



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS**  
**NATURAIS DA AMAZÔNIA**

**KAMILA RANGEL PRIMO FERNANDES**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Virola***  
***venosa* (Poepp. Ex A. DC) Warb. COM POTENCIAIS DE ATIVIDADES**  
**BIOLÓGICAS**

**MANAUS**  
**2015**

**KAMILA RANGEL PRIMO FERNANDES**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Virola*  
*venosa* (Poepp. Ex A. DC) Warb. COM POTENCIAIS DE ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Frazão Teixeira**

**MANAUS  
2015**

**KAMILA RANGEL PRIMO FERNANDES**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Virola*  
*venosa* (Poepp. Ex A. DC) Warb. COM POTENCIAIS DE ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data de aprovação \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Frazão Teixeira  
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

---

Prof. Dr. Rudi Emerson Procópio  
Universidade do Estado do Amazonas - UEA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Nunomura  
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

**MANAUS  
2015**

*Ao meu querido esposo Júnior, por  
toda paciência e dedicação, pelo amor,  
carinho e estímulo que me ofereceu, dedico-  
lhe esta conquista com todo meu amor,  
respeito e gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

Àquele que em seu infinito amor e graça, tem me abençoado e cuidado da minha família, dando-lhes saúde e sabedoria, e possibilitando momentos como este de grande alegria, vitória e paz, obrigada Deus.

Aos meus pais, que nos momentos mais difíceis da minha vida tem me apoiado e ajudado, sempre orando por mim e incentivando, independente das situações sempre mostram uma maneira de ajudar.

À minha orientadora Professora Ana Frazão, por ter dado a oportunidade de ser guiada por sua sabedoria, pela amizade que construímos ao longo do tempo, pela paciência e contribuição na realização desse trabalho.

À minha querida Professora Antônia Queiroz, pela enorme contribuição, tanto na realização desse trabalho, quanto na minha formação de pesquisadora, ao qual nos momentos de dificuldades se mostrou presente.

Ao querido Professor Afonso, pela generosidade de me acolher no Laboratório de Química da UFAM e pelas várias contribuições com este trabalho.

Ao querido Professor Emerson Lima, que me acolheu com muita simplicidade e por diversas contribuições, disponibilizando o Laboratório de Farmácia da UFAM e aos técnicos Carla e Leonard.

À querida Professora Rita Saraiva Nunomura, por toda ajuda concedida, disponibilizando reagentes, equipamentos, e seus alunos Ingrity e Paulo Senna que me auxiliarem em alguns experimentos.

Às alunas de iniciação científica, Laís, Rafisa e Alana, pela ajuda durante algumas fases experimentais do trabalho.

Às amigas do coração, Marta, Beatriz, Jéssica, Sarah, Júlia e Kátia pela amizade que conseguimos construir ao longo desses dois anos.

Aos meus colegas da turma de biotecnologia 2013. De forma geral, agradeço de coração.

Aos meus colegas do Laboratório de Biorgânica da UEA, Alzira, Joaquim, Hilton Marcelo, Sr. Emerson Bacelar e Andssré Higa, obrigada por tanta ajuda, pelos bons momentos de convivência.

Aos meus queridos colegas do LabGema, Nataly, Flávia, Paulo Alexandre, Elissandro Banhos, Adriana Spiroto, Greiciane Andrade, por estarem sempre dispostos a ajudar, pelos momentos divertidos, e por toda contribuição na realização deste trabalho.

## RESUMO

A pesquisa dos fungos endofíticos, principalmente os presentes em espécies tropicais, é um campo inovador na descoberta de novos produtos fármacos. Não havendo estudos a respeito da microbiota endofítica da espécie *Virola venosa* a pesquisa em questão proporciona informações tanto da hospedeira quanto de seus endofíticos isolados. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana e avaliar o potencial antioxidante de fungos endofíticos isolados de *Virola venosa* e de seus extratos vegetais. Foi realizado o isolamento e caracterização de fungos endofíticos de partes de *V. venosa*. Foi realizado screening fitoquímico dos extratos vegetais, e foram investigados compostos fenólicos e flavonóides totais tanto nos extratos vegetais quanto nos fúngicos. Para isso, foram coletados na cidade de Manaus – Amazonas (latitude: 3° 6,058`S longitude: 59° 58,459`W), galhos, folhas e caule de *V. venosa* tanto para obtenção dos extratos hexânicos, acetato de etila e metanólico, quanto para o isolamento dos fungos endofíticos. Foram obtidos 105 fungos isolados e distribuídos em 16 grupos, considerando suas características macro-morfológicas que revelaram a presença de prováveis gêneros como: *Phomopsis*, *Xylaria*, *Penicillium* e leveduras. Nos ensaios de atividade antioxidante resultados representativos nos extratos brutos de caule metanol com 84% de captura de DPPH, IC50 13,4 µg/mL, folhas em metanol com 85% de captura IC50 30 µg/mL e caule acetato de etila, que apresentou 84,1% de captura do radical livre DPPH e IC50 igual a 34,73µg/mL. Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados utilizando como cepas teste as bactérias *Escherichia. coli*, *Pseudomonas aureuginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, e o fungo *Candida albicans*, do qual os extratos vegetais pertinentes ao caule ACOEt e folhas em metanol inibiram o crescimento de *Pseudomonas aureuginosa* numa concentração de extrato bruto de folhas 500 µg/mL e caule em metanol a 125 µg/mL. Para os extratos fúngicos, houve inibição de *Candida albicans* a partir de 7,8 µg/mL do extrato bruto do meio fermentado de um *Colletotrichium* e 15,6 µg/mL extrato bruto do micélio de um *Penicillium*, ambos com inibição fungistática. É importante ressaltar que os estudos aqui realizados mostram a correlação entre os resultados da investigação dos ensaios, com a diversidade de fungos da hospedeira e dos resultados dos seus extratos vegetais, buscando informações sobre o potencial que os fungos endofíticos de *Virola venosa* possuem e representam para a biotecnologia.

**Palavras - chave:** *Virola venosa*, Fungos endofíticos, Antioxidante, Antimicrobiana

## ABSTRACT

The research of endophytic fungi, especially those present in tropical species, is an innovative field in the discovery of new drugs. There are no studies on the endophytic microbiota *Virola venosa* species the research in question provides information from the host as from their endophytic isolates. The objective of this study was to investigate the antimicrobial activity and evaluate the antioxidant potential of endophytic fungi isolated from *V. venosa* and their plant extracts. It was carried out the isolation and characterization of endophytic fungus from *V.venosa* parts. It has been investigated phenolic compounds and flavonoids based on previous phytochemical selection (Screening) extracts of plants. For this, it was collected in Manaus Amazonas (latitude: 3. 6,058`S longitude: 59. 58,459`W), branches, leaves and stem *V. venous* both to obtain the hexane extracts, ethyl acetate and methanol, as for the isolation of endophytic fungi. 105 isolates were obtained and distributed into 16 groups, considering their macromorphological characteristics that reveal the probable presence of genres such as *Phomopsis*, *Xylaria*, *Penicillium* and yeasts. In the antioxidant activity assays represented results in crude extracts stem methanol 84% DPPH capture, 13,4 µg/mL IC50, leaf methanol 85% capture IC50 30 µg/mL, stem ethyl acetate has shown 84,1% of the free radical capture and DPPH IC50 equal to 34,7µg/mL. The antimicrobial activity tests were carried out using as test strains the bacteria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureuginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, which the relevant plant extracts of leaves and stems in methanol inhibited the growth of *Pseudomonas aureuginosa* at a concentration of crude leaf extract 500 µg/ml in methanol and stem 125 µg/ml. For fungal extracts, there was inhibition of *Candida albicans* from 7,8 µg/ml on a fermented crude extract of a *Colletotrichium* and 15,6 µg/ml crude extract of mycelium of a *Peniciullium*, both presented fungistatic reaction. It is important to point out that the studies conducted here show the correlation between the results of the tests and the diversity of fungi existent on the host. Also the correlation between the results of its plant extracts. All of this with the intention of seeking information about the potential that endophytic fungi of *Virola venosa* have for biotechnology.

**Key words:** *Virola venosa*, Endophytic fungi, Antioxidant, Antimicrobial



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS <sup>+</sup>	2,2 – azinobis (3 – etilbenzeno – 6- ácido sulfônico)
ACOEt	Acetato de etila
BD	Batata Dextrose
BDA	Batata Dextrose Ágar
BHI	Brain Heart Infusion Ágar
Ca	Caule
CIM	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2 - difenil - 1- picril-hidrazil
Fo	Folhas
Ga	Galhos
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
nm	Nanômetros
MHA	Muller Hilton Ágar
mL	Mililitro
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
SB	Sabouraud Ágar
SPE	Sólid Phase Extration
TTC	Cloreto de 2,3,5 Trifeniltetrazólio
UV	Ultravioleta
µg	Micrograma
µL	Microlitros
µm	Micrômetros

## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Tabela 1</b> - Substâncias com atividade antimicrobiana isoladas de fungos endofíticos.....	25
--	----

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 2</b> – Metodologia realizada na prospecção fitoquímica.....	37
<b>Tabela 3</b> – Grupos de fungos e seus prováveis gêneros.....	43
<b>Tabela 4</b> – Quantidade de extratos fúngicos obtidos.....	44
<b>Tabela 5</b> – Resultado da prospecção dos constituintes químicos.....	45
<b>Tabela 6</b> – Determinação de fenóis em extratos vegetais.....	46
<b>Tabela 7</b> – Determinação de fenóis totais em extratos fúngicos – SPE.....	47
<b>Tabela 8</b> - Determinação de fenóis totais em extratos fúngicos – Micélio/ MeOH.....	48
<b>Tabela 9</b> – Determinação de flavonóides totais em extratos vegetais.....	49
<b>Tabela 10</b> – Determinação de flavonóides totais em extratos fúngicos – Meio fermentado –SPE.....	50
<b>Tabela 11</b> – Determinação de flavonóides totais em extratos fúngicos – SPE.....	51
<b>Tabela 12</b> – Resultado do teste preliminar antimicrobiano entre extraois de <i>V. venosa</i> e bactérias/fungos – teste.....	57
<b>Tabela 13</b> - Resultado do teste de atividade antimicrobiana entre extratos de <i>V. venosa</i> e bactérias/fungos – teste.....	60
<b>Tabela 14</b> - Resultado do teste de micro-organismos, extratos fúngicos – extratos do micélio em metanol de <i>V. venosa</i> frente bactécrias/fungo - teste.....	62

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Figura 1</b> – Copa do gênero <i>Virola</i> .....	18
<b>Figura 2</b> – Frutos de <i>Virola venosa</i> .....	19
<b>Figura 3</b> – Estrutura química do ácido Cinâmico.....	20
<b>Figura 4</b> – Estrutura química da Crisina.....	21
<b>Figura 5</b> - Comparação de infecção de endófito e fitopatógeno.....	23
<b>Figura 6</b> – Estrutura química do taxol.....	24

### CAPÍTULO I

<b>Figura 7</b> – Fluxograma de extração.....	35
<b>Figura 8</b> – Partes da hospedeira e crescimento de fungos.....	42
<b>Figura 9</b> – Flavonas de <i>Virola venosa</i> .....	49
<b>Figura 10</b> - Valores correspondentes de concentração de ácido gálico referente às moléculas com atividade antioxidante presente nos extratos vegetais, a partir dos ensaios utilizando DPPH.....	52
<b>Figura 11</b> – Atividade antioxidante dos extratos fúngicos - SPE.....	53
<b>Figura 12</b> – Atividade antioxidante dos extratos fúngicos – Micélio.....	54
<b>Figura 13</b> - Atividade antioxidante ABTS <sup>+</sup> nos extratos de caule e folha MeOH.....	55
<b>Figura 14</b> – Atividade antioxidante – inibição do Superóxido com extratos de caule e folha em MeOH.....	56
<b>Figura 15</b> – Resultado do CIM entre extratos de <i>V venosa</i> e <i>P. auriginosa</i> .....	58
<b>Figura 16</b> – Atividade antifúngica dos extratos fúngicos de <i>V. venosa</i> frente a <i>C. albicans</i> .....	61
<b>Figura 17</b> – Atividade antifúngica dos extratos de micélio fúngico de <i>Virola venosa</i> frente a <i>C. albicans</i> . Concentração mínima inibitória para cada extrato testado.....	63
<b>Figura 18</b> - Crescimento de <i>Candida albicans</i> após 24h.....	64

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	14
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	16
2.1 Família Myristicaceae.....	16
2.1.1 Importância econômica.....	16
2.1.2 Importância etnofarmacológica.....	17
2.2 Gênero <i>Virola</i> .....	18
2.3 Espécie <i>Virola venosa</i> .....	19
2.4 Metabólitos secundários nas plantas.....	19
2.5 Fungos.....	21
2.6 Fungos endofíticos.....	22
2.7 Endofíticos e suas aplicações biotecnológicas.....	23
2.8 Fungos endofíticos na produção de antimicrobianos.....	25
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	26
3.1 Geral.....	26
3.2 Específicos.....	26
<b>4 REFERENCIAS.....</b>	27
<b>CAPÍTULO I.....</b>	31
Resumo.....	32
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	33
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	34
2.1 Coleta do material.....	34
2.2 Obtenção dos extratos vegetais: (Hexânicos, AcOEt e MeOH).....	34
2.3 Isolamento dos fungos endofíticos.....	35
2.3.1 Purificação dos isolados.....	36
2.3.2 Caracterização dos isolados.....	36
2.4 Obtenção dos extratos fúngicos.....	36
2.5 Prospecção fitoquímica dos extratos vegetais de <i>V. venosa</i> .....	37
2.6 Determinação de fenóis e flavonóides totais dos extratos vegetais e de fungos de <i>V. venosa</i> .....	38
2.6.1 Determinação de fenóis totais.....	38
2.6.2 Determinação de flavonóides totais.....	38
2.7 Estudo da atividade antioxidante dos extratos vegetais e fúngicos de <i>V. venosa</i> .....	38
2.7.1 Atividade antioxidante frente ao ABTS <sup>+</sup> .....	39
2.7.2 Atividade antioxidante frente ao SUPERÓXIDO.....	39
2.8 Análise da atividade antimicrobiana de extratos vegetais e fúngicos de <i>V. venosa</i> .....	40
2.8.1 Micro-organismos.....	40
2.8.2 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais – Aplicação dos discos de difusão.....	40
2.8.3 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana – Screening em placa de ELISA.....	41
2.8.4 Atividade antimicrobiana quantitativa dos extratos vegetais e fúngicos – Determinação da concentração mínima inibitória – CIM.....	41
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	42
3.1 Isolamento e purificação dos fungos endofíticos.....	42
3.2 Caracterização dos fungos isolados.....	43
3.3 Extratos fúngicos.....	44
3.4 Prospecção fitoquímica dos extratos vegetais de <i>V. venosa</i> .....	44
3.5 Determinação de fenóis totais dos extratos vegetais e de fungos endofíticos de <i>V. venosa</i> .....	45
3.5.1 Extratos vegetais – Fenóis totais.....	45
3.5.2 Extratos fúngicos – Meio fermentado – SPE.....	47
3.5.3 Extratos fúngicos - Micélio MeOH.....	47

3.6 Determinação de flavonóides totais dos extratos vegetais e de fungos endofíticos de <i>Virola venosa</i> .....	49
3.6.1 Extratos vegetais.....	49
3.6.2 Extratos fúngicos – Meio fermentado – SPE.....	50
3.6.3 Extratos fúngicos – Micélio MeOH.....	50
3.7 Ensaio de atividade antioxidante.....	52
3.7.1 Capacidade antioxidante dos extratos vegetais de <i>Virola venosa</i> - DPPH.....	52
3.7.2 Capacidade antioxidante dos extratos fúngicos de <i>Virola venosa</i> – DPPH- Meio fermentado- SPE.....	53
3.7.3 Capacidade antioxidante dos extratos fúngicos – Micélio - MeOH.....	54
3.7.4 Atividade antioxidante dos extratos vegetais ABTS <sup>+</sup> e SUPERÓXIDO.....	54
3.7.5 Capacidade antioxidante - Método ABTS <sup>+</sup> .....	55
3.7.6 Capacidade antioxidante – Método SUPERÓXIDO.....	56
3.8 Atividade antimicrobiana.....	57
3.8.1 Atividade antimicrobiana qualitativa dos extratos vegetais – Aplicação dos discos de difusão.....	57
3.8.2 Atividade antimicrobiana quantitativa dos extratos vegetais – Determinação da concentração mínima inibitória – CIM.....	58
3.8.3 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana – Screening em placa de ELISA- extratos fúngicos – Meio fermentado- SPE.....	60
3.8.4 Atividade antimicrobiana quantitativa dos extratos fúngicos – Meio fermentado – SPE – CIM .....	61
3.8.5 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana – Screening em placa de ELISA – Extratos fúngicos – Micélio - MeOH.....	62
3.8.6 Atividade antimicrobiana quantitativa dos extratos fúngicos – Micélio MeOH – Determinação da concentração mínima inibitória – CIM.....	63
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	65
<b>5 REFERENCIAS</b> .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

Diversidade biológica ou biodiversidade pode ser definida como a variedade e variabilidade existentes entre organismos vivos e as complexidades ecológicas nas quais eles ocorrem. Ela pode ser entendida como uma associação de vários componentes hierárquicos como: ecossistemas, comunidades, espécies, populações e genes em uma área definida (GUERRA & NODARI, 1999).

A biotecnologia em relação à saúde compreende qualquer exploração tecnológica da biodiversidade para resolver problemas de saúde do homem. Por isso qualquer que seja o projeto de identificação, exploração e avaliação da biodiversidade, deve seguir métodos científicos e procedimentos biotecnológicos especiais, particularmente aqueles associados com a biologia celular, biologia molecular, bioquímica, fitoquímica, fitofarmacologia, taxonomia clássica, micologia, bacteriologia, botânica, fisiologia de plantas e etnobotânica (GARCIA,1995).

