

CARLA ANDRÉA LEITE

**Influência Das Condições De Cultivo e Métodos De Extração  
Na Produção De Metabólitos Antioxidantes Por Fungos Isolados Do Litoral  
Paulista.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, com parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado  
Co-Orientador: Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

Araraquara  
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

L533i	<p>Leite, Carla Andrea</p> <p>Influência das condições de cultivo e métodos de extração na produção de metabólitos antioxidantes por fungos isolados do litoral paulista / Carla Andrea Leite. - Araraquara : [s.n], 2010 117 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado Co-orientador: Eduardo Maffud Cilli</p> <p>1. Biotecnologia. 2. Compostos bioativos. 3. Fungos marinhos. 4. Antioxidantes. I. Título.</p>
-------	---

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara  
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

## Curriculum Vitae

---

### Dados Pessoais

**Nome** Carla Andréa Leite  
**Nascimento** 02/06/1986 - Matão/SP - Brasil

---

### Formação Acadêmica/Titulação

- 2008 - 2010** Mestrado em Biotecnologia.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil  
Título: Influência Das Condições De Cultivo E Métodos De Extração Na Produção De Metabólitos Antioxidantes Por Fungos Isolados Do Litoral Paulista., Ano de obtenção: 2010  
Orientador: Sandra Regina Pombeiro Sponchiado  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2004 - 2007** Graduação em Ciências Biológicas.  
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil  
Título: Contaminação por Bactérias do Gênero *Staphylococcus* e Enterobactérias em Telefones Públicos do Município de Araraquara  
Orientador: Wilton Rogério Lustrí
- 

### Formação complementar

- 2008 - 2008** Extensão universitária em Técnicas de Separação Cromatográficas.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em História Natural dos Anfíbios.  
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
- 2007 - 2007** O Aquecimento Climático em Debate.  
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Resíduos na Pesquisa.  
Instituto de Química, UNESP, Araraquara, Brasil
- 2007 - 2007** Extensão universitária em Terapia celular. Células-tronco: A polêmica da ciê.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Proteínas Recombinantes e Suas Aplicações.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

- 2006 - 2006** Plantas Tóxicas: Conhecer Para Prevenir Acidentes.  
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Organização do Genoma.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Meio Ambiente e Biocombustíveis.  
Instituto de Química, UNESP, Araraquara, Brasil
- 2006 - 2006** Extensão universitária em Produção de Fármacos Através do Uso da Biotecnolog.  
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
- 2005 - 2005** Aves Urbanas.  
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em O Mundo dos Fungos.  
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Aspectos Ecológicos e Patogênicos de Fungos Relaci.  
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
- 2004 - 2004** Bioespeleologia de Gênese de Cavernas.  
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil
- 2004 - 2004** Curso de curta duração em Taxonomia de Formigas.  
Centro Universitário de Araraquara, UNIARA, Araraquara, Brasil

---

### **Produção bibliográfica**

#### **Short communication publicados em periódicos**

1. LEITE, C. A., GONCALVES, Rita de Cássia Ribeiro, PRETTI, T. S., MARQUES, M. P., CAPORALIN, J. B., BERLINCK, R. G. S., SPONCHIADO, Sandra Regina Pombeiro  
Evaluation of antioxidant activity of extracts from *Aspergillus terreus* obtained in different culture conditions. HOLOS Environment (Online). , v.9, p.55 - 55, 2009.
2. MARQUES, M. P., PRETTI, T. S., LEITE, C. A., CAPORALIN, J. B., SPONCHIADO, Sandra Regina Pombeiro  
Evaluation of hydrolysis sugar cane bagasse for filamentous fungi. HOLOS Environment (Online). , v.9, p.57 - 57, 2009.
3. CAPORALIN, J. B., CAPORALIN, C. B., LEITE, C. A., PRETTI, T. S., MARQUES, M. P., BERLINCK, R. G. S., SPONCHIADO, Sandra Regina Pombeiro  
Potential application of marine-derived fungi for the concentration and recovery of rare earth metals. HOLOS Environment (Online). , v.9, p.103 - 103, 2009.

4. PRETTI, T. S., MARQUES, M. P., CAPORALIN, J. B., LEITE, C. A., SPONCHIADO, Sandra Regina Pombeiro  
Use of industrial by-products as substrate from melanin production by *Aspergillus nidulans*. HOLOS Environment (Online). , v.9, p.149 - 149, 2009.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. LEITE, C. A., CRUZ, F. G., LUSTRI, W. R.  
Contaminação por bactérias do gênero *Staphylococcus* e Enterobactérias em telefones públicos do município de Araraquara/SP. In: 7º Congresso Nacional de Iniciação Científica e 5º Congresso Internacional de Iniciação Científica, 2007, Sorocaba.  
**7º Congresso de Iniciação Científica CONIC – SEMESP e 5º Congresso Internacional de Iniciação Científica COINT-SEMESP. , 2007.**

