1428-1435, 2011.

PHILLIPS, A.J. L. et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species know from culture. **Studies in Mycology**, V. 76, p. 51-167, 2013.

PREISER, J. C. **Oxidative stress**. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, V. 36, p. 147-154, 2012.

PORAWSKI, M. **Poluição e estresse oxidativo**. In: MORRONI, N. P. Estresse Oxidativo e Antioxidantes. 1 ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2002.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food**: Pratical applications. 1 ed. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2001.

RAHMAN, T. et al. Oxidative stress and human health. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, V. 3, p. 997-1019, 2012.

RAO, D. G. **Introduction to Biochemical Engineering**. 2. ed. Nova Deli: Tata McGraw Hill Education Private Limited, 2010.

REZENDE, L. C. de. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia**. Tese de doutorado. Universidade Federal da Bahia. 2010.

TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. **Fitopatologia**: conceitos e exercícios de laboratório. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

SADAVA, D. et al. **Vida**: a ciência da biologia. V. 1. célula e hereditariedade. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

SANTOS, A. D. dos. **Atividade antioxidante de extratos vegetais da flora brasileira: Estudo com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e teoria do funcional da densidade (TFD)**. 2006. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 2006.

SANTOS, S. N. **Bioprospecção de biomoléculas isoladas de fungos endofíticos de *Combretum leprosum* do bioma Caatinga**. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 2012.

SATYANARAYANA, T.; JOHRI, B. N.; PRAKASH, A. **Microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology**. Springer, 2012.

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

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

SHAHIDI, F. **Natural antioxidants: Chemistry, health effects and applications**. Champaign: Aocs Press, 1997.

SHU, Y. Z. Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. **Journal of Natural Products**, V. 61, p. 1053-1071, 1998.

SIES, H. Strategies of antioxidante defense. **European Journal of Biochemistry**, V. 215, p. 213-219, 1993.

SILVA, I. P. da. Fungos endofíticos: Fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, V. 10, p. 3888-3905, 2014b.

SILVA, J. C. de S. **Estudos biotecnológicos de leite de cabras e ambiente de produção**. Maceió: Clube de autores, 2014a.

SIZER, F.; WHITNEY, E. **Nutrição: Conceitos e controvérsias**. 8. ed. Barueri: Manole, 2003.

SPADA, P. K. W. D. S.; SILVA, C. O. da. **Antioxidantes não enzimáticos**. In: SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas: Ed. Ulbra, 2004.

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.

TEITEN, M. H. et al. Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its proapoptotic and antiinvasive potential via the inhibition of NF- κ B activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, V. 21, p. 3850-3858, 2013.

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

TSAO, R. **Synergistic interactions between antioxidants used in food preservation**. In: SHAHIDI, F. Handbook of antioxidants for food preservation. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2015.

VASCONCELOS, T. B. de. et al. Radicais Livres e antioxidantes: proteção ou perigo. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, V. 16, p. 213-219, 2014.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

XIAO, J. et al. Secondary metabolites from the endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and their antifungal, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, V. 62, p. 3584-3590, 2014.

XIAO, Y. et al. Antifungal screening of endophytic fungi from *Ginkgo biloba* for discovery of potent anti-phytopathogenic fungicides. **FEMS Microbiology Letters**, V. 339, p. 130-136, 2013.

YARBROUGH, G. G. et al. Screening microbial metabolites for new drugs – theoretical and practical issues. **The Journal of Antibiotics**, V. 46, n. 4, p. 535-544, 1993.

YUAN, Y. et al. Bioactive metabolites isolated from *Penicillium* sp. YY-20, the endophytic fungus from *Ginkgo biloba*. **Natural Product Research**, V. 28, p. 278-281, 2014.

WANG, L. et al. Hypovirulence of the Phytopathogenic Fungus *Botryosphaeria dothidea*: Association with a Coinfecting Chrysovirus and a Partitivirus. **Journal of Virology**, V. 88, p. 7517–7527, 2014.

WANG, Q. X. et al. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. **Fitoterapia**, V. 82, p. 777–781, 2011.

ZHAO, J. et al. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Gliomastix murorum* Ppf8 associated with the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. **Journal of Medicinal Plants Research**, V. 6, p. 2100-2104, 2012b.

ZHAO, J. et al. Endophytic fungi from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] produce antioxidant cajaninstilbene acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, V. 60, p. 4314-4319, 2012a.

ZHAO, J. et al. In vitro antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Food Research International**, V.56, p. 243-251, 2014.

ZHONG, L. et al. Botrallin from the endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12 and its antimicrobial activity. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 10, p. 18174-18178, 2011.

ZERIKLY, M.; CHALLIS, G. L. Strategies for the discovery of new natural products by genome mining. **ChemBiochem**, V. 10, p. 625-633, 2009.

ANEXO A

Tabela1 – Localidade, espécie, nome popular e família botânica das plantas e seus respectivos fungos isolados avaliados quanto à produção de compostos antioxidantes.

Isolado	Localidade	Espécie da planta	Nome popular da planta	Família botânica
VP82	Santiago (Vila Paraíso) - RS	<i>Senecio brasiliensis</i>	maria-mole	Asteraceae
OR13	Plantas Ornamentais - Santa Maria-RS	cheflera	<i>Schefflera actinophylla</i>	Araliaceae
VP83	Santiago (Vila Paraíso) - RS	<i>Senecio brasiliensis</i>	maria-mole	Asteraceae
VP76	Santiago (Vila Paraíso) - RS	<i>Eryngium horridum</i>	gravatá-do-banhado	Apiaceae
VP41	Santiago (Vila Paraíso) - RS	<i>Solanum stipulaceum</i>	jurubeba-roxa	Solanaceae
OR12	Plantas Ornamentais - Santa Maria-RS	cheflera	<i>Schefflera actinophylla</i>	Araliaceae
VP51	Santiago (Vila Paraíso) - RS	<i>Solanum americanum</i>	maria-pretinha	Solanaceae
VP53	Santiago (Vila Paraíso) - RS	<i>Solanum americanum</i>	maria-pretinha	Solanaceae
VP77	Santiago (Vila Paraíso) - RS	<i>Eryngium horridum</i>	gravatá-do-banhado	Apiaceae
VP84	Santiago (Vila Paraíso) - RS	<i>Senecio brasiliensis</i>	maria-mole	Asteraceae
VP65	Santiago (Vila Paraíso) - RS	<i>Baccharis dracuntifolia</i>	vassoura-lajeana	Asteraceae