Dentre todas as ciências citadas acima podem estar guardadas uma gama de novos produtos de importância econômica, tais como alimentos, fitoterápicos, cosméticos e fitofármacos, originados dos recursos genéticos dessa biodiversidade (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Há milhares de anos a ciência busca nos produtos naturais, como metabólitos de plantas e venenos animais, resoluções para diversos problemas de saúde humana. Distintos produtos naturais, principalmente os derivados de plantas, foram à base de vários medicamentos populares, tais como, por exemplo, a aspirina (ácido acetil salicílico) derivada da salicina, encontrada em diversas plantas do gênero *Salix*; digitoxina um fármaco utilizado como cardiotônico e antiarrítmico derivado dos vegetais *Digitalis purpúrea* e da *Digitalis lanata*; morfina fármaco de alto poder analgésico isolado a partir da resina da *Papaver somniferum*; quinina um alcalóide com funções antitérmicas, antimaláricas e analgésicas isolada de diversas plantas do gênero *Cinchona*, e a pilocarpina alcalóide extraído das folhas de *Pilocarpus microphyllus* conhecida por obter efeito diaforético (BUTLER, 2004).

Resoluções de problemas da saúde humana também ocorreram através da descoberta acidental da penicilina por Fleming em 1928, isolada do fungo *Penicillium notatum*, deu início aos estudos investigativos dos fungos, uma das fontes mais prolíficas de produtos naturais. A partir desses micro-organismos, ocorreu um grande avanço na área dos antibióticos imunodepressores e medicamentos antineoplásicos (STROBEL *et al.*, 2004).

Os micro-organismos (fungos, bactérias entre outros utilizados) desempenham um papel fundamental na elaboração de novos produtos naturais que podem ser utilizados na indústria farmacêutica (humana, animal, alimentícia e agrícola). Os fungos encontrados no interior de espécies vegetais, denominados fungos endofíticos ou endófitos, apresentam um enorme potencial na produção de substâncias novas e bioativas (CHAPLA, 2013).

Micro-organismos endofíticos só receberam maior atenção há pouco mais de vinte anos, quando foi verificado que eles podem desempenhar funções importantes no processo de adaptação da planta e podem produzir uma infinidade de metabólitos, tanto primários quanto secundários, os quais apresentam diferentes aplicações biotecnológicas (produção de vacinas, enzimas, antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos), o que representa um mercado de dezenas de bilhões de dólares em todo o mundo (AZEVEDO & ARAÚJO, 2006).

A maior parte da riqueza conferida ao Brasil está vinculada à Amazônia considerada o maior conjunto de florestas tropicais do planeta. Esta área possui a mais rica variedade de espécies vegetais e animais do mundo, as quais têm sido exploradas de forma inconseqüente e, por vezes, irreversível, ocasionando uma diminuição considerável no número de espécies amazônicas (SILVÉRIO, 2004; FEARNSSIDE, 2006).

Devido à alta biodiversidade existente em regiões tropicais e o nível de propriedades pouco conhecidas, possivelmente há inúmeras espécies de plantas, animais e micro-organismos ainda por serem descobertas. (OLIVEIRA, 2010).

Levando-se em consideração os fatores citados acima, percebe-se que as espécies amazônicas, sejam elas vegetais ou microbiológicas, precisam ser exploradas de forma sistemática e sustentável, a fim de que possam ser mais bem estudadas, gerando ciência a ponto de estabelecer processos tecnológicos de base biológica que beneficiem a sociedade, sobretudo a Amazônica.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Família Myristicaceae

A Família Myristicaceae é amplamente distribuída pelas regiões tropicais e subtropicais. Segundo Rodrigues (1980), o centro de distribuição mundial dessa família pantropical é a Ásia tropical, da Índia à Polinésia. Além da América e Ásia, a família está também representada na África e em Madagascar. Na América ela ocorre nos dois hemisférios, desde o sul do México e Antilhas Menores até Bolívia e parte etentrional do Rio Grande do Sul, no Brasil (BELOTA FILHO, 1994).

Caracterizada, principalmente, por apresentar quase que exclusivamente árvores medianas, arvoretas e árvores de dossel, raramente arbustos, a família Myristicaceae pode ser reconhecida, quando em estado vegetativo, por algumas características peculiares, como: tronco com entrenós bem definidos; casca do tronco, quando cortada ou ferida, exsudando seiva avermelhada em geral abundante e translúcida que em contato com o ar se oxida, passando a vermelho (exceto em *Osteophloeum* Warb.); folhas coriáceas, inteiras e sem estípulas; pecíolo profundamente canaliculado; filotaxia alterna, dística (RIBEIRO *et al.*, 1999).

Família de distribuição considerável em algumas regiões constitui-se num dos mais importantes elementos da flora regional. Possui 18 gêneros e 400 espécies. Segundo Belota Filho (1994), a bacia amazônica é o centro de distribuição da família no continente sul-americano, onde certas espécies são muito comuns. Nas Américas, a família é representada por cinco gêneros endêmicos, com aproximadamente 93 espécies: *Virola* Warb. (45 spp.), *Iryanthera* Warb. (24 spp.), *Compsonera* Warb. (16 spp.), *Otoba* A. DC. Ex Karsten (7 spp.) e *Osteophloeum* Warb. (1 spp.).

#### 2.1.1 Importância econômica

Segundo Rodrigues (1980), desde o descobrimento do Brasil, já se dava valor a algumas espécies de Myristicaceae, como planta útil da flora brasileira sob a denominação indígena de “hiboucouhu”, “bicuíba” e “ucuuba”. Dentre as mais conhecidas estão a *V. surinamensis* e a *V. sebifera*, pela produção do comercialmente conhecido como “sebo de ucuuba”, gordura proveniente das sementes destas espécies, de emprego tecnológico importante, ainda hoje, na saboaria e na produção de velas. Esta gordura é formada de ácidos graxos saturados (cáprico, láurico, mirítico, palmítico e esteárico) e insaturados (oléico e



linoléico). Dentre os componentes da gordura, assume grande importância econômica a trimiristina, um triglicéride de elevado valor na confecção de cremes e sabões para barba, ou produção de emoliente graxo em inúmeros preparados farmacêuticos. Seu elevado preço demonstra as necessidades industriais e reflete a intensa procura para dar maciez e suavidade nas fórmulas de perfumaria e cosméticos.

As ucuabas ainda provam o seu elevado valor nas confeitarias com a obtenção da laurina, um triglicéride de especial poder nutritivo. A torta proveniente dos resíduos do material gorduroso apresenta razoável teor em nitrogênio e é aplicada como alimento para gado, ou usada como adubo em mistura com cinzas (RODRIGUES, 1980).

A madeira de ucuuba ou bicuíba é largamente empregada na fabricação de compensados, e, como consequência do processo industrial, permite o uso de resíduos de produção na confecção de papéis tipo Kraft de boa qualidade. Os índices físicos obtidos na madeira são os melhores. (RODRIGUES, 1972).

Muitas espécies do gênero *Virola* são de grande importância ecológica e econômica, sendo usados em larga escala na fabricação de caixas, móveis, tanoaria, compensados e laminados (LOUREIRO *et al.*, 1989).

### 2.1.2 Importância etnofarmacológica

Algumas espécies de ucuuba ou bicuíba entram na medicina popular para cura do reumatismo, artrismo em geral cólicas, dispepsias e erisipelas. Segundo Le Cointe (1947), o cozimento da casca destas espécies é empregado nas assepsias de feridas como coadjuvante da cicatrização. A seiva cozida juntamente com camapu (*Physalis* sp.) é usada nas hemorróidas.

Braz Filho *et al.*, (1973) e Gottlieb *et al.*, (1973), e outros que trabalharam analisando quimicamente diversas espécies de *Virola*, isolaram e identificaram várias classes de compostos como alcalóides (triptaminas,  $\beta$ -carbonilas), diarilpropanóides (virolanois, lignanas e neolignanas), cromanonas, flavonóides (flavanas, isoflavanas e pterocarpanos), estilbenos, esteróides (sitosterol e stigmasterol). Alguns destes compostos já têm valor medicinal comprovado e outros estão sendo testados para este fim.

Schultes *et al.*, (1969) salientaram o emprego do rapé preparado da resina da casca de *V. theiodora*, *V. elongata* e *V. calophylla* como poderoso alucinógeno entre várias tribos indígenas da região amazônica.

Estudos químicos das folhas, cascas e raízes das espécies citadas, mostraram possuir derivados triptamínicos (N- metiltriptaminas, triptamina, N-dimetiltriptamina, 5- metoxi- N, N

dimetilriptamina), compostos estes realmente, com atividade desta natureza (RODRIGUES, 1980).

Barata e Baker (1973) verificaram que o extrato hexânico das folhas de *V. surinamensis* tem ação protetora contra a infecção por *Schistosoma mansoni*, quando aplicada topicamente, pois a ação quimioprolática da esquistossomose pertence, possivelmente, segundo os autores citados, a uma lignana ainda não identificada pelos métodos físicos e químicos. Estruturalmente, muitos dos compostos (lignana) isolados de espécies de *Virola* aproximam-se de outras substâncias da mesma classe possuidoras de ação antimicótica.

## 2.2 Gênero *Virola*

*Virola* é um gênero circunscrito apenas neotropical. Dos cinco gêneros de Myristicaceae próprios da América, este é o mais amplamente disperso. Sua distribuição vai da Guatemala e Antilhas Menores à Bolívia e Brasil Meridional (Rio Grande do Sul) e da costa ocidental da Colômbia e Equador à do Atlântico, no Brasil (DUCKE & BLACK, 1954).

O nome do gênero *Virola* teve origem popular da espécie usada pelos índios Sinemari da Guiana Francesa. Na flora brasileira recebe a denominação indígena de “hiboucouhu” faz parte da família das Myristicaceae e dos gêneros descritos nessa família. É o gênero que apresenta maior dispersão e maior número de espécies (RODRIGUES, 1980).

No Brasil existem cerca de trinta e cinco (35) espécies de *Virola* distribuídas na floresta neotropical, principalmente no Acre, Rondônia e Amazonas, (Rio Uatumã e Balbina), com árvores com 30 m de altura. Apresentam nomes populares de acordo com a região: árvore da cera, bicuíba vermelha, ucuúba da terra firme ou ucuúba da folha larga e na região amazônica é conhecida como pindaíba-roxa (RODRIGUES, 1980).

**Figura 1.** Copa da árvore do gênero *Virola*



**Fonte:** (Teixeira, 2007)

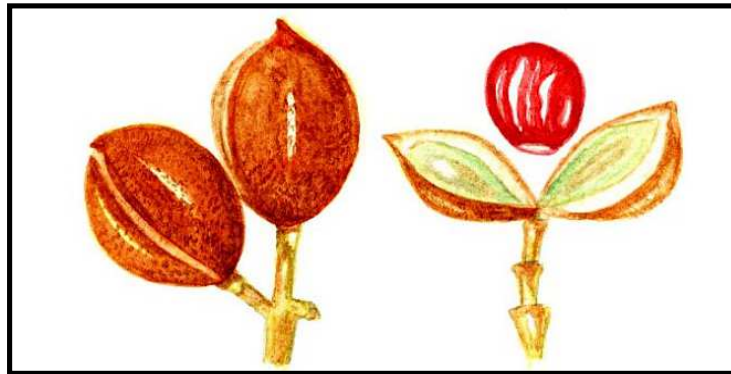
### 2.3 Espécie *Virola venosa*

A *Virola venosa* tem infrutescência 3,5-7,0 cm de comprimento, com as características na cor castanho marrom, puberulenta, glabrescente, pedúnculo até 0,9 cm de comprimento, fruto pedicelado grosso, 0,3 a 0,6 cm de comprimento, dois a seis frutos por infrutescência.

Cápsula subglobosa ou elipsóide, 1,9-2,2 x 1,6-1,8 cm, puberulenta, depois glabrescente, nitidamente carenada-arredada e paniculada, assimétrica, um lado do ápice mais elevado, arredondada na base, pericarpo liso, 0,3 cm de espessura, arilo laciniado até quase a base; semente elipsóide, 1,4-1,5 x 1,2-1,3 cm, lisa.

Arbusto ou árvore até 30 m mata de terra firme, em solo argilo-arenoso, ocasional em capoeira. A distribuição no Brasil está entre os estados do Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia. A dispersão ocorre geralmente quando o arilo é comido por macaco aranha (*Ateles paniscus*) (VAN ROOSMALEN & KLEIN, 1985, 1988).

**Figura 2.** Frutos de *Virola venosa*



**Fonte:** (Van Roosmalen, 1985)

### 2.4 Metabólitos secundários

Os constituintes químicos de todas as plantas e animais são sintetizados mediante reações enzimáticas, sendo estas classificadas bioquimicamente em dois grupos: o de metabólitos primários constituídos de açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, e biopolímeros como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos; e dos metabólitos secundários constituídos de alcalóides, terpenóides, esteróides, saponinas e vários outros (MANN, 1984, 1987).

Os metabólitos secundários são assim chamados, em função de não estar bem definido o seu papel no metabolismo de muitos organismos. Entretanto, em estudos mais recentes acredita-se que a maioria dos metabólitos secundários cumpre função de defesa contra predadores e patógenos, atuando como agentes alelopáticos, onde os metabólitos são

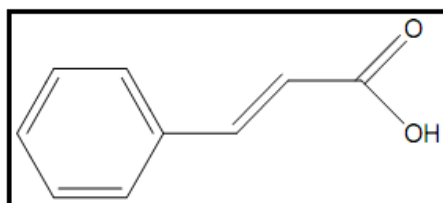
liberados. Podem também atrair, polinizadores ou dispersadores de sementes ou presas (SWAIN, 1973; LEVIN, 1976; CRONQUIST, 1977).

O conhecimento mais detalhado desses compostos permite atribuir importância aos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou animais superiores (CECHINEL e YUNES, 1998; NIERO *et al.*, 2003). Além disso, em determinadas circunstâncias, algumas plantas superiores podem produzir substâncias com propriedades antimicrobianas, denominadas fitoalexinas. Estas são produzidas como resposta imediata às agressões por fungos, bactérias, vírus ou nematóides, ou em função de determinados estímulos, como radiações ou agentes químicos (YUNES, 2001).

Alcalóides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos, predominantemente encontrados em angiospermas. São referidos como detentores de propriedades analgésicas, antiinflamatórias e antimicrobianas (HENRIQUES *et al.*, 2007).

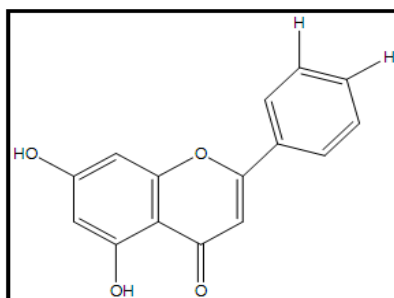
Compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas simples e complexas. Tais compostos apresentam ação sobre micro-organismos, provocando a privação do seu substrato e ruptura da membrana plasmática. Ácidos fenólicos, (figura 3), por exemplo, têm ação antibacteriana, cujo mecanismo exato desta ação é desconhecido (COWAN, 1999).

**Figura 3.** Estrutura química do ácido cinâmico.



**Fonte:** Cowan (1999)

Outra grande classe de compostos são os flavonóides, um grupo de polifenóis de baixo peso molecular, que constitui os metabólitos secundários de plantas. Estas substâncias são sintetizadas, muitas vezes, em resposta às infecções microbianas e, portanto, não é surpreendente que tenham sido demonstradas, *in vitro*, a ação antimicrobiana destas substâncias contra uma grande variedade de micro-organismos. Um bom exemplo de flavonóides com essa capacidade é a crisina (figura 4) que se liga a adesinas bacterianas, residindo aí a sua atividade antimicrobiana (COWAN, 1999; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

**Figura 4.** Estrutura química da Crisina

**Fonte:** COWAN, (1999); ZUANAZZI; MONTANHA, (2007).

## 2.5 Fungos

Os fungos são seres eucariotos, podendo ser haplóides, diplóides ou poliplóides; têm parede rígida quitinosa constituída de polímeros de amino-açúcares. São heterotróficos, dependendo das substâncias orgânicas disponíveis. Desprovidos de clorofila, são incapazes de produzir energia por meio da luz e do gás carbônico. Pertencentes ao reino Fungi, são altamente eficientes na degradação de uma ampla variedade de substratos e podem se apresentar nas formas leveduriforme e hifal. Responsáveis pela produção de substâncias de interesse comercial, os fungos também representam importantes agentes decompositores dos componentes primários da madeira, como lignina e celulose, o que resulta em um controle na produção de biomassa em um ecossistema florestal (MINAMI, 2003).

Realizam nutrição absorptiva liberando enzimas no meio em que habitam, quebrando macromoléculas presentes no meio, tais como carboidratos, proteínas e lipídios, em moléculas menores e mais solúveis, facilitando sua absorção. Outra característica é sua fonte primária de reserva de carboidratos que é o glicogênio, ao contrário das plantas que têm o amido para desempenhar esta função (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Existem fungos não filamentosos como as leveduras, por exemplo, que são unicelulares e reproduzem-se por brotamento. Outros ainda formam estruturas macroscópicas como os cogumelos comestíveis (AZEVEDO, 2001).

Atualmente, estima-se que o reino Fungi apresenta, aproximadamente, 1,5 milhões de espécies com representantes habitando praticamente todos os ecossistemas existentes no planeta (AZEVEDO, 2002). Ainda assim, atenção especial deve ser dispensada com relação à preservação destes micro-organismos, pois segundo Chérfas (1991), tem-se observado um grande declínio no número de espécies fúngicas bem como na quantidade de indivíduos fúngicos na Europa, nos últimos tempos.

Os fungos apresentam grande diversidade entre si. Porém, possuem características em comum que os distinguem dos demais reinos. São organismos historicamente comparados às

plantas, com habilidade para utilizar quase qualquer fonte de carbono como alimento (AZEVEDO, 2001).

O reino Fungi está organizado em cinco filos, sendo eles: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (SILVA & COELHO, 2006).

## 2.6 Fungos endofíticos

Os endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX. Porém, foi Bary (1866) quem primeiro delineou uma possível distinção entre eles e patógenos de plantas. Definidos como assintomáticos, não produzindo, portanto, efeitos benéficos ou prejudiciais aos seus hospedeiros, permaneceram esquecidos praticamente até o final da década de 70, quando por uma série de motivos, começaram a chamar a atenção. Naquela época verificou-se que, longe de serem meros habitantes do interior de vegetais, possuíam propriedades de interesse como, por exemplo, conferir proteção contra insetos, pragas, outros micro-organismos patogênicos e inclusive contra herbívoros.