2. LEITE, C. A., CRUZ, F. G., LUSTRI, W. R.  
Perfil de Sensibilidade/Resistência das cepas de enterobacterias isoladas a partir de telefones públicos do município de Araraquara. In: II Congresso de Iniciação Científica da UNIARA, 2007, Araraquara.  
**II Congresso de Iniciação Científica da UNIARA. , 2007.**

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. D'Avoglio, J. B. C., LEITE, C. A., BERLINCK, R. G. S., SPONCHIADO, Sandra Regina Pombeiro  
Biossorção de lântanio e neodímio por fungos isolados do litoral paulista In: III Simpósio de Engenharia Ambiental, 2006, São Carlos.  
**Anais do Simpósio de Engenharia Ambiental. , 2006.**

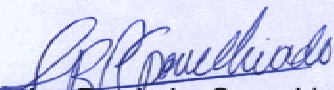
2. LEITE, C. A., GONCALVES, Rita de Cássia Ribeiro, SPONCHIADO, Sandra Regina Pombeiro  
Extração e quantificação da melanina produzida pelo fungo *Aspergillus nidulans*. In: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2006, Botucatu.  
**Anais do XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. , 2006.**

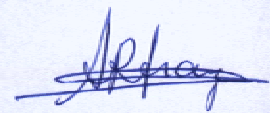
**CARLA ANDRÉA LEITE**

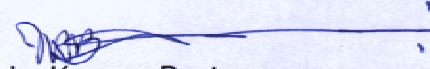
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 26 de fevereiro de 2010.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Profª Drª Sandra Regina Pombeiro Sponchiado (Orientadora)  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

  
Profª Drª Ângela Regina Araujo  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara

  
Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto

## **AGRADECIMENTOS**

*À Profa. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado, a quem eu devo todo o meu conhecimento científico; sempre serei grata por acreditar em mim e ter me dado a oportunidade de realizar o mestrado sob sua orientação. A ela os meus mais sinceros agradecimentos.*

*Ao Prof. Eduardo Mafudi Cilli pela co-orientação, principalmente nas análises de HPLC. Muito obrigada pela paciência e dedicação a este trabalho.*

*Ao Prof. Jorge Manuel Vieira Capela e à Profa. Marisa Veiga Capela pela grande ajuda no cálculo do IC<sub>50</sub> e nas análises estatísticas.*

*À Fátima Camacho pela amizade e auxílio no desenvolvimento experimental.*

*Às meninas do laboratório, Marina, Carol, Jú, Taís, Tati e Raquel, pela nossa amizade e as inúmeras horas divertidas que passei ao lado de vocês, tanto no laboratório como em congressos.*

*Ao Esteban e Lentilha por me auxiliarem no uso do HPLC.*

*Aos técnicos de laboratório sempre dispostos a ajudar Val, Zilda, Maria e Tarcísio.*

*À minha família, em especial à minha mãe por acreditar e me apoiar, pelo companheirismo, amizade, e os conselhos sábios, mas principalmente, por nunca desistir de mim. Muito obrigada por tudo que fez e tem feito para melhorar a minha vida.*

*Ao André Pastrelo Cavallieri por estar sempre ao meu lado, inclusive nos momentos mais difíceis de minha vida.*

*A todos os amigos que fiz durante o mestrado, espero que nossa amizade se perpetue.*

*À CAPES pela bolsa concedida.*

O conhecimento é o nosso processo de  
acumular dados; a sabedoria reside na  
sua simplificação.  
(Martin H. Fischer)

## RESUMO

Vários estudos indicam que os antioxidantes podem prevenir e/ou atenuar o dano oxidativo causado pelos radicais livres, os quais em excesso estão associados com várias doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson. Nos últimos anos houve um aumento na descoberta de antioxidantes naturais devido à possibilidade de produção em larga escala a um custo menor que a síntese química. Devido ao seu enorme potencial de exploração, os fungos derivados do ambiente marinho são considerados um dos mais importantes recursos para a obtenção de novos agentes terapêuticos, pois um grande número de metabólitos estruturalmente novos e biologicamente ativos tem sido relatado destes organismos. Estudos também mostraram que a quantidade e a diversidade dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos podem variar de acordo com o método de extração aplicado e as condições de cultivo. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi identificar taxonomicamente algumas espécies de fungos isolados das praias do Cabelo Gordo de Fora (São Sebastião/SP) e Balneário (Peruíbe/SP) e avaliar a influência do solvente, tempo de extração, temperatura de evaporação dos solventes, o meio de cultura (Meio Completo Marinho e Meio Sabouraud) e a fase de crescimento do fungo (exponencial e estacionária) para obtenção de compostos com atividade antioxidante e também analisar cromatograficamente os extratos obtidos. Os fungos estudados foram identificados como: *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium*, *Exophiala* sp; *Madurella grisea*, *Penicillium* sp, *Rhizopus oryzae*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton terrestre*. Utilizando análise estatística, os resultados obtidos mostraram que a atividade antioxidante foi significativamente influenciada pelos parâmetros estudados. Em todos os extratos, independente da espécie do fungo, a atividade antioxidante aumentou com o tempo de extração prolongado e diminuiu quando o solvente foi evaporado a 55°C em rotaevaporador. A produção de compostos antioxidantes para cada fungo variou em resposta as diferentes condições de cultivo. Todos os extratos fúngicos, exceto *Exophiala*, mostraram maior atividade antioxidante quando cultivados em Meio Sabouraud. Por outro lado, a cinética de crescimento mostrou que a biomassa dos fungos obtida em Meio Completo Marinho foi duas vezes maior daquela obtida em Meio Sabouraud, exceto para o fungo *Exophiala*, no qual a maior produção de biomassa ocorreu em Meio Sabouraud. Esses resultados sugerem que existe uma correlação inversa entre crescimento e produção de metabólitos antioxidantes. Também foi observado que a atividade antioxidante variou entre os extratos obtidos do meio de cultura (AcOEt e BuOH) e do micélio (MeOH). Para os fungos *T. terrestre*, *Penicillium*, *Exophiala* e *T. tonsurans*, os extratos AcOEt e BuOH apresentaram maior atividade antioxidante, enquanto que para os fungos *A. niger* e *A. versicolor* foi o extrato MeOH. Esse estudo também mostrou que a produção de compostos antioxidantes não parece estar associada com a fase de crescimento (trofofase), uma vez que a maior atividade antioxidante foi obtida durante a fase estacionária para os fungos *A. versicolor*, *T. terrestre* e *T. tonsurans* e durante a fase exponencial para os fungos *Penicillium*, *Exophiala* e *A. niger*. A análise de CLAE confirmou que há diferenças no perfil cromatográfico dos extratos em função dos parâmetros estudados. Comparando os valores de IC<sub>50</sub> da atividade antioxidante dos extratos fúngicos estudados, observamos que os menores valores foram obtidos pelos fungos *Trichophyton terrestre*, *Aspergillus versicolor* e *Penicillium* sp, respectivamente 0,6mg/mL, 0,9mg/mL e 0,6mg/mL. Como esses valores são similares àquele do Trolox (IC<sub>50</sub> = 0.25 mg/mL), esses fungos podem ser considerados fontes promissoras para a obtenção de compostos antioxidantes que podem ser usados para o tratamento e/ou prevenção do envelhecimento cutâneo.

**Palavras-chave:** Antioxidante. Extratos. Fungos Marinhos. Metabólitos Secundários. Radicais Livres.

## ABSTRACT

Various studies indicate that the antioxidants can prevent and/or attenuate the oxidative damage caused by free radicals, which in excess are associated with various neurodegenerative disorders like Alzheimer's and Parkinson's disease. In recent years, there had a growing interest in the discovery of natural antioxidants due to the possibility of large-scale production at a lower cost than chemical synthesis. Marine-derived fungi, due to its enormous potential for exploration, have been considered one of the most important resources to obtain of new therapeutic agents because a large number of structurally novel and biologically active metabolites have been reported from these organisms. Studies also have shown that the quantity and diversity of secondary metabolites produced by fungi can vary depending on the applied extraction method and the cultivation conditions. In the context, the objectives of this study were to identify taxonomically some fungi isolated from two locations: Cabelo Gordo de Fora beach (São Sebastião -SP) and Balneário beach, (Peruíbe – SP) and to evaluate the influence of solvent, extraction time, evaporation temperature of the solvents, the culture media (Marine Complete Medium and Sabouraud Medium) and stage of fungal growth (exponential and stationary phases) for obtaining compounds with antioxidant activity and also to analyze chromatographically the extracts obtained. The fungi studied were identified as: *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium*, *Exophiala* sp; *Madurella grisea*, *Penicillium* sp, *Rhizopus oryzae*, *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton terrestre*. Using statistical analysis, the results obtained showed that the antioxidant activity was significantly influenced by parameters studied. In all extracts, independent of the fungal species, the antioxidant activity increased with the longer time of extraction and decreases when the solvents were evaporated at 55 °C in rotaevaporator. The production of antioxidant compounds varied for each fungus in response to the different culture conditions. All fungal extracts, except *Exophiala*, exhibited greater antioxidant activity when the culture was grown in Sabouraud medium. In the other hand, the kinetics of growth showed that a fungal biomass obtained in Marine Complete Medium was two times greater than in Sabouraud Medium, except for the *Exophiala* fungus, which the greatest biomass production occurred in Sabouraud medium. These results suggest the existence of an inverse correlation between growth and production of antioxidant metabolites. Also was observed that the antioxidant activity varied between the extracts obtained from the culture medium (AcOEt, BuOH) and mycelium (MeOH). For *T. terrestre*, *Penicillium*, *Exophiala* and *T. tonsurans* fungi, the AcOEt and BuOH extracts exhibited the highest antioxidant activity, while the *A. niger* and *A. versicolor* fungi was the MeOH extract. This study also showed that the production of antioxidant compounds does not appear to be associated with growth phase (trophophase), since the highest antioxidant activity was obtained during the stationary phase for *A. versicolor*, *T.terrestre* and *T.tonsurans* and in the final exponential phase for *Penicillium*, *Exophiala* and *A. niger*. The HPLC analysis confirmed that there are differences in the chromatographic profile of the extracts in function of the parameters studied. Comparing the IC<sub>50</sub> values for antioxidant activity of the fungal extracts studied, observed that the lowest values were obtained for the *Trichophyton terrestre* *Aspergillus versicolor*, *Penicillium* sp, respectively 0.6 mg / mL, 0.9 mg/ mL, and 0.6 mg / mL. As these values are very similar to those of Trolox (IC<sub>50</sub> = 0.25 mg/mL), these fungi can be considered promising sources to obtain the antioxidant compounds that could be used for treatment and/or prevention cutaneous aging.