Em 1997 Hallmann propôs uma definição aos endófitos, eram considerados micro-organismos que são isolados do interior de tecidos vegetais superficialmente estéreis, e que não causam danos aparentes à planta hospedeira. Apesar de esta definição englobar os micro-organismos endofíticos que habitam internamente as partes subterrâneas da planta, ainda não era uma definição completa, por excluir ou simplesmente omitir as populações microbianas não cultiváveis difíceis de sobreviver em condições de laboratório e, portanto, pouco estudadas (ARAÚJO *et al.*, 2002).

Assim pode-se definir que fungos endófitos são todos micro-organismos, cultiváveis ou não, que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar mal ao hospedeiro e que não desenvolvem estruturas externas, excluindo desta maneira bactérias nodulantes e fungos micorrízicos (AZEVEDO & ARAÚJO, 2006)

A entrada de micro-organismos endofíticos na planta é feita por várias vias, sendo uma das principais através das raízes, por ranhuras causadas pelo atrito com o solo durante o crescimento. Alguns fungos associados às plantas iniciam seu ciclo de vida com a germinação do esporo, seguido do crescimento da hifa na folha ou superfície da raiz, e da entrada destes fungos endofíticos na planta. Aberturas naturais do hospedeiro como estômatos e hidatódios também podem favorecer a entrada dos fungos (WAGNER & LEWIS, 2000).

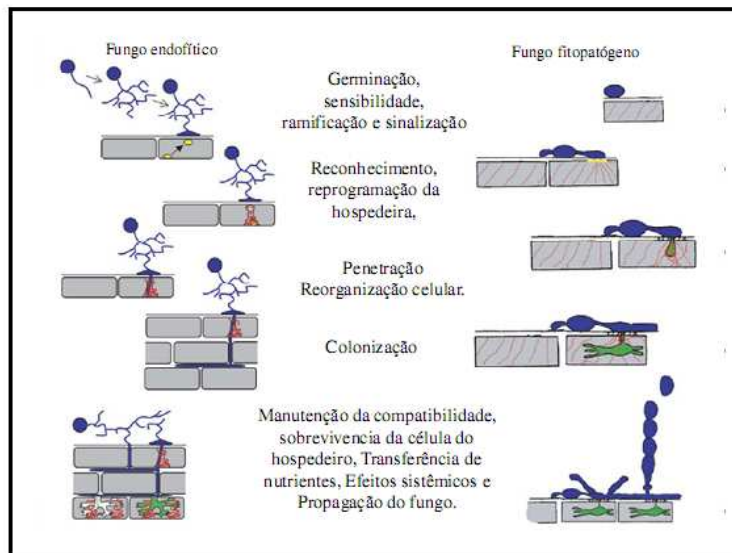
Os fungos endofíticos podem ser transmitidos de uma planta a outra de duas maneiras. A primeira chamada de transmissão vertical é aquela em que esses micro-organismos, presentes na planta-mãe, são transmitidos via semente, vivendo dessa forma, todo o seu ciclo

de vida dentro da planta. A segunda é denominada de transmissão horizontal em que os fungos endofíticos são passados de uma planta a outra através das raízes, das folhas, através dos estômatos, ou por qualquer lesão existente na planta (AHLHOLM *et al.*, 2002).

O que determina se um fungo é endofítico ou fitopatogênico é justamente o seu comportamento após sua entrada, ou seja, que consequências esse micro-organismo trará para a espécie hospedeira. Em resumo, os fitopatogênicos, ao entrar em contato com o hospedeiro, germinam com formação do apressório, liberam enzimas que degradam a parede celular levando à defesa da planta através da produção de proteínas de resistência (figura 5).

Os fungos endofíticos por sua vez germinam fora da célula vegetal, ocorrendo um reconhecimento e uma reprogramação da planta hospedeira para facilitar a entrada do endófito e finalmente o estabelecimento de uma relação simbiótica com a planta (KOGEL *et al.*, 2006).

**Figura 5.** Comparação de infecção de endofítico e fitopatogênicos.



**Fonte:** KOGEL, FRANKEN; HUCKELHOVEN (2006)

## 2.7 Endofíticos e suas aplicações biotecnológicas

Atualmente, sabe-se que endófitos podem produzir toxinas, antibióticos, fatores de crescimento e muitos outros produtos com potencial de atividades biológicas, além de exercerem outras funções de importância para a sobrevivência do hospedeiro (AZEVEDO *et al.*, 2002).

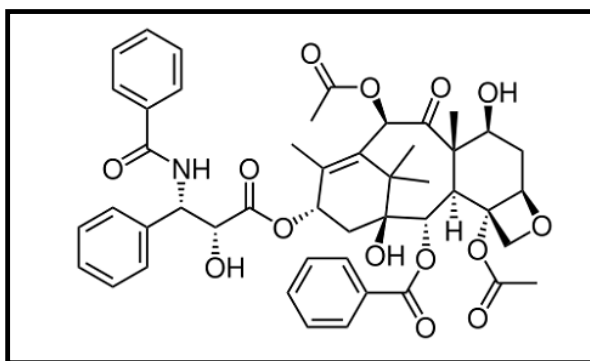
Os endofíticos são reconhecidamente úteis na agricultura e na indústria, sobretudo na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de novos genes de interesse em plantas como agentes inibidores de pragas e patógenos (MURRAY *et al.*, 1992).

Dentre os fungos produtores de produtos para controle biológico na agricultura, destacam-se os fungos do gênero *Trichoderma* e *Metharhizium* como micoerbicidas, micoinseticidas ou micoparasitas (AZEVEDO *et al.*, 2002).

A relação da indústria de alimentos com os fungos filamentosos é muito antiga e extensa. Os fungos estão associados à tecnologia de alimentos desde os primórdios das civilizações mais antigas conhecidas, como por exemplo, nos processos de preparação de alimentos orientais, bebidas de povos indígenas no continente americano e na Europa, participam no processamento de alimentos à base de leite. Com o desenvolvimento das pesquisas, já é possível conhecer os processos pelos quais os fungos modificam os alimentos, seja pela produção de micotoxinas ou pela contaminação de alimentos processados. (PASTORE & MACEDO, 2004).

Os endofíticos destacam-se como fontes de metabólitos primários e secundários de interesse, tais como o taxol, poderoso anticancerígeno, o taxol (figura 6), poderoso anticancerígeno é também produzido por um fungo endofítico, o *Taxomyces andreamae*, utilizado no tratamento de câncer de mama e de útero. Sua principal fonte é a árvore *Taxus brevifolia*, encontrada em pântanos e alagadiços da costa oeste norte-americana (AZEVEDO *et al.*, 2002).

**Figura 6.** Estrutura química do taxol



Fonte: AZEVEDO *et al.* (2002)

Do ponto de vista biológico, a produção de um metabólito pode estar fundamentada em vários mecanismos envolvidos na interação entre o micro-organismo e seu habitat. A colonização, adaptação e propagação dos fungos endofíticos no hospedeiro, podem ser beneficiadas com a produção de compostos que atuem na competição com outros micro-organismos, animais herbívoros e promoção de crescimento vegetal.

A produção de metabólitos secundários depende de fatores bióticos e abióticos e estão intimamente relacionadas com o momento fisiológico do hospedeiro (AZEVEDO *et al.*, 2002; ZHI-LIN *et al.*, 2007).



## 2.8 Fungos endofíticos na produção de antimicrobianos

Os micro-organismos são responsáveis por uma variedade enorme de produtos naturais conhecidos. Existem 50.000 metabólitos secundários de micro-organismos, sendo que, 12.000 são antibióticos conhecidos. Destes 55% foram produzidos por actinomicetos e 22% por fungos filamentosos (DEMAIN, 1999).

A maioria dos micro-organismos produtores de antibióticos é comumente encontrada no solo. No entanto, certos endófitos também têm se mostrado potentes produtores de antibióticos, dos quais muitos com propriedades de uso na agricultura e na medicina (STROBEL & DAISY, 2003). Actinomicetos, bactérias e fungos estão entre os produtores mais conhecidos. A vasta maioria de antibióticos atualmente utilizados é produzida por actinomicetos, e em particular por membros do gênero *Streptomyces*. Entre os fungos, *Penicillium* e *Cephalosporium* spp. são os mais conhecidos (STROBEL & DAISY, 2003).

Nos últimos anos, alguns trabalhos têm reforçado a idéia de que fungos endofíticos são fonte verdadeiramente valiosa para a obtenção de compostos antimicrobianos, sobretudo porque estes podem ter significativa aplicabilidade não somente na medicina, mas também na agricultura no combate à fitopatógenos (YU *et al.*, 2010).

A tabela 1 ilustra algumas das substâncias isoladas, identificadas e com atividade antimicrobiana comprovada, obtidas de fungos endofíticos nos últimos cinco anos.

**Tabela 1-** Substâncias com atividade antimicrobiana isoladas de fungos endofíticos.

Hospedeira	Fungo endofítico (Referência)	Substância	Frente
<i>Cynodon doctylon</i>	<i>Aspergillus</i> sp. (TAN et al.,2005)	- Ácido helvólico -Monometilsulocrina	<i>Helicobacter pylore</i>
<i>Quercus variabilis</i>	<i>Cladosporium</i> sp. (CHENG et al.,2007)	-Brefelfina A	<i>C. albicans</i> <i>Aspergillus niger</i>
<i>Urospermum picroóded</i>	<i>Ampelomyces</i> sp (EBEL et al 2008)	-Altersolanol A	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Saurauia scaberrinae</i>	<i>Phoma pinodella</i> (HOFFAM et al., 2008)	- Phomodiona	<i>S. aureus</i>
<i>Bidens pilosa</i>	<i>Botryosphaeria rhofina</i> (HERTWECK et al.,2010)	- Botriorodina A	<i>A. Terreus</i>

**Fonte:** Banhos (2011)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral:

Isolar e verificar o potencial antioxidante e antibacteriano de fungos endofíticos e de extratos vegetais de *Virola venosa*.

#### 3.2 Específicos:

- Isolar e caracterizar fungos endofíticos de partes de galhos, folhas e caule de *Virola venosa*;
- Realizar screening fitoquímico dos extratos vegetais e fúngicos, investigando os compostos fenólicos e flavonóides totais;
- Avaliar as atividades antioxidantes dos extratos vegetais e dos extratos brutos fúngicos;
- Investigar as atividades antimicrobianas dos extratos vegetais e dos extratos brutos fúngicos.

#### 4. REFERÊNCIAS

AHLHOLM, M. J. U.; HELANDER, M.; LEHTIMAKI, S.; WALI P.; IKKONEN, K. **Vertically transmitted fungal endophytes: different responses of host-parasite systems to environmental conditions.** *Oikos*, v. 99, p.173-183, 2002.

ALEXOPOULOS C. J.; MIMS C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology.** 4ed. New York: John Wiley, 1996. 869 p.

AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W.L. **Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants.** In: GANGULI, B.N.; DESMUCKH, S.K. *Fungi: Multifacetated Microbes.* New Dehli: Anamaya Publication, p.189-207, 2006.

AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M. **Biotechnologia na Agricultura e na Agroindústria.** Guaíba: Agropecuária, 2001. 463 p.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W.J.; ARAÚJO, W.L.; PEREIRA, J.O. *Microrganismos Endofíticos e seu Papel em Plantas Tropicais.* In: AZEVEDO, J. L.; SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. **Biotechnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria.** Caxias do Sul: Educs, 2002. p.269-294.

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKY, J.; LACAVA, P. T. **Manual de isolamento de micro-organismos endofíticos.** Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.

BANHOS. E. F. **Atividade antimicrobiana de *Myrcia guianensis* (MYSTACEAE) e de seus fungos endofíticos.** 2001. 100f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Biotecnologia), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus. 2011.

BARY, A. **Morfologie und physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten Engelman:** Leipzig, 1866. 316 p.

BARATA, L. E. S.; BAKER, P. M. **Quimioprofilaxia da esquistossomose: a atividade de *Virola surinamensis* (Rol) Warb.** *Ciência e Cultura*, São Paulo, v. 25, n.6, p. 169, 1973.

BELOTA FILHO, W. L. **As espécies de *Iryanthera Warburg* (Myristicaceae) da Reserva Florestal Ducke.** 1994. 94f. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia INPA/FUA, Manaus, 1994.

BRAZ FILHO, R.; FROTA LEITE, M. de & GOTTLIEB, O. R. a - **The constitutions of diarylpropanoids from *Virola multinervia*.** *Phytochemistry*, v 12, p. 417, 1973.

BUTLER, M. S. J. **Natural products derived compounds in clinical trials.** *Nat Prod.* n. 22, p. 162-195, 2004.

CECHINEL, V. F.; YUNES, R. A. **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais.** *Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade.* *Química Nova*, v. 21, p. 99-105, 1998.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. **Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos bioativos produtos naturais**. Revista Virtual de Química, 5 (3), p. 421-437, 2013.

CHERFAS, J. **Disappearing Mushrooms: Another Mass Extinction?** Science, v. 254, p.1458-1458, 1991.

COWAN, M. M. **Plant products as antimicrobial agents**. Clinical Microbioloy Reviews, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRONQUIST, A. **On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms plant**. Syste Evol., Supll v.1, 1977, 179 p.

DEMAIN, A.L. **Pharmaceutically activesecondary metabolites of microorganisms**. Applied Microbiology and Biotechnology v. 52: p. 455-463, 1999.

DUCKE, A. BLACK, G. A. **Notas sobre a fitogeografia da Amazônia brasileira**. Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte, v 29, p. 3-48, 1954.

FEARNSIDE, P. M. **Desmatamento na Amazônia: Dinâmica, impactos e controle**. Acta Amazônica, v. 36, n. 3, p. 395-400, 2006.

GARCIA, E. S. **Biodiversity biotechnology and helth**. Caderno de saúde pública, v.11, n.3, p.495-500, 1995.

GOTTLIEB, O. R.; LOUREIRO, A.A; SANTOS CARNEIRO, M. ROCHAM A. I. **The distributions of diarypropoanoids in amazonian *Virola* species**. Phytochemistry, p.12, 1973.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ L. A. PETROVICK P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora UFSC, 6ª Edição, cap. 1, p. 13-28, 1999.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. **Alcalóides: Generalidades e Aspectos Básicos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ L. A. PETROVICK P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, Editora UFSC. 6ª Edição, cap. 29, p. 765-791, 2007.

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

LE COINTE. **Amazônia Brasileira III. Árvores e plantas úteis (Indígenas e aclimatadas)**. São Paulo, Ed. Nacional, 1947, 506p.

LEVIN, D. A. **The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores**, Ann Rev. Ecol. Syst.v.7, p.121-159, 1976.

LOUREIRO, A. A.; Freitas, M. C.; Vasconcelos, F. J. **Estudo Anatômico de 24 espécies do gênero *Virola* (Myristicaceae) da Amazônia**. Acta Amazônica, 19 (Único): p.415-465, 1989.

MANN, J. **Chemical Aspects of Biosynthesis**, Oxford University Press, 1994.

MANN, J. **Secondary Metabolism**, 2th ed.; Clarendon Press – Oxford, 1987.

MINAMI, P. S. **Micologia: métodos laboratoriais de diagnóstico de micoses**. Barueri: Editora Manole, 2003, 199p.

MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. **Surrogate transformation of perennial ryegrass**, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. *Molecular General Genetics*, n. 233, p. 1-9, 1992.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs over the last 25 years**. *Journal of Natural Products*, n. 70, p. 461-477, 2007.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S.N.; CECHINEL FILHO, V. **Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos**. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. *Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos*. Editora UNIVALI, 2003, 239p.

OLIVEIRA, R. L. **Isolamento e avaliação do potencial biológico de fungos endofíticos**. 2010. Monografia (Dissertação de mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2010.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos: Principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica. Jardim Botânico de São Paulo, São Paulo, 2006.

PASTORE, G. L.; MACEDO, G. A. **Utilização dos fungos na indústria de alimentos**. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. *Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs, p. 311-334, 2004.

SILVÉRIO, M. B. **Análise econômica da biodiversidade na Amazônia brasileira**. 2004. 23f. Monografia (Bacharelado em Economia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. **Natural products from endophytic microorganisms**. *Journal of Natural Products*, n. 67 (2), p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. A.; DAISY, Y. B. **Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products**. *American Society of Microbiology News*, v.67, p.491-502, 2003.

SCHULTES, R. E. & Holmstedt. **De plantis toxiceariis e mundo novo tropicale commentationes**. VIII. Miscellaneous notes on Myristicaceous plants 01' South America. *Lloydia* 34( 1): 6, p. 1-79, 1969.

SWAIN, T. **Chemist in Evolution and systematics**, Butterworth, Londres, 1973.

RIBEIRO, J. E. L. S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. S.; Brito, J. M.; Souza, M. A. D.; Martins, L. H. P.; Lohmann, L. G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Procópio, L. C. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus, INPA. 1999, 816p.

RODRIGUES, W. A. **Revisão Taxonômica das Espécies de *Virola Aublet* (Myristicaceae) do Brasil.** Acta Amazônica, ano 10, n.1, 1980.

RODRIGUES, W. A. **A ucuúba da várzea e suas aplicações.** Acta Amazônica, ano 2, n. 2, p. 29-47, 1972.

ROOSMALEN, M. G. M. Van. **A Guide to the Fruits of the Guianan Flora.** University of Utrecht Press/Veenman, Wageningen, Holland. 517 p. Roosmalen, M.G.M. van. 1985

ROOSMALEN, M. G. M. Van & L.L KLEIN.1982. **The spider monkeys, genus *Ateles*, in: Ecology and Behaviour of neotropical primates. Vol II,** mittermeier, R., Rycands, A. B., Coimbra-Filho, A.F.& G. A .B da fonseca (eds), word wild life fund, Washington, DC, USA: p. 455-538, 1988.

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

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil.** Quim. Nova. São Paulo, v. 24, n1, p 147-152, 2001

WAGNER, B.L.; LEWIS, L.C. **Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*.** Journal of Applied Microbiology, v.66, p.3468–3473, 2000.

ZHI-LIN, Y.; CHUAN-CHAO, D.; LIAN-QING, C. **Regulation and accumulation of secondary metabolites** in plant-fungus symbiotic system. African Journal of Biotechnology, v. 6, p.1266-1271, 2007.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. **Flavonóides.** In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO J. C. P.; MENTZ L. A. PETROVICK P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora UFSC, 6<sup>a</sup> Edição, cap. 23, p. 577-614, 2007.