**Keywords:** Antioxidant. Extract. Marine fungi. Secondary Metabolites. Free-Radicals.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura parcial de melaninas mostrando grupos semiquinonas responsáveis pelos sinais na análise por EPR [retirado de RILEY (1997)]. 23
- Figura 2: Polaridade e o momento de dipolo dos solventes (AcOEt, BuOH e MeOH) utilizados no processo de extração dos compostos com atividade antioxidante, em função da constante dielétrica. Fonte: Solomons, 1996. 29
- Figura 3: Estabilização do radical ABTS•+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Fonte (HUANG et al, 2005). 35
- Figura 4: Análise de CLAE do extrato obtido do Meio Completo Marinho 38
- Figura 5: Análise de CLAE dos extratos AcOEt obtidos após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud por 12 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (vermelho) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul). 55
- Figura 6: Análise de CLAE dos extratos AcOEt obtidos após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud por 16 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (vermelho) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul). 55
- Figura 7: Análise de CLAE dos extratos BuOH obtidos após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud por 12 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (vermelho). 57
- Figura 8: Análise de CLAE dos extratos BuOH obtidos após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud por 16 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (vermelho). 57
- Figura 9: Análise de CLAE dos extratos MeOH obtidos após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud por 12 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (vermelho) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul). 59
- Figura 10: Análise de CLAE dos extratos MeOH obtidos após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud por 16 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (vermelho) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul). 59
- Figura 11: Análise de CLAE dos extratos AcOEt (preto), BuOH (vermelho) e MeOH (azul) obtidos do fungo *T.terrestre* cultivado em Meio Sabouraud por 12 dias (A) e 16 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 3 dias (C) e 5 dias (D). 63

- Figura 12: Análise de CLAE dos extratos AcOEt obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 7 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(vermelho); metodologia 2-Rotaev/EP (preto) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul). 70
- Figura 13: Análise de CLAE dos extratos AcOEt obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 10 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (vermelho) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul). 71
- Figura 14: Análise de CLAE dos extratos BuOH obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 7 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (vermelho). 73
- Figura 15: Análise de CLAE dos extratos BuOH obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 10 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (vermelho). 73
- Figura 16: Análise de CLAE dos extratos MeOH obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 7 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (vermelho). 75
- Figura 17: Análise de CLAE dos extratos MeOH obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 10 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(vermelho); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (preto). 76
- Figura 18: Análise de CLAE dos extratos AcOEt (preto), BuOH (vermelho) e MeOH (azul) obtidos do fungo *A. niger* cultivado em Meio Sabouraud por 7 dias (A) e 10 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 3 dias (C) e 5 dias (D). 79
- Figura 19: Análise de CLAE dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *A. versicolor* cultivado em Meio Sabouraud por 12 dias (A) e 20 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 3 dias (C) e 5 dias (D). 83
- Figura 20: Análise de CLAE dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *Penicillium* sp cultivado em Meio Sabouraud por 10 dias (A) e 16 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 3 dias (C) e 5 dias (D). 87
- Figura 21: Análise de CLAE dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *Exophiala* sp cultivado em Meio Sabouraud por 10 dias (A) e 16 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 3 dias (C) e 5 dias (D). 91
- Figura 22: Análise de CLAE dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *T. tonsurans* cultivado em Meio Sabouraud por 2 dias (A) e 5 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 4 dias (C) e 7 dias (D). 96

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: As diversas espécies reativas do oxigênio	21
Tabela 2: Metodologias para determinar a capacidade antioxidante de uma substância.	33
Tabela 3: Taxonomia dos Fungos isolados do Litoral Paulista	40
Tabela 4: Quantificação dos extratos brutos, obtidos de acordo com a metodologia 1 <sup>(a)</sup> , provenientes do micélio, tratado com metanol (MeOH) e do meio de cultivo, tratados com acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), após crescimento dos fungos em 100 mL de Meio Sabouraud (MS) e Meio Completo Marinho (MCM) à temperatura ambiente sob agitação de 250 rpm.	45
Tabela 5: Quantificação dos extratos brutos, obtidos de acordo com a metodologia 2 <sup>(b)</sup> , provenientes do micélio, tratado com metanol (MeOH) e do meio de cultivo, tratado com acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), após crescimento dos fungos em 100 mL de Meio Sabouraud (MS) e Meio Completo Marinho (MCM) à temperatura ambiente sob agitação de 250 rpm.	46
Tabela 6: Quantificação dos extratos brutos, obtidos de acordo com a metodologia 3 <sup>(c)</sup> , provenientes do micélio, tratado com metanol (MeOH) e do meio de cultivo, tratado com acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), após crescimento dos fungos em 100 mL de Meio Sabouraud (MS) e Meio Completo Marinho (MCM) à temperatura ambiente sob agitação de 250 rpm.	46

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Porcentagem de inibição do radical ABTS<sup>·+</sup> em relação ao tempo de reação (minutos) após cultivo do fungo *T. terrestre* em Meio Sabouraud em fase exponencial e estacionária de crescimento: 12 e 16 dias, respectivamente 36
- Gráfico 2: Porcentagem de inibição do Radical ABTS pelo TROLOX 37
- Gráfico 3: Cinética de crescimento do fungo *Trichophyton terrestre* em Meio Sabouraud(MS) e Meio Completo Marinho(MCM) 48
- Gráfico 4: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> dos compostos antioxidantes obtidos por extração prolongada (EP) ou rápida (ER) após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud em fase exponencial de crescimento (12 dias). 49
- Gráfico 5: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> dos compostos antioxidantes obtidos por extração prolongada (EP) ou rápida (ER) após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud em fase exponencial de crescimento (16 dias). 50
- Gráfico 6: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação a temperatura de evaporação dos solventes rotaevaporador (rotaev.) ou capela (CAPELA) dos compostos antioxidantes do fungo *T.terrestre* cultivado em Meio Sabouraud em fase exponencial de crescimento (12 dias) 52
- Gráfico 7: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação a temperatura de evaporação dos solventes rotaevaporador ou capela (CAPELA) dos compostos antioxidantes do fungo *T.terrestre* cultivado em Meio Sabouraud em fase estacionária de crescimento (16 dias) 53
- Gráfico 8: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Trichophyton terrestre* por 12 e 16 dias em Meio Sabouraud 61
- Gráfico 9: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Trichophyton terrestre* por 3 e 5 dias em Meio Completo Marinho 62
- Gráfico 10: Cinética de Crescimento do fungo *Aspergillus niger* em Meio Sabourand (MS) e Meio Completo Marinho (MCM) 65
- Gráfico 11: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação ao tempo de extração prolongado (EP) e rápido (ER) dos compostos antioxidantes do fungo *A.niger* cultivado em Meio Sabouraud em fase exponencial de crescimento (7 dias) 66

- Gráfico 12: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação ao tempo de extração dos compostos antioxidantes obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus niger* por 10 dias em meio Sabouraud 67
- Gráfico 13: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação à temperatura de evaporação dos solventes obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus niger* por 7 dias em Meio Sabouraud. 68
- Gráfico 14: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação à temperatura de evaporação dos solventes dos compostos antioxidantes obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus niger* por 10 dias em meio Sabouraud 69
- Gráfico 15: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus niger* por 7 e 10 dias em Meio Sabouraud 78
- Gráfico 16: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus niger* por 3 e 5 dias em Meio Completo Marinho 78
- Gráfico 17: Cinética de Crescimento do fungo *Aspergillus versicolor* em Meio Sabouraud e Meio Completo Marinho 81
- Gráfico 18: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus versicolor* por 12 e 20 dias em Meio Sabouraud. 82
- Gráfico 19: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> pelos extratos obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus versicolor* por 3 e 5 dias em Meio Completo Marinho 82
- Gráfico 20: Cinética de Crescimento do fungo *Penicillium* sp em Meio Sabouraud e Meio Completo Marinho 85
- Gráfico 21: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Penicillium* sp por 10 e 16 dias em Meio Sabouraud 85
- Gráfico 22: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Penicillium* sp por 3 e 5 dias em Meio Completo Marinho 86
- Gráfico 23: Cinética de Crescimento do fungo *Exophiala* sp em Meio Sabouraud e Meio Completo Marinho 88
- Gráfico 24: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>·+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Exophiala* sp por 5 e 8 dias em Meio Sabouraud 89