**CAPÍTULO I**

**DETERMINAÇÃO DE FENÓIS E FLAVONÓIDES TOTAIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS VEGETAIS E DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE *Virola Venosa* (Poepp. Ex A. DC) Warb**

## Determinação de fenóis e flavonóides totais, atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos vegetais e de fungos endofíticos de *Virola venosa* (Poepp. Ex A. DC) Warb

Kamila Rangel Primo Fernandes<sup>1</sup>; Paulo Senna Bittercourt<sup>2</sup>; Afonso Duarte Leão de Souza<sup>2</sup>; Antônia Queiroz Lima de Souza<sup>1,2</sup>; Emerson Souza Lima<sup>2</sup>; Rita de Cássia Nunomura<sup>2</sup>; Ana Frazão Teixeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Estado do Amazonas – UEA

<sup>2</sup>Universidade Federal do Amazonas – UFAM

### Resumo

A espécie *Virola venosa* (Poepp. Ex A. DC) Warb, conhecida popularmente como ucuuba, ocorre naturalmente na Amazônia e possui grande potencial para o desenvolvimento econômico na fabricação de caixas, móveis, tanoaria, e compensados, além de ter comprovada atividade antimicrobiana e antiinflamatória. Com base nessas informações o objetivo deste trabalho foi isolar e verificar o potencial antioxidante e antibacteriano de fungos endofíticos de *V. venosa* e de seus extratos vegetais. Foram coletados na região urbana de Manaus no campus da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, (latitude: 3° 6,058`S longitude: 59° 58,459`W) partes de *V. venosa* como galhos, folhas e caule para obtenção dos extratos vegetais e isolamento dos endofíticos. De modo que foram isolados 105 fungos endofíticos distribuídos em 16 grupos. Foram obtidos 12 extratos brutos vegetais e 54 extratos brutos fúngicos. Este trabalho apresenta resultados de ensaios realizados com estes extratos, tais como identificação de compostos químicos, fenóis e flavonóides totais, atividade antioxidante e antimicrobiana, buscando informações a respeito destes extratos que exerçam diversas funções de importância, úteis, sobretudo na farmacêutica. É importante ressaltar que os estudos aqui realizados mostram a correlação entre os resultados da investigação dos ensaios com a diversidade de fungos da hospedeira e dos resultados dos seus extratos vegetais, buscando novas perspectivas sobre o potencial que os fungos endofíticos de *Virola venosa* possuem e representam para a biotecnologia.

Palavras-chave: *Virola venosa*, Fungos endofíticos, Antimicrobiana, Antioxidante



## 1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos endofíticos incluem principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, habitando de modo geral suas partes aéreas, como folhas e caules, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros (AZEVEDO, 1998; PEIXOTO NETO *et al.*, 2002; PEIXOTO NETO *et al.*, 2004; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009). Isso os diferencia dos micro-organismos fitopatogênicos, que são prejudiciais às plantas, causando-lhes doenças. Eles são também distintos dos micro-organismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais (AZEVEDO, 1998; SOUZA *et al.*, 2004).

As interações endófito/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas os micro-organismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros micro-organismos (ARAÚJO, 1996; RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996; PEREIRA, 1993).

Exemplo de metabólitos que podem ser induzidos pelos endófitos são as fitoalexinas, substâncias de baixo peso molecular com atividades antimicrobianas, produzidas pelas plantas ante a ação de micro-organismos ou de agentes estressantes (CORDEIRO NETO & DIETRICH, 1992). Da parte dos fungos pode-se citar a produção de micotoxinas, de metabólitos secundários que podem causar doenças em humanos e outros animais (CLAY, 1988; D'MELLO & MACDONALD, 1997).

Diante desse contexto, os micro-organismos apresentam importante propriedade de conferir proteção às plantas, seja pela sua presença nas plantas hospedeiras, seja pela aplicação como agentes de biocontrole, que podem resultar na eliminação de pragas agrícolas (SOUZA, 2001). Por isso, tem havido um crescente interesse no estudo da ocorrência, do potencial de colonização e da utilização de endófitos, úteis na agricultura, na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica (MARIANO *et al.*, 2004).

Portanto, este estudo pretende contribuir para o conhecimento da diversidade e dos potenciais biológicos dos micro-organismos da Amazônia, em especial dos fungos endofíticos isolados de *Virola venosa*. Não existem na literatura estudos sobre os endófitos dessa planta.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

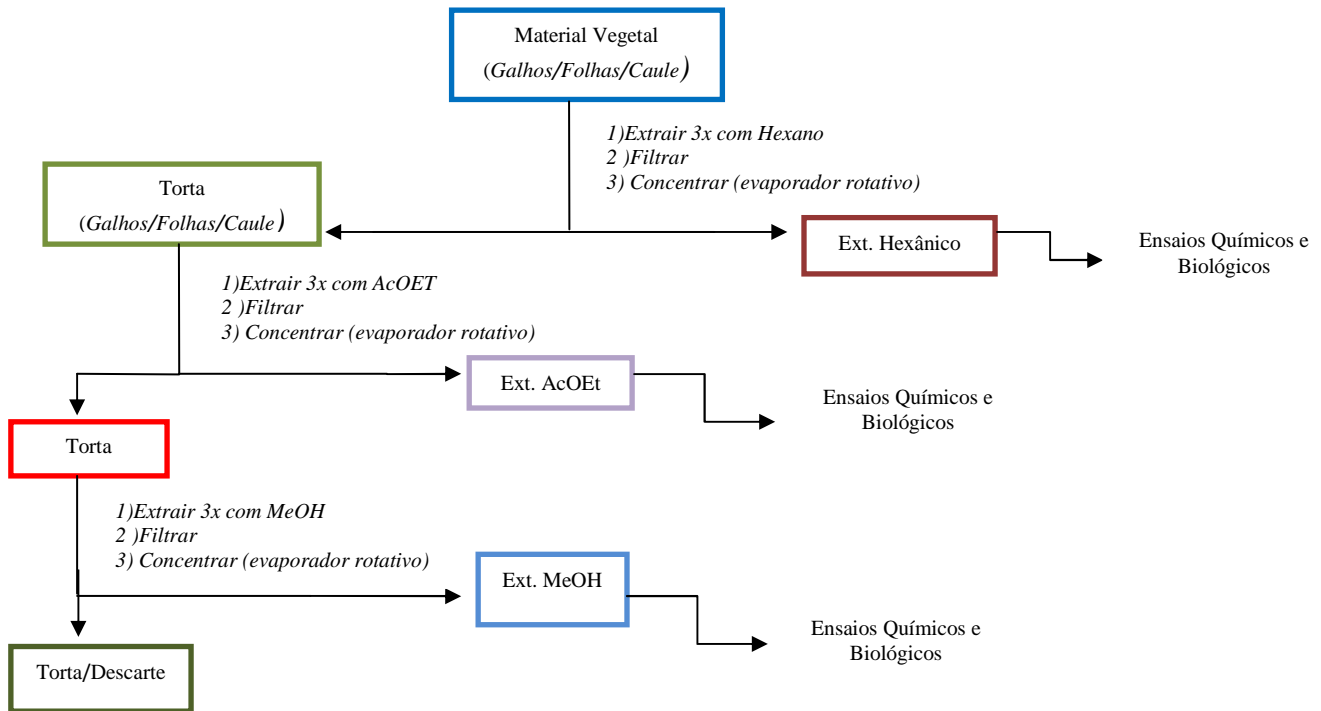
### 2.1 Coleta do material

As amostras de galhos, folhas e caules de *V. venosa* foram coletadas no Campus da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, Am (latitude: 3° 6,058`S longitude: 59° 58,459`W ). A espécie foi identificada no Herbário da UFAM, no qual uma exsicata foi devidamente armazenada e tombada (n° 010001). As amostras foram coletadas em julho de 2013, para realização de estudos de atividades antioxidante e antimicrobiana dos extratos vegetais, e em setembro de 2013, para fins de isolamento, caracterização e análises das atividades biológicas dos fungos endofíticos. Os materiais coletados foram acondicionados em sacos plásticos e transportados a 4°C, para o laboratório de Biorgânica do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia (MBT) da Escola Superior de Ciências da Saúde (ESA) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA).

### 2.2. Obtenção dos extratos vegetais: (Hexânicos, AcOEt e MeOH)

As amostras vegetais (galhos verdes e maduros, folhas e caule) foram secas em estufa sob temperaturas na faixa de 30 a 35°C, trituradas em moinho e pesadas. Os extratos foram obtidos das amostras moídas em três etapas constituídas por extração, filtração e concentração em evaporador rotativo. Estas etapas foram repetidas por três vezes, alterando o solvente em cada uma das extrações, sendo eles: hexano, acetato de etila e metanol, respectivamente. Cada solvente permaneceu em contato com as amostras por três dias até serem separados os extratos líquidos dos resíduos vegetais (torta). Este procedimento foi repetido três vezes (figura 7).

**Figura 7 – Fluxograma de Extração**



### 2.3 Isolamento de fungos endofíticos

As amostras foram submetidas à assepsia para eliminação de micro-organismos epifíticos, para a qual, as amostras foram previamente lavadas com água corrente e com detergente neutro, cortadas em fragmentos de aproximadamente 10 a 12 cm e submetidas a uma sequência de submersões em soluções na seguinte ordem e tempo: álcool a 70% por 1 min; hipoclorito de sódio a 3% por 2 min. para a folha, 4 min e para o caule; álcool a 70% por 30 segundos para folha e caule, 1 min; e água destilada estéril por 2 min. para todos os tecidos (ARAÚJO *et al.*, 2002). Em seguida, as extremidades dos tecidos foram desprezadas e três fragmentos de cada amostra foram inoculados em triplicatas em placas de Petri, contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA), meio ISP2 e AVEIA, esterilizados e acrescidos de amoxicilina e terramicina 100µg/mL para evitar o crescimento bacteriano. Os fungos foram então isolados e caracterizados morfológicamente.

Para controle da assepsia, alíquotas de água da última lavagem dos fragmentos vegetais foram semeadas em meio BDA/ISP2/AVEIA e incubadas a 28°C por 7 a 14 dias (ARAÚJO *et al.*, 2002; GUIMARÃES, 2005).

A taxa de colonização fúngica (TC) foi verificada por visualização a olho nu dos micro-organismos isolados e determinada pela razão entre o número de fragmentos vegetais com crescimento fúngico e o número total de fragmentos vegetais.

### 2.3.1 Purificação dos isolados

A purificação para leveduras ocorreu através da técnica de esgotamento, para os fungos sem esporos foi utilizada a técnica de repique, e fungos que possuíam esporos ocorreu através da suspensão de esporos em diluição com água destilada esterilizada (ARAÚJO *et al.*, 2002).

### . 2.3.2 Caracterização dos fungos isolados

A caracterização dos fungos foi realizada através de análises das características morfológicas das colônias dos fungos, tais como cor, textura, topografia, pigmento difuso, cor do verso da colônia e topografia do verso da colônia e por análises das estruturas através da técnica de microcultivo (SOARES *et al.*, 1987).

### 2.4 Obtenção dos extratos fúngicos

Para obtenção dos metabólicos secundários, foram utilizados 27 fungos, os quais correspondem a 20% do total dos fungos endofíticos isolados e caracterizados. Discos dos meios sólidos contendo micélio dos fungos isolados foram transferidos para frascos erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio líquido batata-dextrose acrescido de 0,2% de extrato de levedura sob condições estéreis, conforme o método descrito por Souza *et al.*, (2004) com modificações. Os frascos foram incubados em incubadora Shaker, com agitação 120 rpm por 15 dias a 28°C. Em seguida, o caldo de fermentação foi filtrado para separação do sobrenadante e do micélio. Após a obtenção dos sobrenadantes foi utilizado coluna de sílica reversa - C<sub>18</sub> para extração de classes de compostos polares eluídos com metanol, que foram testados quanto às suas atividades biológicas. Os micélios fúngicos também tiveram seus extratos obtidos por extração com metanol por 72h.

## 2.5 Prospecção fitoquímica dos extratos vegetais de *Virola venosa*

Foram realizados testes para fenóis e taninos, antocianinas e antocianidinas, flavonóis, flavonas, e xantonas, chalconas e auronas, flavonóides e flavononóis, esteróides e triterpenóides (Lieberman-Buchard), saponinas, alcalóides conforme metodologia de Matos (1997). Para tais testes, foram utilizados 50mg de extrato concentrado, diluídos em 100 mL de seus respectivos solventes de extração e utilizadas alíquotas de 1mL em tubos de ensaio. Para cada tubo, foram feitos testes diferentes conforme indicado na tabela 2.

**Tabela 2** – Metodologia realizada na prospecção fitoquímica

PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA					
Extratos	Constituintes	Metodologia			
Tubos 1	Fenóis e Taninos	Adicionou-se três gotas de solução alcoólica de FeCl <sub>3</sub> (2%). Foi observado mudança de cor.			
Tubos 2	Antocianinas e Antocianidinas	Adicionou-se reagentes para mudança de pH. O aparecimento de cores diversas indica a presença de vários constituintes	pH 3 HCl 0,1 M  Coloração vermelho intensa	pH 8,5 NaOH 0,1 M  Coloração lilás	pH 11 NaOH 0,1 M  Coloração Azul púrpura
Tubos 3	Flavonas Flavonóis e Xantonas		*	*	Coloração amarelo
Tubos 4	Chalconas e Auronas		Coloração vermelho	*	Coloração vermelho púrpura
Tubos 5	Flavonóides e Flavononóis		Coloração vermelho	*	Coloração vermelho - laranja
Tubos 6	Esteróides e Triterpenóides	Tomou-se as amostras, adicionou-se 2 mL de clorofórmio, filtrou-se a mistura em um funil contendo algodão e algumas decigramas de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anidro, logo após a filtragem, adicionou-se 1 mL de anidrido acético e logo após, três gotas de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado, ao término, observou-se o ocorrido para diagnóstico de as espécies supracitadas.			
Tubos 7	Saponinas	Tomou-se o extrato bruto em clorofórmio, resultante da etapa anterior, dissolveu-se em 8 mL de H <sub>2</sub> O destilada e logo após, filtrou-se a mistura para um tubo de ensaio. Posteriormente, com o tubo fechado, misturou-se a solução para a observação de formação de espuma persistente para a determinação de saponinas.			
Tubos 8	Alcalóides	Tomou-se dois tubos com a amostra bruta, acidificou-se com 10 mL de HCl 0,1 mL, logo após adicionou-se 3 gotas de reagente de Mayer no primeiro tubo e outras 3 gotas de reagente de Dragendorff no segundo tubo, após o procedimento observou-se o aparecimento ou não de precipitado.			

\*Não mudança de cor

## 2.6 Determinação de fenóis e flavonóides totais dos extratos vegetais e de fungos de *Virola venosa*

### 2.6.1 Determinação de fenóis totais

Foram utilizados 10uL dos extratos vegetais (1mg/mL), dos extratos fúngicos e do padrão ácido gálico. Posteriormente foram adicionados 50 uL de Folin ciocalteu (1:10) nas amostras e incubadas por 8 min. Em seguida foram adicionados 240 uL de carbonato de sódio a 0,4% e incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente. Após esse período foram lidas em espectrofotômetro T70 UV/VIS, com leitor ELISA no comprimento de onda de 740nm. Os extratos que apresentaram acima de 50% de fenóis foram diluídos sucessivamente (a partir da solução mãe de 1mg/mL) em oito concentrações diferentes (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,01563; 0,00782; 0,00390 mg/mL) O ensaio foi realizado em triplicata (VELIOGLU *et al.*, 1998).

$$\text{Determinação de fenóis} = (\text{média abs extrato} / \text{média abs do padrão}) \times 10$$

### 2.6.2 Determinação de flavonóides totais

Foram utilizados 30 uL a dos extratos vegetais (1mg/mL), dos extratos fúngicos e do padrão de quercetina (1mg/mL) diluída em etanol 80%. Posteriormente foram adicionados 90 uL de etanol 95%, seguido por leitura espectrofotométrica das amostras. Em seguida, acrescentaram-se às amostras 6 uL de cloreto de alumínio a 10%, e 6 uL de acetato de potássio 1M (ambos diluídos em água destilada), e 168 uL de água destilada, seguidas de incubação durante 30 minutos em temperatura ambiente e leitura em espectrofotômetro T70 UV/VIS no comprimento de onda de 405 nm, com leitor de Elisa. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram obtidos, utilizando-se primeiramente a diferença das absorbâncias das amostras e do padrão pela absorbância dos respectivos brancos, logo após foi calculada a determinação da concentração de flavonóides (CHANG *et al.*, 2002).

$$\text{Determinação de flavonóides} = (\text{média abs extrato} / \text{média abs do padrão}) \times 10$$

## 2.7 Estudo da atividade antioxidante dos extratos vegetais e fúngicos de *Virola venosa*

A atividade antioxidante (AA%) dos extratos foi avaliada com base na captura de radicais livres de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Para isto, fez-se uma solução padrão de DPPH,

dissolvendo-se 2 mg de DPPH em 12 mL de etanol P.A. Desta solução foram feitas diluições sucessivas para construção da curva padrão. Em seguida, os extratos foram dissolvidos (na concentração de 1mg/mL) em DMSO e testados quanto a AA frente ao DPPH. Os extratos com AA igual ou acima de 50% foram então diluídos sucessivamente (a partir da solução mãe de 1mg/mL) em oito concentrações diferentes (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125; 0,01563; 0,00782; 0,00390 mg/mL). De cada diluição, foram retirados 30 µL e acrescidos de 270 µL de DPPH, ambos adicionados em microplaca de ELISA e incubados na ausência de luz para reagir por 30 minutos. Utilizou-se quercetina como padrão. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro T70 UV/VIS com leitor de ELISA, em 490 nm. Foi feito um branco para toda a placa utilizando se etanol em reação com DPPH. Para todos os extratos foram feitas triplicatas. A AA (%) foi verificada através de cálculos de inibição e IC50, conforme estabelecido por Moein (2007). Os mesmos extratos que apresentaram AA frente ao DPPH igual ou acima de 50% foram testados frente ao ABTS<sup>+</sup> e SUPERÓXIDO.