- Gráfico 25: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Exophiala* sp por 3 e 5 dias em Meio Completo Marinho 89
- Gráfico 26: Cinética de Crescimento do fungo *Trichophyton tonsurans* em Meio Sabourand e Meio Completo Marinho 92
- Gráfico 27: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Trichophyton tonsurans* por 2 e 5 dias em Meio Sabouraud 93
- Gráfico 28: Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Trichophyton tonsurans* por 4 e 7 dias em Meio Completo Marinho 94

## LISTA DE ABREVIATURA

**ABTS:** 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)  
**ABTS<sup>•+</sup>:** Radical 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)  
**ACN:** Acetonitrila  
**AcOEt:** Acetato de Etila  
**AUFS:** Unidade de Absorbância da Escala Completa  
**BuOH:** n-butanol  
**CLAE:** Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência  
**Cu:** Cobre  
**DNA:** Ácido Desoxirribonucléico  
**DPPH:** diphenyl-1-picrylhydrazyl  
**EP:** Extração Prolongada  
**EPS:** Exopolissacarídeo  
**ER:** Extração Rápida  
**ERO:** Espécie Reativa do Oxigênio  
**ET:** Transferência de elétrons  
**FAC:** Fluxo de Ar Contínuo  
**Fe:** Ferro  
**FRAP:** Parâmetro antioxidante pela redução do íon férrico  
**H<sub>2</sub>O:** Água  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de Hidrogênio  
**HAT:** Transferência do átomo de hidrogênio  
**HO<sup>•</sup>:** Radical Hidroxil  
**IC<sub>50</sub>:** Concentração Inibitória de 50%  
**IOU:** Inibição do consumo de oxigênio  
**MCM:** Meio Completo Marinho  
**MeOH:** Metanol  
**MS:** Meio Sabouraud  
**NADP:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>:** Oxigênio Singleto  
**O<sub>2</sub>:** Oxigênio  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** Radical superóxido  
**ORAC:** Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio  
**RO<sup>•</sup>:** Radical Alcoxil  
**ROO<sup>•</sup>:** Radical Peroxil  
**TEAC:** Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox  
**TFA:** Ácido Trifluoroacético  
**TRAP:** Parâmetro antioxidante de captura total do radical  
**Trolox:** 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (derivado da vitamina E)  
**UV:** Ultra-violeta

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	20
<b>2. OBJETIVOS</b>	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
<b>3.1 Fungos utilizados</b>	27
<b>3.2 Cultivo dos Fungos</b>	27
<b>3.3 Identificação Taxonômica dos Fungos</b>	27
<b>3.4 Cultivo dos fungos</b>	28
<b>3.5 Obtenção dos Extratos Brutos</b>	28
3.5.1 Metodologia 1: Extração prolongada com evaporação dos solventes em capela (temperatura ambiente).	29
3.5.2 Metodologia 2: Tempo de extração prolongada com evaporação dos solventes em rotaevaporador (50-55°C).	31
3.5.3 Metodologia 3: Extração rápida com evaporação dos solventes em rotaevaporador (50-55°C)	32
<b>3.6 Determinação da Capacidade Antioxidante.</b>	33
<b>3.7 Análise de CLAE</b>	37
<b>3.8 Análise Estatística</b>	38
<b>3.9 Determinação do IC<sub>50</sub></b>	38
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	40
<b>4.1 Taxonomia dos Fungos Isolados das praias do Balneário em Peruíbe e Cabelo Gordo de Fora em São Sebastião.</b>	40
<b>4.2 Obtenção dos Extratos Brutos</b>	45
<b>4.3 Avaliação da Capacidade Antioxidante nos Extratos</b>	48
4.3.1 <i>Trichophyton terrestre</i>	48
4.3.1.1 Influência do Tempo de Extração na Capacidade Antioxidante dos Compostos Obtidos do Fungo <i>Trichophyton terrestre</i> .	48
4.3.1.2 Influência da Temperatura de Evaporação dos Solventes Orgânicos nos Compostos com Capacidade Antioxidante obtidos do fungo <i>Trichophyton terrestre</i> .	51
4.3.1.3 Perfil de CLAE dos extratos obtidos do fungo <i>T. terrestre</i>	54
4.3.1.4 Avaliação da capacidade antioxidante do fungo <i>T. terrestre</i> em diferentes condições de cultivo	60
4.3.1.5 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo <i>T. terrestre</i> no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.	63
4.3.2 <i>Aspergillus niger</i>	64
4.3.2.1 Influência do tempo de extração na capacidade antioxidante dos compostos obtidos do fungo <i>Aspergillus niger</i> .	64
4.3.2.2 Influência da Temperatura de Evaporação dos Solventes Orgânicos nos Compostos com Capacidade Antioxidante obtidos do fungo <i>Aspergillus niger</i> .	68
4.3.2.3 Perfil de CLAE dos extratos obtidos do fungo <i>Aspergillus niger</i>	70