### 2.7.1 Atividade antioxidante frente ao ABTS<sup>+</sup>

Realizou-se uma mistura de 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS<sup>+</sup> (10mg em 5mL de H<sub>2</sub>O ultrapura) com persulfato de potássio 5 mM para promover oxidação do ABTS<sup>+</sup>, a qual ocorreu após 24h, coberto com papel alumínio, no escuro e em temperatura ambiente. Seguiram-se os mesmos parâmetros das análises com o DPPH, alterando-se o tempo de reação, o qual foi de 15 minutos a temperatura ambiente e o comprimento de onda de análise, tendo sido 630 nm (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

$$\% \text{Inibição} = 100 - (A_2 \text{ amostra} - A_1 \text{ amostra} / A_2 \text{ controle} - A_1 \text{ controle}) * 100$$

### 2.7.2 Atividade antioxidante frente ao SUPERÓXIDO

Para estas análises, as diluições partiram de uma solução mãe na concentração de 16mg/mL. Foram adicionados 10 µL no primeiro e segundo poço e realizada uma diluição seriada até o oitavo poço. Em seguida foram adicionados 90 µL de solução NBT (Nitro Blue Tetrazolium - 250µM), 100µL da solução de NADH (290µM diluído em tampão TRIS), e realizada a leitura em espectrofotômetro T70 UV/VIS no comprimento de onda de 405nm para obtenção da absorbância inicial. Em seguida 100 µL de solução PMS (Phenazine Metilsulfate - 10 µM diluídos em tampão TRIS) foram adicionados aos poços contendo as amostras, e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Procedeu-se com a segunda

leitura no mesmo comprimento de onda (405nm) e calculou-se a porcentagem de inibição de acordo com a fórmula (ROBAK e GRYGLEWSKI, 1988).

$$\% \text{Inibição} = 100 - (A_2 \text{ amostra} - A_1 \text{ amostra} / A_2 \text{ controle} - A_1 \text{ controle}) * 100$$

## 2.8 Análise da atividade antimicrobiana de extratos vegetais e fúngicos de *Viola venosa*.

### 2.8.1 Micro-organismos

Foram utilizadas para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos cepas de bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, cepas de gram-negativas *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa* e cepas de *Candida albicans*. As cepas foram fornecidas pelo Instituto FIOCRUZ – AM. Colônias destes micro-organismos foram inoculadas em Ágar Muller-Hinton (MHA) (*E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*), Sabouraud Agar (SB) (*C. albicans*), Brain Heart Infusion Agar (BHI) (*E. faecalis*), até atingirem turbidez correspondente ao tubo 1 - 2 da escala de Mac-Farland.

### 2.8.2 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos vegetais - Aplicação dos discos de difusão

Os discos de papel de filtro com 0,5 cm de diâmetro, esterilizados foram embebidos nas preparações de antimicrobianos (extratos vegetais, previamente solubilizados em seus respectivos solventes de extração) na concentração de 2mg/mL e aplicados nas placas com o 25 µl do inóculo, opondo-se o disco de outra amostra, equidistantemente distribuídos. As placas com os antibióticos foram incubadas a 35 °C por 24 a 48 horas e com o antifúngico a 28 °C de 24 a 48 horas em triplicata (Farmacopéia Brasileira, 1988; United States Pharmacopoeia, 2000). Para cada amostra e padrão fez-se uma placa semeada com o inóculo, destinada ao controle em branco dos discos de papel, ou seja, foram utilizados controles positivos, antibióticos comerciais para cada patógeno. A leitura dos resultados foi realizada com paquímetro (Mitutoyo®) medidor do diâmetro das zonas de inibição produzidas ao redor dos discos de antimicrobianos.



### 2.8.3 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana – Screening em placa ELISA

Foram utilizados os mesmos micro-organismos dos testes de atividade antimicrobiana dos extratos vegetais. Os extratos foram submetidos à avaliação preliminar em placas de Elisa 96 poços, esterilizada. Uma alíquota de 100 µL de cada extrato na concentração de 2mg/mL, foi depositada em cada poço da placa, 100 µL caldo e suspensão de micro-organismos para um volume de 10 µL em cada poço, teste realizado em triplicata. O controle positivo e negativo foram adicionados a placa, juntamente com o caldo, das suspensões de micro-organismos. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após 24h de inóculo foi aplicado reveladores NBT a 2% (Nitro Blue Tetrazolium) para *Candida albicans* e para as demais bactérias TTC (Cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio) a 2% volume de 10 µL, e 48h depois foi avaliada a eficácia das amostras contra o crescimento das colônias dos micro-organismos testados (LIMA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007).

### 2.8.4 Atividade antimicrobiana quantitativa dos extratos vegetais e fúngicos - Determinação da concentração inibitória mínima – CIM.

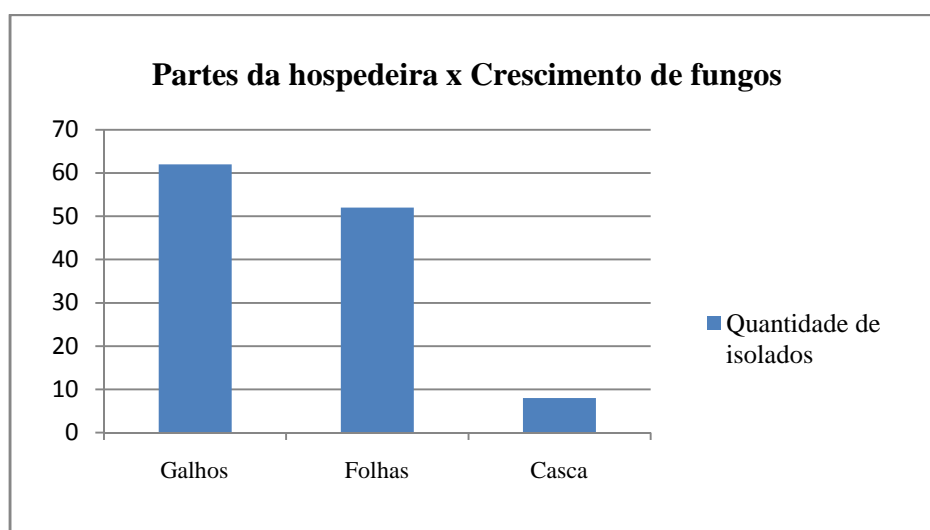
Os extratos testados que apresentaram atividade antimicrobiana na avaliação preliminar foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo (LIMA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007). Os testes foram realizados em placa de ELISA de 96 poços, esterilizada, contendo os meios de cultivo líquido, específico para cada micro-organismo. Uma alíquota de 100 µL de cada extrato nas concentrações de 1,0; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,003125; 0,01563 e 0,00782 mg/mL foi depositada em cada poço da placa, contendo 100µL de meio de cultivo específico e suspensão de 10 µL de micro-organismos em cada poço. Para cada concentração foram feitas triplicatas. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após 24h de incubação, foram aplicados 10 µL de reveladores NBT a 2% (Nitro Blue Tetrazolium) para *Candida albicans* e 10 µL de TTC (Cloreto de 2,3,5- trifeniltetrazólio) a 2% para as bactérias. Foram utilizados controles positivos, antibióticos comerciais para cada micro-organismo testado. Após 48h foi analisada a eficácia dos extratos contra o crescimento das colônias dos micro-organismos. A leitura foi realizada através da observação de mudança da coloração nos poços. A CIM foi determinada pela menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento microbiano (ALIGIANIS *et al.*, 2001).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Isolamento e purificação dos fungos endofíticos

Foram isolados de *Virola venosa* 122 endófitos, dos quais, 105 foram caracterizados e identificados morfológicamente e agrupados por gêneros. A eficiência do método de assepsia foi confirmada através da ausência de micro-organismos epifíticos ou contaminantes na contra prova de desinfecção superficial. Os cultivos com fragmentos de galhos e folhas apresentaram maiores números de fungos endofíticos (Figura 8).

**Figura 8** – Partes da hospedeira e crescimento de fungos



Os resultados demonstram que a *V.venosa* é fonte de um número considerável de fungos endofíticos. Deve-se considerar que muitas espécies de fungos não são cultiváveis e, portanto, o isolamento expressa a frequência de fungos endofíticos cultiváveis e não o total de fungos endofíticos presente na planta.

O número significativo de endófitos encontrados em galhos (50,82%) pode estar relacionado com o modo com que os endofíticos penetram na planta, que segundo Guimarães (2006) pode ser por transferência vertical, na qual os fungos são transmitidos através da semente e por transferência horizontal, na qual as colônias fúngicas são passadas de planta para planta. Considerando um conjunto de fatores tais como: disseminação horizontal e assepsia branda para este tecido, essas condições são favoráveis à permanência ou crescimento do fungo em tecidos específicos e pode-se justificar maior número de isolados fúngicos nos galhos. (AHLHOLM et al., 2002; BRAND & GOW, 2009). É importante também lembrar que a etapa de desinfecção superficial deve ser específica para cada espécie vegetal e cada parte da planta, tendo em vista as diferenças entre os tecidos de cada planta.

A taxa de colonização para caule foi de 0,5 e 1,00 para o restante dos tecidos. Taxas de colonização maiores que 0,5 em todos os tecidos vegetais demonstram que a utilização desta técnica para isolamento de fungos endofíticos foi eficaz, promovendo a obtenção de um número significativo de isolados fúngicos.

### 3.2 Caracterização dos fungos isolados

Os 105 isolados foram agrupados conforme as iniciais G1: para o grupo 1, G2: grupo 2 e assim por diante. A caracterização dos fungos (tabela 3) foi feita através da análise morfológica das características das colônias dos fungos e análise microscópica de algumas estruturas reprodutivas.

Foi observado septações das hifas e cor, porém não foram observados esporos e presença de estruturas reprodutivas para todos os micro-organismos, devido ao pouco tempo de crescimento dos fungos sobre as lamínulas, sendo necessárias novas análises morfológicas, bem como a identificação molecular destes fungos.

**Tabela 3** - Grupos de fungos e seus prováveis gêneros

Grupos	Quantidade de isolados	Características morfológicas	Provável gênero
G1	62	Fungos com formação de ascos	Ascomiceto ( <i>Phomopsis</i> )
G2	20	Fungos mitospóricos	<i>Colletotrichum</i>
G3	10	Fungos de coloração preta com ascos	Ascomiceto Preto
G4	1	Fungo de coloração castanha, micélio rasteiro	Não identificado
G5	1	Fungos mitospórico, coloração marrom	Não identificado
G6	1	Fungo com formação de ascos	Ascomiceto Estomático
G7	1	Fungo com formação de ascos	Ascomiceto
G8	1	Fungo com formação de ascos	<i>Xylaria</i>
G9	1	Fungo de coloração cinza, micélio cotonoso	Não identificado
G10	1	Fungo de coloração esverdeada, micélio cotonoso	Não identificado
G11	1	Fungo de coloração branca	Não identificado
G12	1	Fungo com formação de ascos de coloração branca	Ascomiceto
G13	1	Levedura de coloração bege	Levedura
G14	1	Levedura de coloração rosa	Levedura
G15	1	Levedura de coloração cinza	Levedura
G16	1	Fungo colorido, metabólito rosa	<i>Penicillium</i>
<b>Total</b>			<b>105 isolados</b>

Pode-se observar que cerca de 59% dos fungos foram classificados no grupo 1, como Ascomicetos cujas características indicam provável *Phomopsis*. Estes resultados são semelhantes aos que Strobel e colaboradores, observam em seus experimentos de isolamento de fungos endofíticos de planta *Cinnamomum zeylanicum* (canela), onde a maior parte dos fungos está classificada como Ascomicetos (STROBEL *et al.*, 2001). Em seus trabalhos Souza e colaboradores (2004) também observaram a presença de gênero *Phomopsis*, que é um ascomiceto, anamórfico de *Diaporthe*, conhecidos como degradadores de madeira cujo habitat são caule e galhos de plantas lenhosas e herbáceas (HANLIN & MENEZES, 1996).

### 3.3 Extratos fúngicos

Foram utilizados 27 fungos que correspondem 20% dos grupos dos 105 isolados, para obtenção de extratos, a perda de alguns micro-organismos de grupos distintos justifica a quantidade de fungos utilizados e extratos obtidos (tabela 4).

**Tabela 4** – Quantidade de extratos fúngicos obtidos

Origem dos extratos fúngicos	Quantidade de extratos
Meio líquido fermentado	27
Extração do micélio com MeOH	27
TOTAL	54

### 3.4 Prospecção fitoquímica dos extratos vegetais de *Virola venosa*

O estudo prévio para identificar a presença de determinadas classes de compostos podem ser visualizados na tabela 5. E em função deste estudo, foi realizada determinação de fenóis e flavonóides.

**Tabela 5** - Resultado da prospecção dos constituintes químicos

Amostras X Constituintes	Fenóis e Taninos	Antocianinas e Antocianidinas	Flavonas Flavonóis e Xantonas	Chalconas e Auronas	Flavonóides e Flavononóis	Esteróides e Triterpenóides	Saponinas	Alcalóides
Fo. Hexano	+	+	+	+	+	-	-	-
Ga.J. Hex	++	+	+	+	+	-	-	-
Ga. M . Hex	+	+	+	+	+	+	-	+
Ca.Hex	+	+	+	+	+	+	-	+
Fo. AcOET	+	+	+	+	+	+	-	-
Ga.J. AcOET	++	+	+	+	+	-	-	-
Ga. M . AcOET	+	+	+	+	+	-	-	-
Ca. AcOET	+	+	++	++	++	++	-	++
Fo. MeOH	++	+	++	++	++	++	-	++
Ga. J. MeOH	+	+	++	++	+	-	-	+
Ga. M. MeOH	+	+	++	++	+	-	-	-
Ca. MeOH	++	+	++	++	++	-	-	+

\* (++++) Forte; (++) Médio; (+) Fraco (D) Duvidoso; (-) Ausente; (ND) Não Determinado.

### 3.5 Determinação de fenóis totais dos extratos vegetais e de fungos endofíticos de *Virola venosa*

#### 3.5.1 Extratos vegetais – Fenóis totais

O estudo prévio para identificação de fenóis totais em *V. venosa*, mostrou a presença destes compostos em todos os extratos analisados (Tabela 5). A partir destes resultados, foram realizadas determinações das quantidades de fenóis totais em cada extrato (tabela 6). Verifica-

se que há baixa concentração de fenóis totais em todos os doze extratos analisados, dos quais os que apresentam maior concentração são os extratos provenientes de galhos jovens em AcOEt e hexano e em caule e folhas em MeOH, com considerável quantidade em  $\mu\text{g}$  de compostos fenólicos, numa medida de equivalência com o ácido gálico, utilizado como padrão.

**Tabela 6** – Determinação de fenóis em extratos vegetais

Extratos vegetais	Determinação de Fenóis			
	% Fenóis totais	Desv.pad	$\mu\text{g}$ . Eque Ac. Gálico	Desv.pad
Ga. J. MeOH	3,84	$\pm 0,61$	20,94	$\pm 3,92$
Ga. M. MeOH	5,06	$\pm 0,57$	28,83	$\pm 3,69$
<b>Fo. MeOH</b>	<b>7,13</b>	<b><math>\pm 0,61</math></b>	<b>42,18</b>	<b><math>\pm 3,96</math></b>
<b>Caule MeOH</b>	<b>9,74</b>	<b><math>\pm 1,04</math></b>	<b>59,05</b>	<b><math>\pm 6,75</math></b>
<b>Ga.J.AcOET</b>	<b>19,73</b>	<b><math>\pm 4,90</math></b>	<b>141,86</b>	<b><math>\pm 4,95</math></b>
Ga. M. AcOET	5,04	$\pm 0,67$	28,68	$\pm 4,35$
Fo. AcOET	6,14	$\pm 0,92$	35,79	$\pm 5,97$
Caule AcOET	4,98	$\pm 0,17$	28,30	$\pm 1,11$
<b>Ga. J Hexano</b>	<b>15,63</b>	<b><math>\pm 0,46</math></b>	<b>97,15</b>	<b><math>\pm 3,00</math></b>
Ga.M. Hexano	3,96	$\pm 0,45$	21,70	$\pm 2,89$
Fo. Hexano	4,28	$\pm 0,29$	23,79	$\pm 1,88$
Caule Hexano	5,36	$\pm 0,91$	30,76	$\pm 5,90$

\*Ga. J = galhos jovens; Ga. M = galhos maduros; Fo = folhas; Caule = caule;

Segundo Naczka *et al.*, (2004) os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN *et al.*, 2005).

### 3.5.2 Extratos fúngicos – Meio fermentado – SPE

Neste estudo foi avaliada determinação de fenóis totais em 27 extratos fúngicos, dos quais os metabólitos no meio fermentado SPE apresentaram baixas concentrações de fenóis totais (tabela 7). O extrato proveniente de fungos do grupo G9 destaca-se pela maior porcentagem de 12,29% com 75,55µg equivalente de ácido gálico.

**Tabela 7** – Determinação de fenóis totais em extratos fúngicos - SPE

Determinação de Fenóis Totais				
Extratos Fúngicos SPE	% Fenóis totais	Desv.pad	µg. Eq. Ac. Gálico	Desv.pad
G1N spe	5,36	±0,21	30,73	±1,38
G1E1 spe	3,69	±0,05	19,92	±0,34
G1E3 spe	3,71	±0,06	20,06	±0,39
G1A4 spe	3,64	±0,32	19,65	±2,05
G1R spe	4,43	±0,32	24,71	±2,05
G1B spe	4,06	±0,15	22,32	±0,94
G1H spe	3,82	±0,41	20,79	±2,63
G1G spe	3,33	±0,21	17,62	±1,37
G1J spe	3,51	±0,22	18,79	±1,41
G1R1spe	4,73	±1,02	26,65	±6,62
G1A1 spe	4,24	±0,16	23,48	±1,05
G1K spe	3,76	±0,40	20,41	±2,60
G2I spe	4,26	±0,40	23,61	±2,56
G2V spe	3,88	±0,06	21,15	±0,40
G2M spe	3,13	±0,42	16,35	±2,71
G2U spe	4,79	±0,14	27,03	±0,92
G3 spe	5,30	±0,25	30,35	±1,63
G4 spe	4,11	±0,13	22,67	±0,85
G5 spe	3,33	±0,35	17,61	±2,24
G6 spe	4,32	±0,75	24,00	±4,83
G7 spe	3,50	±0,23	18,74	±1,48
<b>G9 spe</b>	<b>12,29</b>	<b>±0,58</b>	<b>75,55</b>	<b>±3,77</b>
G10 spe	2,91	±0,07	14,89	±0,47
G13 spe	3,06	±0,16	15,86	±1,02
G14 spe	4,17	±0,12	12,21	±1,17
G15 spe	2,55	±0,21	12,00	±0,59
G16 spe	5,88	±0,44	34,14	±2,83

\*G1= grupo 1; G2= grupo 2; G3= grupo 3

### 3.5.3 Extratos fúngicos – Micélio MeOH

A determinação de fenóis totais em micélio fúngico por extração com MeOH foi realizada em 26 extratos fúngicos (tabela 8). Verificou-se baixa concentração de fenóis totais

nos extratos, tendo destaque o extrato proveniente do grupo 3 (Ascomiceto preto) com 23,53µg equivalente de ácido gálico.

**Tabela 8-** Determinação de fenóis totais em extratos fúngicos - Micélio/MeOH

<b>Determinação de Fenóis Totais</b>				
<b>Extratos fúngicos Micélio</b>	<b>% Fenóis totais</b>	<b>Desv.pad</b>	<b>µg. Eq Ac. Gálico</b>	<b>Desv.pad</b>
G1N	3,92	±0,46	21,45	±2,99
G1E1	3,04	±0,39	15,76	±2,55
G1E3	3,48	±0,44	18,62	±2,87
G1A4	3,29	±0,12	17,36	±0,76
G1R	3,14	±0,28	16,41	±1,82
G1H	2,51	±0,15	12,32	±0,96
G1G	3,03	±0,10	15,67	±0,64
G1J	3,10	±0,08	16,11	±0,50
G1R1	3,28	±0,02	17,32	±0,16
G1A1	3,21	±0,33	16,83	±2,14
G1K	3,58	±0,76	19,23	±4,90
G2I	3,87	±0,04	21,14	±0,28
G2V	3,44	±0,14	18,32	±0,91
G2M	3,34	±0,51	17,71	±3,28
G2U	3,08	±0,24	16,02	±1,52
<b>G3</b>	<b>4,24</b>	<b>±0,16</b>	<b>23,53</b>	<b>±1,03</b>
G4	3,51	±0,03	18,79	±0,20
G5	3,30	±0,11	17,45	±0,72
G6	3,37	±0,08	17,86	±0,52
G7	3,71	±0,13	20,11	±0,85
G9	3,20	±0,38	16,80	±2,43
G10	3,54	±0,14	18,97	±0,88
G13	3,04	±0,08	15,76	±0,54
G14	2,66	±0,27	13,30	±1,73
G15	2,83	±0,20	14,41	±1,27
G16	3,54	±0,33	19,00	±2,16

Diversos estudos comprovam a correlação existente entre a presença de compostos fenólicos encontrados nos extratos de plantas com a atividade antioxidante (CAI *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2007). Entretanto, poucas pesquisas foram realizadas com o objetivo de estudar os metabólitos secundários com ação antioxidante produzidos por seus fungos endofíticos (HUANG *et al.*, 2007).



### 3.6 Determinação de flavonóides totais dos extratos vegetais e de fungos endofíticos de *Virola venosa*

#### 3.6.1 Extratos vegetais

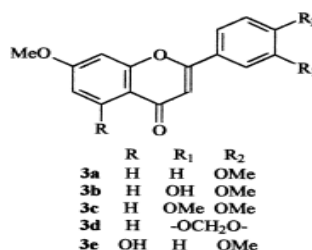
Nos extratos vegetais foi verificada baixa concentração (%) de flavanóides totais em todos os doze extratos (tabela 9). Os extratos de folhas provenientes de MeOH apresentaram dentre os demais a maior concentração, correspondendo a 5,32 µg de compostos fenólicos equivalentes a quercetina utilizada como padrão.

**Tabela 9** - Determinação de flavonóides totais em extratos vegetais

Determinação de Flavonóides Totais				
Extatos vegetais	% Flavonóides	desvpad	µg Eque Quercetina	desvpad
Ga. J. MeOH	1,14	±0,39	1,14	±0,39
Ga. M. MeOH	0,22	±0,22	0,22	±0,22
<b>Fo. MeOH</b>	<b>5,32</b>	<b>±0,20</b>	<b>5,32</b>	<b>±0,20</b>
Caule MeOH	0,44	±0,43	0,44	±0,43
Ga.J.AcOET	0,13	±1,17	0,13	±1,17
Ga. M. AcOET	0,92	±0,18	0,92	±0,18
Fo. AcOET	1,84	±1,01	1,84	±1,01
Caule AcOET	1,48	±0,70	1,48	±0,70
Ga. J Hexano	0,14	±0,55	0,14	±0,55
Ga.M. Hexano	2,77	±0,15	0,77	±0,15
Fo. Hexano	0,79	±1,30	0,79	±1,30
Caule Hexano	1,91	±1,62	1,91	±1,62

A presença de flavonóides em espécies da família Myristicaceae é menos comum do que em outras famílias de angiospermas, mas a ocorrência de determinadas classes de flavonóides é típico de alguns gêneros, e pode ser utilizado para estabelecer relações quimiotaxonômicas. Segundo Valderrama (2000), algumas flavonas já foram isoladas de folhas, flores, frutos e sementes de *Virola venosa* (figura 9).

**Figura 9** – Flavonas de *Virola venosa*



Fonte: (Valdemarra, 2000),

### 3.6.2 – Extratos fúngicos – Meio fermentado – SPE

Em meio fermentado, também foram verificadas baixas concentrações de flavanóides totais, com alguns valores negativos (tabela 10). Dentre estes resultados, a maior concentração foi encontrada no grupo 9.

**Tabela 10** – Determinação de flavonóides totais em extratos fúngicos – Meio fermentado - SPE

<b>Determinação de Flavonóides Totais</b>				
Extratos fúngicos	% Flavonóides	Desv pad	ug Equ Quecetina	Desv pad
G1N spe	0,95	±2,91	0,95	±2,91
G1E1 spe	0,11	±5,62	2,11	±5,62
G1E3 spe	0,55	±3,79	1,55	±3,79
G1A4 spe	-0,22	±1,09	0,22	±1,09
G1R spe	0,16	±0,44	0,16	±0,44
G1B spe	-0,16	±0,14	0,16	±0,14
G1H spe	0,73	±0,56	0,73	±0,56
G1G spe	0,61	±0,32	0,61	±0,32
G1J spe	0,25	±1,57	0,25	±1,57
G1R1spe	0,66	±0,43	0,66	±0,43
G1A1 spe	0,48	±0,47	0,48	±0,47
G1K spe	1,51	±0,86	1,51	±0,86
G2I spe	1,44	±0,13	1,44	±0,13
G2V spe	1,30	±0,85	1,30	±0,85
G2M spe	0,61	±0,31	0,61	±0,31
G2U spe	2,45	±1,77	2,45	±1,77
G3 spe	0,37	±0,12	0,37	±0,12
G4 spe	0,64	±0,33	0,64	±0,33
G5 spe	0,42	±0,27	0,42	±0,27
G6 spe	0,32	±0,08	0,32	±0,08
G7 spe	0,56	±0,21	0,56	±0,21
<b>G9 spe</b>	<b>7,49</b>	<b>±3,21</b>	<b>7,49</b>	<b>±3,21</b>
G10 spe	0,01	±0,00	0,01	±0,00
G13 spe	0,63	±0,19	0,63	±0,19
G14 spe	1,16	±0,54	1,16	±0,54
G15 spe	0,33	±0,24	0,33	±0,24
G16 spe	1,18	±0,54	1,18	±0,54

### 3.6.3 Extratos fúngicos – Micélio MeOH

Nestes ensaios também foram evidenciadas baixas concentrações de flavonóides totais para os extratos fúngicos e alguns resultados negativos (tabela 11). O extrato que apresentou melhor resultado entre os demais foram os provenientes do grupo 3, Ascomiceto preto.

**Tabela 11-** Determinação de flavonóides totais em extratos fúngicos - SPE

<b>Determinação de Flavonóides Totais</b>				
Extratos fúngicos Micélio	% Flavonóides	Desv pad	ug Eque Quercetina	Desv pad
G1N	0,62	±0,40	0,62	±0,40
G1E1	0,44	±0,23	0,44	±0,23
G1E3	0,78	±0,12	0,78	±0,12
G1A4	0,37	±0,14	0,37	±0,14
G1R	0,54	±0,59	0,54	±0,59
G1H	0,53	±0,42	0,53	±0,42
G1G	0,50	±0,26	0,50	±0,26
G1J	0,63	±0,58	0,63	±0,58
G1R1	-0,14	±0,42	0,14	±0,42
G1A1	0,31	±0,40	0,31	±0,40
G1K	0,25	±0,60	0,25	±0,60
G2I	0,78	±0,10	0,78	±0,10
G2V	0,34	±0,37	0,34	±0,37
G2M	0,85	±0,31	0,85	±0,31
G2U	-1,67	±1,43	0,67	±1,43
<b>G3</b>	<b>2,25</b>	<b>±0,59</b>	<b>2,25</b>	<b>±0,59</b>
G4	1,57	±3,29	1,57	±3,29
G5	0,64	±0,77	0,64	±0,77
G6	-0,16	±0,22	0,16	±0,22
G7	2,24	±2,01	2,24	±2,01
G9	1,08	±2,59	1,08	±2,59
G10	0,37	±0,12	0,37	±0,12
G13	-0,79	±1,06	0,79	±1,06
G14	0,77	±0,86	0,77	±0,86
G15	-0,16	±0,21	0,16	±0,21
G16	1,53	±1,22	1,53	±1,22

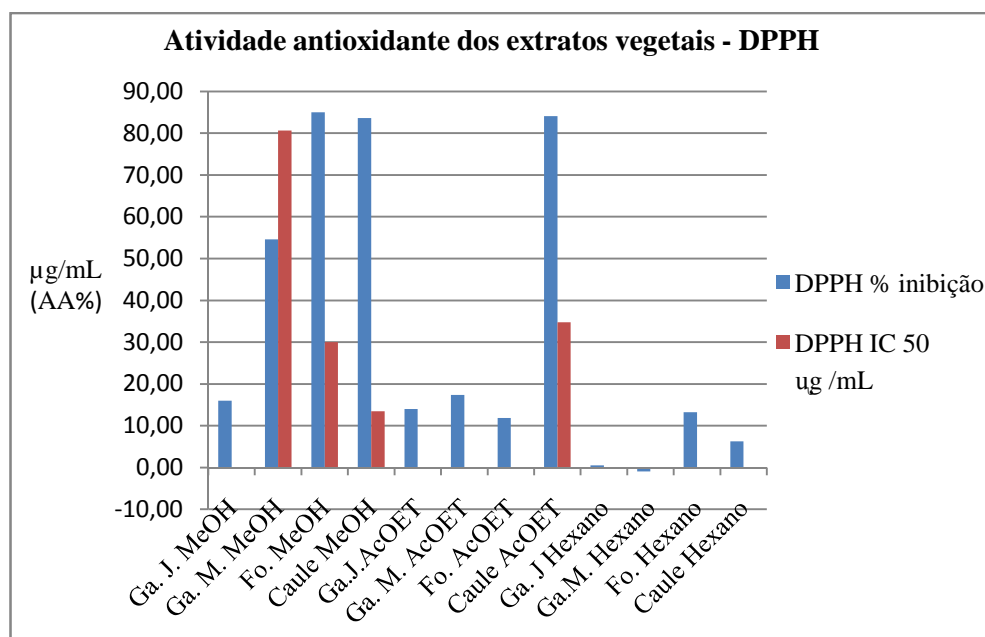
Estudos realizados por Huang *et al.*, (2007), com *Nerium oleandes L.* (Apocynaceae), cujo objetivo era isolar novas substâncias antioxidantes e antimicrobianas produzidas por fungos endofíticos associados a essa planta, evidenciaram substâncias com propriedades cardiotônica, antibacteriana, antiinflamatória, anticâncer, antiplaquetária, inseticida, citotóxica e depressor do sistema nervoso central). Ainda neste estudo, foram isoladas 42 espécies de fungos endofíticos pertencentes a 14 táxons diferentes, distribuídos entre os gêneros *Ascomycetes*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Hyphomycete*, *Mycelia sterilia*, *Phoma* e *Torula*. Os compostos bioativos predominantes encontrados nos extratos desta planta e nos extratos fúngicos foram os ácidos fenólicos e seus derivados, como por exemplo, flavonóides, terpenóides fenólicos, constituintes voláteis e compostos alifáticos.

### 3.7 Ensaio de atividade antioxidante

#### 3.7.1 Capacidade antioxidante dos extratos vegetais de *Virola venosa*- DPPH

Os extratos de galhos maduros, folhas e caule em metanol e caule em acetato de etila apresentaram atividade antioxidante acima de 50%, dentre os quais, os extratos de folhas e de caules extraídos com metanol capturaram respectivamente 85% do DPPH com IC 50 igual 30µg/mL e 84% do DPPH com IC 50 igual a 13,43 µg/mL. No entanto, independente da porcentagem elevada de captura de DPPH, estes resultados não foram superior aos resultados apresentados pelo padrão ácido gálico, cujo valor de radicais livres seqüestrados foi de 98,89% com IC 50 igual a  $3,25 \pm 0,25$  µg/mL (figura 10).

**Figura 10** - Valores correspondentes de concentração de ácido gálico referente às moléculas com atividade antioxidante presente nos extratos vegetais, a partir dos ensaios utilizando DPPH.



O mecanismo de ação dos antioxidantes são diversos, agindo, por exemplo, na remoção do oxigênio do meio, no sequestro de metais catalisadores que auxiliam na formação de radicais livres, no aumento da geração de antioxidantes endógenos, ou mesmo na interação de mais de um mecanismo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990; ARAÚJO, 2004).

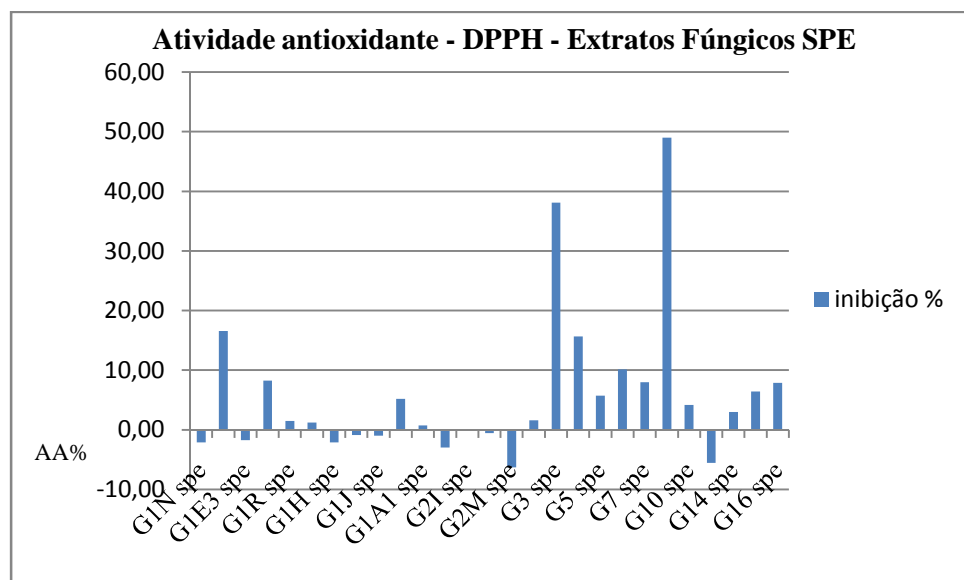
Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (AUTOI *et al.*, 2005).

Os radicais derivados do oxigênio, gerados por vários processos de óxido-redução, podem agir de forma danosa em várias enzimas que agem como protetoras do estresse oxidativo tais como: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Desta forma, agente antioxidantes são de fundamental importância para proteção do organismo contra o estresse oxidativo (ELLNAIN – WOJTASZEK *et al.*, 2003).

### 3.7.2 Capacidade antioxidante dos extratos fúngicos de *Virola venosa*- DPPH - Meio fermentado - SPE

A figura 11 apresenta a porcentagem de inibição referente às moléculas com atividade antioxidante presente nos extratos fúngicos a partir dos ensaios utilizando DPPH. Como não houve inibição acima de 50% não foi calculada IC 50 para estes extratos.

**Figura 11** – Atividade antioxidante dos extratos fúngicos - SPE



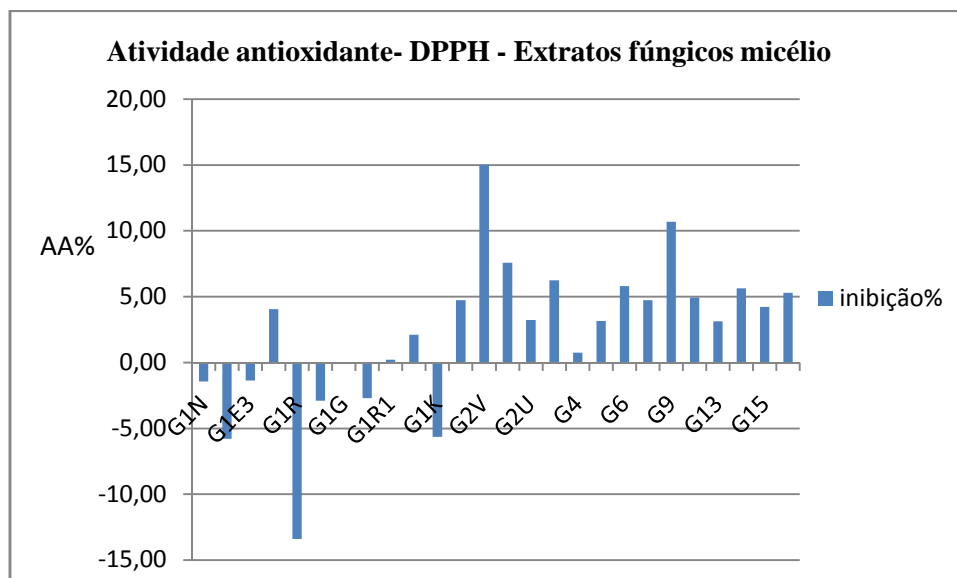
Os extratos em destaque pertencem ao G9 com 49% de atividade antioxidante e G3 com 38,10%. Estes extratos se destacam entre todos os outros com relação a fenóis totais e flavonóides totais respectivamente.