4.3.2.4 Avaliação da capacidade antioxidante do fungo <i>A. niger</i> em diferentes condições de cultivo.	77
4.3.2.5 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo <i>A. niger</i> no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.	79
4.3.3 <i>Aspergillus versicolor</i>	81
4.3.3.1 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo <i>A. versicolor</i> no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.	83
4.3.4 <i>Penicillium</i> sp	84
4.3.4.1 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo <i>Penicillium</i> sp no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.	86
4.3.5 <i>Exophiala</i> sp	88
4.3.5.1 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo <i>Exophiala</i> sp no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.	90
4.3.6 <i>Trichophyton tonsurans</i>	92
4.3.6.1 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo <i>T. tonsurans</i> no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.	95
<b>5. DISCUSSÃO</b>	97
<b>6. CONCLUSÃO</b>	103
<b>REFERÊNCIAS</b>	105

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente várias pesquisas têm sido realizadas para esclarecer o papel dos radicais livres, visto que esses grupos de átomos contendo oxigênio, quando em excesso, estão associados à maioria das doenças freqüentes na velhice, como arteriosclerose, catarata, cânceres, hipertensão, Alzheimer e Parkinson. (FERREIRA; MATSUBARA et. al., 1997).

O termo radical livre é freqüentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula, contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Isto determina uma alta capacidade de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (BARREIROS et al., 2006).

Em nosso organismo, a formação de radicais livres ocorre em vários processos metabólicos gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, exercendo um papel importante no funcionamento do corpo humano (CONNER; GRISHAM, 1996). O metabolismo energético que engloba as reações de transferência de elétrons para a obtenção de energia constitui uma importante fonte de radicais livres. Estes radicais participam de uma imensa variedade de processos dentro dos organismos vivos, como fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e formação de substâncias com atividade antimicrobiana como ácido hipocloroso. Por outro lado, a produção excessiva dos radicais livres pode causar danos a biomoléculas importantes como lipídeos, proteínas e DNA, contribuindo para a patogenia de várias doenças (MELLO FILHO et al., 1983; CONNER; GRISHAM, 1996; AUGUSTO, 2006).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de  $H_2O$ . Durante esse processo são formadas as espécies reativas do oxigênio (ERO), como os Radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), Peroxil ( $ROO^{\cdot}$ ), Hidroxil ( $HO^{\cdot}$ ), Alcoxil ( $RO^{\cdot}$ ), Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e Oxigênio Singlete ( $^1O_2$ ) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Como mostrado na Tabela 1, estes radicais apresentam diferenças no potencial de reatividade e tempo de meia-vida.

**Tabela 1:** As diversas espécies reativas do oxigênio

Intermediário	Comentário	Meia-vida	Sítios de formação
Radical superóxido	Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 1 elétron.	Decomposição enzimática na velocidade aproximada de $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ em pH 7,0.	Reações de autooxidação envolvendo flavoproteínas e ciclos redox.
Peróxido de hidrogênio	Formado a partir da redução parcial do oxigênio molecular por 2 elétrons.	Decomposição enzimática.	Vias catalisadas por oxidases, e pela superóxido dismutase.
Radical hidroxil	Formado a partir da redução do oxigênio molecular, por 3 elétrons nas reações de Fenton e Haber-Weiss, catalisada por metais.	$10^{-9}$ segundos	Locais adjacentes à formação de ânion superóxido/peróxido de hidrogênio na presença de metais, principalmente ferro; produto de reação do óxido nítrico com o radical superóxido.
Radical alcóxil	Radical orgânico centrado no oxigênio.	$10^{-6}$ segundos	Intermediário na peroxidação de lipídios de membrana.
Radical peróxil	Formado a partir de hidroperóxidos orgânicos	7 segundos	Intermediário na peroxidação de lipídios de membrana.
Oxigênio molecular Simpleto. ( $^1\Delta_g \text{O}_2$ )	Primeiro estado excitado do Oxigênio Molecular com nível de energia de 22 kcal/mol acima do estado fundamental ou oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ).	$10^{-5}$ segundos	Sem sítios metabólicos definidos.

**Fonte:** Bergendi et al., (1999); Sies (1985); Halliwell (1986).

O radical superóxido é a primeira das espécies formadas pela redução do oxigênio por um único elétron e pode ser formado nas seguintes vias metabólicas: *Fosforilação oxidativa na mitocôndria, Via da xantina oxidase no citosol, Via da NADPH oxidase em células fagocíticas, Via da síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso e Sistema NADPH citocromo P-450 redutase microssomal* (RIBEIRO et al. 2005.). Apesar do ânion superóxido possuir a habilidade de ligar-se ao  $\text{Fe}^{2+}$  presente nas proteínas de armazenamento (como mioglobina) e nas ferro-sulfoproteínas (como ferritina e aconitase), a sua atuação como oxidante direto é irrelevante, pois pode dar origem a outras espécies reativas como o radical hidroxil e o oxigênio singleto (FRIDOVICH, 1982).