É incorreto afirmar que outros isolados endofíticos de *Virola venosa* não sejam capazes de seqüestrar radicais livres, pois talvez as condições de cultivo neste trabalho não tenham permitido a biossíntese de moléculas antioxidantes pelos micro-organismos estudados.

### 3.7.3 Capacidade antioxidante dos extratos extratos fúngicos –Micélio MeOH

A figura 12 apresenta a porcentagem de inibição referente às moléculas com atividade antioxidante presente nos extratos fúngicos, a partir dos ensaios utilizando DPPH. Pode - se observar através do gráfico abaixo que não houve inibição dos radicais de DPPH acima de 50% e por isso não foi calculada IC 50 para estes extratos.

**Figura 12** - Atividade antioxidante dos extratos fúngicos- Micélio



Apesar dos extratos fúngicos do G2V e G9 terem apresentado os maiores valores de atividade antioxidante, não podem ser considerados como extratos promissores, visto que a porcentagem se deu abaixo de 50%, ou seja, nenhum dos extratos fúngicos se destacou em relação à presença de compostos com atividade antioxidante.

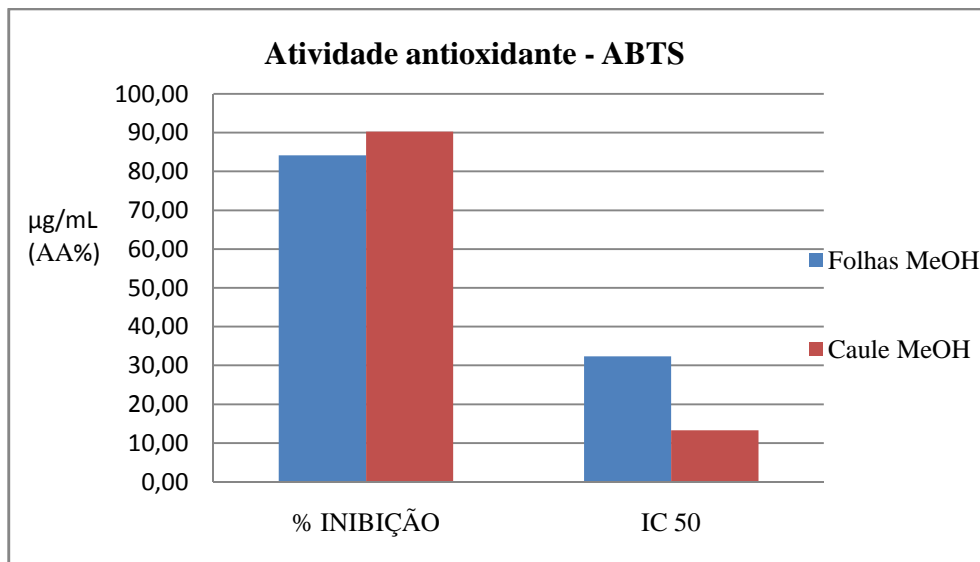
### 3.7.4 Atividade antioxidante dos extratos vegetais – ABTS<sup>+</sup> e SUPERÓXIDO

O método ABTS<sup>+</sup> que é um método indireto de reação oxi-redução entre oxidante e o antioxidante, é capaz de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, tendem a ligar o elétron não pareado com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, comportando-se como receptores (oxidantes) ou como doadores (redutores) de elétrons. O íon superóxido mostrou-se como uma alternativa interessante para testar a atividade antioxidante destes extratos, visto que essa metodologia baseia-se na capacidade de redução de um íon e não de um radical livre, como no caso do DPPH. Dessa forma, foi possível verificar a presença de moléculas com ação antioxidante diferentes.

### 3.7.5 Capacidade antioxidante - Método ABTS<sup>+</sup>

Como pode ser observado na figura 13, os extratos que produziram maiores valores de atividade antioxidante foram os provenientes das folhas e dos caules extraídos em metanol.

**Figura 13** – Atividade antioxidante ABTS<sup>+</sup> nos extratos de caule e folha em MEOH



Podemos observar que a inibição de atividade antioxidante foi maior em extrato de caule extraído com metanol, o qual apresentou 90% de inibição e IC 50 igual a 13,26 μg/mL, resultado que, se comparado com os obtidos no método utilizando DPPH, apresentou ligeiramente maior eficiência.

Este fato pode ter ocorrido em virtude de algumas diferenças do radical ABTS<sup>+</sup>, apesar de semelhante ao DPPH quanto a excelente estabilidade em determinadas condições de análise. O radical DPPH já vem pronto para uso e é solúvel em solventes orgânicos, enquanto o ABTS<sup>+</sup> necessita ser gerado antes por reações químicas (como persulfato de potássio) ou enzimáticas, e é solúvel em água e solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas, sendo um radical estável na ausência de antioxidantes e além disso, oferece o máximo de absorção e uma boa solubilidade (ARNÃO, 2000).

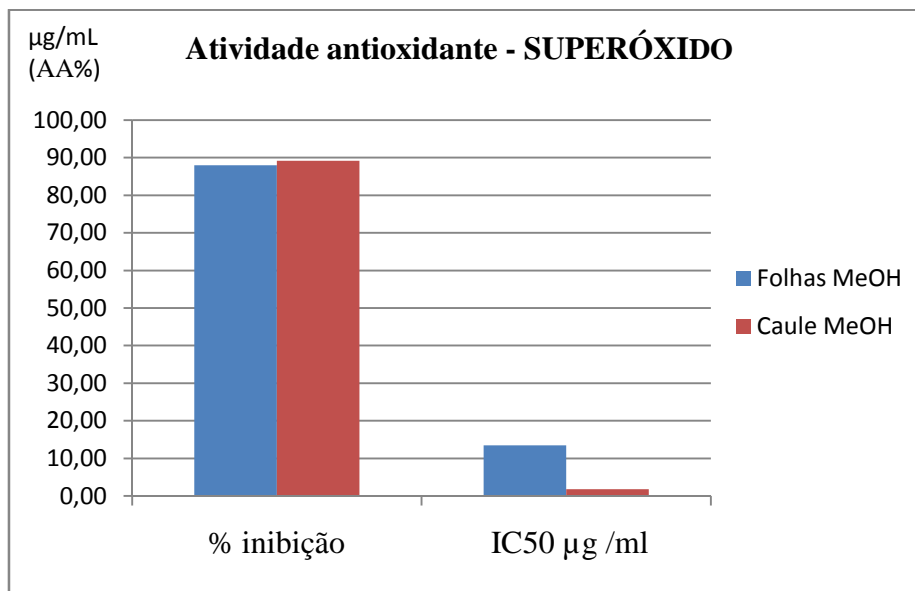
### 3.7.6 Capacidade antioxidante - Método SUPERÓXIDO

Considerando o mecanismo de atuação, no método utilizado para avaliar a capacidade sequestradora, o radical  $O_2^-$  produzido, reduz nitroblue tetrazolium (NBT) a formazan em pH 7,4 e temperatura ambiente, mudando a coloração amarela pálida do NBT para uma coloração púrpura do formazan, que é detectado por espectrofotometria em 405nm. As moléculas que atuam como antioxidante reagem com  $O_2^-$  inibindo a produção do formazan (da SILVA *et al.*, 1991).

Segundo Gaulejac *et al.*, (1999) utilizaram este método para avaliar a atividade sequestradora do radical superóxido em vinho tinto, e concluíram que esta atividade, usualmente atribuída aos taninos procianídicos, está também relacionada às antocianinas presentes nesta bebida.

Os extratos de folhas e caules extraídos com metanol, foram selecionados e testados frente ao Superóxido, tendo sido encontrada melhor atividade antioxidante nos extratos de caule (figura 14).

**Figura 14** - Atividade antioxidante – inibição do superóxido com extratos de caule e folha em MEOH



Pode-se observar que o extrato proveniente de caule MeOH está levemente em destaque, com 89,19% de inibição dos radicais, enquanto o extrato de folhas encontra-se com 88% de inibição do ânion superóxido, porém há uma grande diferença no IC50 dos dois extratos, de certo que quanto menor o IC50 maior a atividade antioxidante.



### 3.8 Atividade antimicrobiana

#### 3.8.1 Atividade antimicrobiana qualitativa dos extratos vegetais - Aplicação dos discos de difusão

Do total de extratos testados, apenas três (25%) apresentaram atividade antimicrobiana contra *P. aureuginosa*, como pode ser observado nos dados da tabela 12. Dos extratos que apresentaram metabólitos secundários com atividade antibacteriana, dois são provenientes de caule e um de folha, extraídos em metanol e acetato de etila.

**Tabela 12** - Resultado do teste preliminar antimicrobiano entre extratos de *V. venosa* e bactérias/fungos - teste.

Atividade antimicrobiana – Extratos vegetais					
Extratos vegetais	<i>E. coli</i>	<i>P. aureuginosa</i> ,	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Fo. Hexano	-	-	-	-	-
Ga.J. Hex	-	-	-	-	-
Ga. M . Hex	-	-	-	-	-
Ca.Hex	-	-	-	-	-
Fo. AcOET	-	-	-	-	-
Ga.J. AcOET	-	-	-	-	-
Ga. M . AcOET	-	-	-	-	-
Ca. AcOET	-	+	-	-	-
Fo. MeOH	-	+	-	-	-
Ga. J. MeOH	-	-	-	-	-
Ga. M. MeOH	-	-	-	-	-
Ca. MeOH	-	+	-	-	-

\* (+) = presença de halo de inibição do crescimento do microbiano; (-) = ausência de halo de inibição do crescimento do microbiano

Filho e Yunes, (1998), relatam em seus trabalhos que o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos com efeitos biológicos.

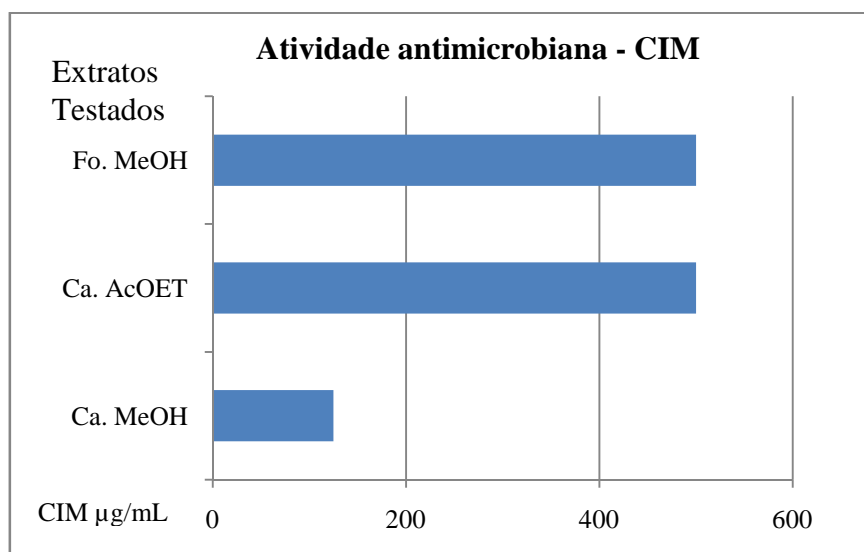
Os três extratos apresentaram atividade de inibição do crescimento da bactéria *P. aureuginosa*, todos eles apresentaram halo de inibição de 1cm de diâmetro após 48 horas e o

controle positivo (tetraciclina 2mg/mL) apresentou halo de 2cm. *P. aureuginosa* é micro-organismo que possui forma de bacilos gram negativo, aeróbio, facultativo com mínimas exigências nutricionais, tolera grandes variedades de temperatura, vive no ambiente (solo, plantas, frutas e vegetais), tem predileção por umidade. Infelizmente, com o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos, a incidência de *P. aureuginosa* multiresistente está aumentando e o tratamento clínico destas infecções se torna um desafio (LIMA, 2006).

### 3.8.2 Atividade antimicrobiana quantitativa dos extratos vegetais - Determinação da concentração inibitória mínima – CIM

Os três extratos testados que apresentaram atividade antimicrobiana na avaliação preliminar foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (figura 15) pela técnica de microdiluição em caldo (LIMA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007).

**Figura 15-** Resultado do teste CIM entre extratos de *V. venosa* e *P. aureuginosa*,



Através dos resultados expressos na figura 15, pode-se perceber que o extrato que apresentou a menor concentração para inibir o crescimento de *P. aureuginosa* foi o extrato bruto de caule MeOH, o qual apresentou o segundo melhor desempenho na determinação de fenóis totais, com 9,74% destes e 59,05 µg eq de ácido gálico. Este extrato apresentou também, juntamente com os extratos de folhas extraído em MeOH e de caule extraído em AcOEt, os melhores desempenhos de atividade antioxidante frente ao DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>+</sup> e ao ânion superóxido.

Aligianis *et al.*, (2001), propuseram uma classificação para materiais vegetais quanto a inibição do crescimento de micro-organismos, com base nos resultados de CIM,

considerando como forte inibição concentrações até 500µg/mL; moderada com CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca com CIM acima de 1600 µg/mL. Os valores encontrados (125 e 500 µg/mL) estão na faixa de forte inibição.

Os resultados apontados levam a crer na correlação que há entre estes metabólitos dos extratos estudados relacionando fenóis totais, atividade antioxidante e antimicrobiana, segundo Lai *et al.*, (1991) a capacidade antioxidante de produtos naturais está relacionada com sua composição de compostos fenólicos e a ação desses é interromper a cadeia de radicais livres na etapa de iniciação do processo oxidativo.

Foi possível perceber que a planta estudada, apresentou resultados razoáveis frente às atividades biológicas testadas, porém para que tenha considerável relevância na obtenção de novos antimicrobianos e antioxidantes naturais, é necessário um estudo mais profundo, tais como purificações, caracterizações, testes biológicos de compostos isolados até que se alcance compostos bioativos.

### 3.8.3 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana – Screening em placa ELISA-extratos fúngicos – Meio fermentado - SPE

Sete extratos (25,9%) de isolados endofíticos de *Virola venosa* apresentaram atividade antifúngica frente ao fungo *C. albicans*. Este fungo é uma espécie diplóide que causa, oportunamente, alguns tipos de infecção oral e vaginal nos seres humanos (Tabela 13).

**Tabela 13** – Resultado do teste de atividade antimicrobiana entre extratos fúngicos de *V. venosa* e bactérias/fungos - teste.

Atividade antimicrobiano – Extratos fúngico – Meio fermentado					
Extrato fúngico	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
G1N SPE	-	-	-	-	-
G1E1 SPE	-	-	-	-	-
G1E3 SPE	-	-	-	-	-
G1A4 SPE	-	-	-	-	-
G1 R SPE	-	-	-	-	-
G1B SPE	-	-	-	-	-
G1H SPE	-	-	-	-	-
G1G SPE	-	-	-	-	-
G1J SPE	-	-	-	-	-
G1R1 SPE	-	-	-	-	-
G1A1 SPE	-	-	-	-	-
G1K SPE	-	-	-	-	-
G2I SPE	-	-	-	-	-
G2V SPE	-	-	-	-	-
G2M SPE	-	-	-	-	+
G2U SPE	-	-	-	-	+
G3 SPE	-	-	-	-	-
G4 SPE	-	-	-	-	-
G5 SPE	-	-	-	-	-
G6 SPE	-	-	-	-	-
G7 SPE	-	-	-	-	+
G9 SPE	-	-	-	-	+
G10 SPE	-	-	-	-	-
G13 SPE	-	-	-	-	+
G14 SPE	-	-	-	-	+
G15 SPE	-	-	-	-	-
G16 SPE	-	-	-	-	+

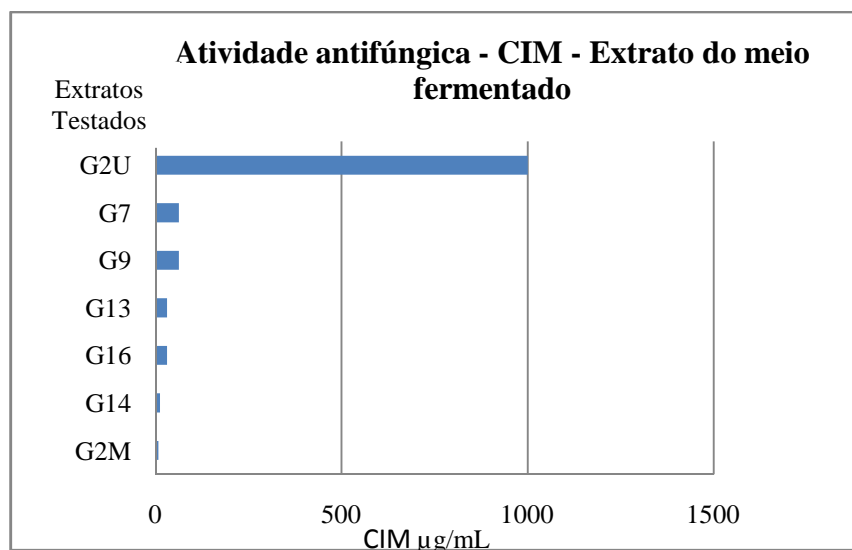
\* (+) = inibição do crescimento do microbiano; (-) = ausência de inibição do crescimento do microbiano

Os extratos (G2U e G2M) provenientes do grupo 2 *Colletotrichum*, apresentaram atividade antifúngica, também apresentaram atividade de inibição um extrato do grupo 7 e um extrato do grupo 9, assim como um extrato proveniente do grupo 13 um do grupo 14 e 16, estes foram direcionados a teste de atividade antimicrobiana quantitativa.

### 3.8.4 Atividade antimicrobiana quantitativa dos extratos fúngicos - Meio fermentado - SPE - Determinação da concentração inibitória mínima - CIM

Na figura 17, podemos visualizar a concentração de inibição de cada extrato frente a o micro-organismo testado, a menor concentração foi do extrato G2M, extrato proveniente do fungo *Colletotrichum* com 7,8 µg/mL para inibição. O extrato G14 proveniente de uma levedura inibiu com 12,5 µg/mL, G16 e G13 inibiram o micro-organismo na concentração de 31,2 µg/mL, os provenientes do G9 e G7 inibiram na concentração de 62,5 µg/mL e o extrato do grupo G2U apresentou a maior concentração para inibição, com 1000 µg/mL.

**Figura 16** – Atividade antifúngica dos extratos fúngicos de *Virola venosa* frente a *C. albicans*.



Segundo a classificação de Aligianis *et al.*, (2001), é considerado como forte inibição até 500µg/mL; inibição como moderada CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca. Contudo todos os extratos exceto G2U apresentaram inibição forte frente a *C. albicans*.

De acordo com Souza (2004), na China, conseguiram isolar de *Colletotrichum sp.* um novo metabólito bioativo para inibição de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e *Pseudomonas sp.* Este micro-organismo tinha sido isolado de *Artemisia annua*, planta medicinal de onde se extrai a artemisinina, droga antimalárica. De *Artemisia mongolica* foi isolado *Colletotrichum gloeosporioides* com as mesmas atividades acima citadas para *Colletotrichum sp.* (ZOU *et al.*, 2000; HONG LU *et al.*, 2000). Contudo neste trabalho uma linhagem de *Colletotrichum* aqui ensaiada apresentou atividades antifúngicas frente a *C. albicans*.

### 3.8.5 Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana – Screening em placa ELISA- Extratos fúngicos – Micélio MeOH

Foram encontrados oito extratos (29,6%) de isolados endofíticos de *Virola venosa* com atividade antifúngica frente a *C. albicans*. Os extratos que apresentaram resultados positivos, foram dos grupos G1K, G2M, G2V, G2I, G3, G5, G13 E G16. Estes extratos foram direcionados ao teste de atividade antimicrobiana quantitativa.

**Tabela 14** – Resultado do teste de inibição de micro-organismos, extratos fúngicos – extratos do micélio em metanol de *V. venosa* frente bactérias/fungos – teste.

Atividade antimicrobiano – Extratos fúngico – Micélio MeOH					
Extrato fúngico	<i>E. coli</i>	<i>P. aeuiginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
G1N	-	-	-	-	-
G1E1	-	-	-	-	-
G1E3	-	-	-	-	-
G1A4	-	-	-	-	-
G1 R	-	-	-	-	-
G1B	-	-	-	-	-
G1H	-	-	-	-	-
G1G	-	-	-	-	-
G1J	-	-	-	-	-
G1R1	-	-	-	-	-
G1A1	-	-	-	-	-
G1K	-	-	-	-	+
G2I	-	-	-	-	+
G2V	-	-	-	-	+
G2M	-	-	-	-	+
G2U	-	-	-	-	-
G3	-	-	-	-	+
G4	-	-	-	-	-
G5	-	-	-	-	+
G6	-	-	-	-	-
G7	-	-	-	-	-
G9	-	-	-	-	-
G10	-	-	-	-	-
G13	-	-	-	-	+
G14	-	-	-	-	-
G15	-	-	-	-	-
G16	-	-	-	-	+

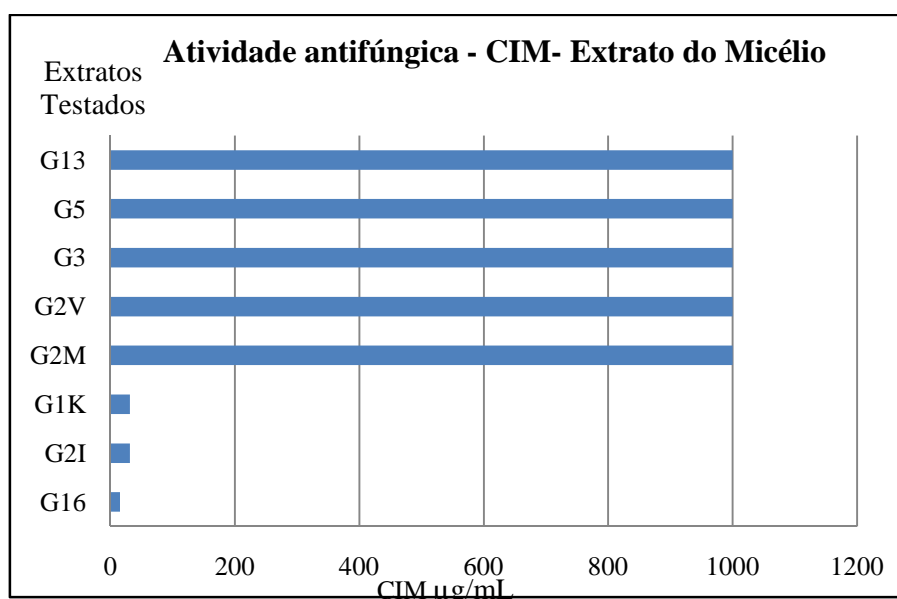
\* (+) = inibição do crescimento dos patógenos; (-) = ausência de inibição do crescimento dos patógenos

Fica evidente a repetição de resultados positivos em alguns extratos provenientes do mesmo fungo, ou seja, o extrato do G16 em meio fermentado apresentou atividade antimicrobiana, assim como o extrato do seu micélio, e isto fica evidente para o G2M e G16. Isso significa que este fungos são capazes de produzir internamente tais substâncias que possuam esta ação, assim como também podem liberá-las para um meio extra celular.

### 3.8.6 Atividade antimicrobiana quantitativa dos extratos fúngicos - Micélio MeOH - Determinação da concentração inibitória mínima - CIM

Os oito extratos testados que apresentaram atividade antifúngica na avaliação preliminar foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo (LIMA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2007) (figura 18).

**Figura 17** - Atividade antifúngica dos extratos de micélio fúngico de *Virola venosa* frente a *C. albicans*. Concentração mínima de inibição para cada extrato testado



O melhor desempenho em atividade antifúngica foi encontrado no extrato G16 na concentração de 15,6 µg/mL, sendo este extrato proveniente do micélio de um *Penicillium*.

*Penicillium* constituem um grupo de micro-organismos que sintetizam elevada quantidade de metabólitos secundários, atingindo em certos casos, uma produção 73% superior a de outras classes de micro-organismos (CAFÊU *et al.*, 2005). Estes fungos anamorfos são representados por aproximadamente 225 espécies com 347 sinonímias, além dos teleomorfos, *Eupenicillium* (45 espécies) e *Talaromyces* (24 espécies) (PITT, 2000).

Da Silva (2010), trabalhando com *Penicillium* verificou que a maioria dos extratos apresentou atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e *C. albicans*. A atividade observada para os três grupos de micro-organismos pode ser atribuída a vários constituintes sintetizadas por eles.

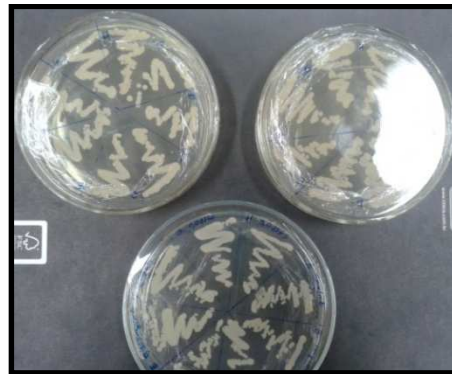
Os extratos G2I e G1K apresentaram inibição na concentração de 31,25 µg/mL. De modo que o extrato de G2I pertence ao grupo de fungos do gênero *Colletotrichum*, e G1K

pertence ao Ascomiceto *Phomopsis*. Os demais extratos apresentaram atividade antimicrobiana a partir da concentração de 1000 µg/mL, o que os caracteriza como fracos.

Não foram observados casos em que os metabólitos promoveram um maior crescimento dos micro-organismos. Os trabalhos de Araújo (1996) e Souza *et al.*, (2004) também observaram resultados semelhantes ao realizar ensaios de culturas pareadas entre micro-organismos endofíticos de *Citrus* e de plantas tóxicas da Amazônia, contra diferentes bactérias patogênicas.

Os extratos do grupo G2M em meio fermentado e os extratos do micélio do grupo G16 tiveram melhor destaque contra *C. albicans* e foram avaliados quanto à inibição ser fungistática ou fungicida. Foi observado crescimento de *C. albicans*, frente aos extratos testados, indicando atividade fungistática. A figura 18 mostra o crescimento do micror-organismo nas placas.

**Figura 18** – Crescimento de *Candida albicans* após 24h



Estes resultados indicam uma complexidade na interação entre a microbiota endofítica e seu hospedeiro, visto que a partir da produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, o endófito pode estar auxiliando a planta a se defender contra patógenos. Do ponto de vista biológico, a produção de um dado metabólito pode ser fundamentada em vários mecanismos envolvidos na interação entre um micro-organismo e seu habitat, como por exemplo, a competição por nicho onde um micro-organismo ocupa o mesmo espaço que outro, e depois competição por nutrientes, ou ainda ser apenas produto do seu metabolismo.



## 4 CONCLUSÃO

A pesquisa do isolamento de fungos endofíticos e sua caracterização se mostraram promissora, em decorrência dos grupos de fungos isolados e sua importância quanto as suas atividades biológicas testadas, sendo relevante e possível para a obtenção de novos produtos com ação antimicrobiana e antioxidante.

Quanto aos testes de verificação dos extratos vegetais e fúngicos para fenóis e flavonóides totais, pode-se verificar que tanto os isolados quanto os extratos vegetais são capazes de produzir tais compostos, entretanto, necessitam de estudos complementares, em que a extração dos extratos, cultivo e produção de fungos sejam em condições melhores que possam sintetizar metabólitos secundários.

As atividades antioxidantes tanto dos extratos vegetais brutos quanto dos extratos dos fungos endofíticos, nos métodos direto e indireto utilizados na captura de radicais livres, os resultados podem servir como um indicador, embora o IC50 não tenha sido relevante, em extratos vegetais e fúngicos. Entretanto, são necessários repetições e estudos mais profundos que possam validar e relacionar as interações desses micro-organismos com sua hospedeira.

Os extratos vegetais testados, apenas três (25%) apresentaram atividade antimicrobiana contra *P. aureuginosa*, destacando-se os provenientes de caule e folhas. Demonstrando que esses extratos apresentaram testes positivos para as classes de compostos de metabólitos secundários. E os extratos extraídos dos fungos endofíticos, quinze apresentaram atividade antifúngica na avaliação preliminar que foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição.

O melhor desempenho em atividade antifúngica foi encontrado no extrato G16 na concentração de 15,6 µg/mL, sendo este extrato proveniente do micélio de um *Penicillium* e G2M na concentração de 7,8 µg/mL proveniente do meio líquido fermentado de um *Colletotrichium*.

Estes resultados indicam uma complexidade na interação entre a microbiota endofítica e seu hospedeiro a *Virola venosa*, na produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, o endófito pode estar auxiliando a planta a se defender contra patógenos. Portanto, a produção de fungos endofíticos pode ser mecanismos envolvidos na interação entre um micro-organismo e seu habitat, como por exemplo, a competição por nicho onde um micro-organismo ocupa o mesmo espaço que outro, e depois competição por nutrientes, ou ainda ser apenas produto do seu metabolismo.

## 5 REFERÊNCIAS

- AHLHOLM, J.; HELANDER, M.L.; ELAMO, P.; SALONIEMI, I.; NEUVONEN, S.; HANHIMAKI, S.; SAIKKONEN, K. **Micro-fungi and invertebrate herbivores on birch trees: fungal mediated plant–herbivore interactions or responses to host quality?** Ecology Letters, v.5, p. 648- 655. 2002.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. **Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 40, p. 4168-4170, 2001.
- ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKY SOBRAL, J.; LACAVAL, P.T. **Manual isolamento de microrganismos endofíticos.** Piracicaba: CALQ, 2002. 86 p.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática.** 3º ed. Viçosa: Editora UFV, 2004. 480p.
- ARAÚJO, W. L. 1996. **Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros.** Dissertação de Mestrado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 111p. 1996.
- ARNÃO M. B; CANO A; ACOSTA, M. **A method to measure antioxidant activity in organic media: application to lipophilic vitamins.** Redox Rep, v 5, p. 365-370, 2000.
- ASSUMPTIÃO, L. C.; LAÇAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. **Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. **Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile.** Food Chem., v. 89, p. 27-36, 2005.
- AZEVEDO, J. L. **Microorganismos endofíticos.** In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137. 1998.
- BRAND, A.; GOW, N. A. R.; **Mechanisms of hypha orientation of fungi.** Curr Opin Microbiol. Science, v. 12, n. 4, p.350–357, 2009.
- CAFÊU, M. C, Silva G. H, Teles H. L, Bolzani V. S, Araújo A. R. **Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae).** Quim. Nova; v.28: 991-5, 2005.
- CLAY, K. **Fungal Endophytes of Grasses: a Defensive Mutualism Between Plants and Fungi.** Ecology, 69: 10-16, 1988
- CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. **Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer.** Life Sciences, v. 74, p. 2157-2184, 2004.
- CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHEN, J. **Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary methods.** J. Food Drug Analysis, 10: 178-182,2002.

CORDEIRO Neto, F.; DIETRICH, S. M. C.. **Phytoalexin Induction by Leaf-Surface Fungi of Tropical Rubiaceae**. *Ciência e Cultura*, 44(45): 342–344, 1992.

CHUN, S. S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. T.; SHETTY, K. **Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori***. *Process Biochem.*, v. 40, p. 809-816, 2005.

da SILVA, J. C; FERNANDES, O. C. C; MARTINS, M. da S; RODRIGUES JR, A. da C; TEIXEIRA, M. F. S. **Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação**. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia*, v. 30, p 48-54, 2010.

da SILVA, J. M. R.; DARMON, N.; FERNANDEZ, Y.; MITJAVILAT, S. **Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium***. *J. Agric. Food Chem*, v. 39, 1549 p, 1991.

D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C.. **Mycotoxins**. *Animal Feed Science and Technology*, 69: 155-166, 1997.

ELLNAIN-WOJTASZEK, M; KRUCZYNSKI, Z; KASPRZAK, J. **Investigation of the free radical scavenging activity of *Ginkgo biloba* L. leaves**. *Fitoterapia*, v. 74, p. 1–6, 2003.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FILHO, V.C; YUNES, R. A. **Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade**. *Química Nova*, v 21(1), p. 99 -105, 1998.

GAULEJAC, N. S. De; GLORIES, Y.; VIVAS, N. **Free radical scavenging effect off anthocyanins in red wines**. *Food Res. Int*, v. 32, 327, 1999.

GUIMARÃES, A. C. 2005. **Estudo químico e biológico de *Cladoclea micrantha*, uma planta medicinal da região amazônica**. 2005. 330f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005.

HANLIN, R.T.; MENEZES, M. **Gêneros ilustrados de ascomicetos**. UFRPe. Recife-PE. 274p. 1996.

HASLAM, E. **Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action**. *J. Nat. Prod.*, v.59, p. 205-15, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press. 1990. 543p.

HONG LU; ZOU, W. X.; MENG, J. C.; HU, J.; TAN, R. X. **New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *artemisia annua***. *Plant Science*, 151: 67–73. 2000.

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; HYDE, K. D.; CORKE, H.; SUN, M. **Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (*Apocynaceae*): main constituents and antioxidant activity**. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 23, p. 1253-1263, 2007.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. **Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LAI, S. M; GRAY, J. I; SMITH, D. M; BOOREN, A. M; CRAKEL, R. L; BUCKLEY, D. J. **Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets.** *J Food Sci.*;v. 56(3):p. 616-20, 1991.

LIMA, D. A. F. S. 2006. ***Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiplos antimicrobianos: avaliação do seu mecanismo de disseminá-los na Unidade de Emergência do HCFMRP-USP com base na análise de fatores de risco dos pacientes e na genotipagem das amostras.** 2006 (tese). Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2006.

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

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. **Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável.** *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental.** 2º Ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MOEIN, S.; FARZAMI, B.; KHAGHANI, S. **Antioxidant properties and protective effect on cell cytotoxicity of *Salvia mirzayani*.** *Pharm Biol*, v.46, p. 458-463, 2007.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. **Extractions and analysis of phenolics in food.** *J. Chromatogr. A.*, v. 1054, n.1-2, p.95- 111, 2004.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Microorganismos endofíticos.** *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v. 29, p. 62-77, 2002.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. **Microorganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas.** *Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

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

PITT, J. I. **A laboratory guide to common *Penicillium* species.** Australia: Academic Press. 2000.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. **Flavonoids are scavengers of superoxide anions.** *Biochem. Pharmacol.*, v. 37, n. 5, p. 837-841, 1988.

RODRIGUES, K.f.; DIAS-FILHO, M.B. **Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizanthacv. Marandu* and *B. humidicola*.** *Pesq. Agropec. Bras*, 31(12): 905-909, 1996.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI, A. J. C., FERNANDES, L. G. **Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes**. Rev Bras Farmacogn.; v. 17(2), p. 215-9. 2007.

SOARES, J.B.; CASIMIRO, A.R.S.; AGUIAR, L.M.B.A. **Morfologia dos fungos filamentosos-bolores ou mofosos**. Microbiologia Básica cap. V, 1987. p.71.

SOARES, S. E. **Ácidos fenólicos como antioxidantes**. Rev. Nutr., 15, 71. 6. 2002.

SOUZA, M.L. **Utilização de micro-organismos na agricultura: uso de agentes microbianos na agricultura brasileira**. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, n.21, p.28-31, 2001.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; FILHO, A. S.; PINHEIRO, M. L. B.; ARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham**. Acta Amazonica, n. 34(2), p. 185-195, 2004.

SONG, Y. C.; HUANG, W. Y.; SUN, C.; WANG, F. W.; TAN, R. X. **Characterization of graphislactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides***. Biological & Pharmaceutical Bulletin, v. 28, p. 506-509, 2005.

STROBEL, G.A; DIRKSE, E.; SEARS, J; MARKWORTH, C. **Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus**. Microbiology, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 24.ed. Rockville U.S.: Pharmacopeial Convention; 2000. p.2149-63.

VALDERRAMA, J. C. M. **Distribution of flavonóides in the Myristicaceae**. Phytochemistry, v. 55, p 505-511, 2000.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L. **Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products**. J. Agric. Food. Chem., n. 46, p 4113 - 4117, 1998.

ZOU, W. Z.; MENG, J. C.; LU, H.; CHEN, G. X.; SHI, G. X.; ZHANG, T. Y.; TAN, R. X. **Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica***. Journal of Natural Products, n. 63(11), p. 1529-1530, 2000.