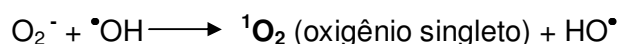
O peróxido de hidrogênio também é um radical livre pouco reativo, porém pode se difundir facilmente através das membranas celulares e reagir com os metais de transição presentes nas células ( $\text{Cu}^{1+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ ), dando origem ao radical hidroxil.

O radical hidroxil, que também pode ser formado a partir da homólise da água por exposição à radiação ionizante (HUSAIN et al., 1987), pode causar danos a

várias biomoléculas presentes na célula. No DNA, o radical hidroxil ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose, ocasionando a retirada de um dos átomos de hidrogênio, o que quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA. O ataque intensivo e freqüente deste radical pode originar mutações no DNA e, conseqüentemente, levar ao desenvolvimento de câncer em seres humanos no período de 15 a 20 anos (HALLIWELL et al., 1999; CHATGILIALOGLU et al., 2001; WISEMAN et al., 1995). Nas proteínas, o radical hidroxil pode reagir com a cadeia lateral dos aminoácidos, preferencialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, e, em menores proporções, arginina e asparagina. Os ataques aos aminoácidos podem gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos, o que pode ter como conseqüência perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares e citólise (BERGER et al., 1999). O radical hidroxil também pode agir sob os lipídios de membrana plasmática, celular e mitocondrial, acarretando alterações na estrutura e na permeabilidade em decorrência da peroxidação lipídica. Como conseqüência, ocorre perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído). (FERREIRA; MATSUBARA op. cit.).

A forma mais reativa da EROS é o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), cuja formação ocorre pela adição de mais um elétron ao radical superóxido  $\text{O}_2^-$  (VANNUCCHI et al, 1998).

O oxigênio singlete também pode ser formado pela reação do radical ânion  $\text{O}_2^-$  com o radical  $\text{HO}^\bullet$ , como mostrado na reação abaixo (NUNES et al., 2007).



Muitos estudos *in vitro* têm demonstrado que o oxigênio singlete também oxida várias biomoléculas incluindo as proteínas, principalmente os aminoácidos cisteína, metionina, triptofano, tirosina e histidina; ácidos nucleicos, em relação à base guanina, e os lipídios, pela reação com os ácidos graxos insaturados (JACOB, 1995).

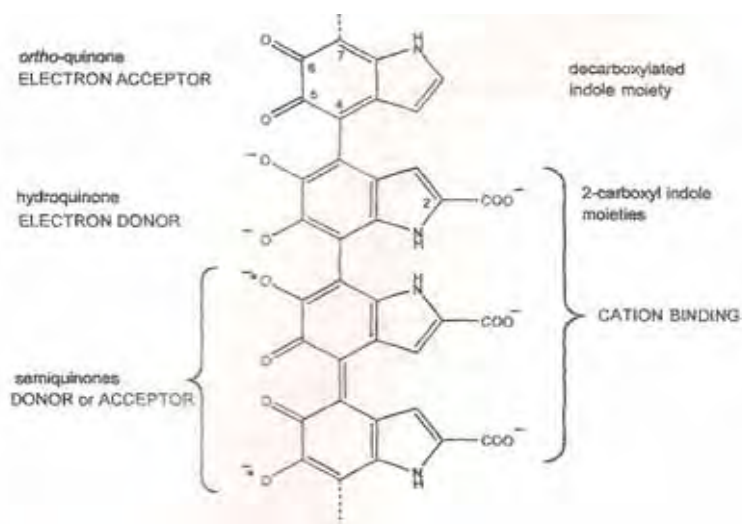
Os antioxidantes, produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta, podem prevenir os danos causados por estes radicais livres. De acordo com Halliwell, 1986 "Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração

comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo".

Desta forma, os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo a sua ação sobre os lipídeos, as proteínas, os ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (HALLIWELL, 1995)

Nos últimos anos, houve um aumento no interesse da descoberta de substâncias com atividades antioxidantes produzidas pelos microrganismos, incluindo os fungos, devido à possibilidade de produção da substância em larga escala a um custo menor que a síntese química.

Derivados fenólicos, como as melaninas, são considerados substâncias antioxidantes naturais, pois agem como doadores e aceptores de prótons e elétrons, sendo que as melaninas rapidamente interagem com radicais livres e outras espécies reativas devido à presença de elétrons não-pareados na molécula (RILEY, 1997; SHCHERBA et al., 2000).



**Figura 1:** Estrutura parcial de melaninas mostrando grupos semiquinonas responsáveis pelos sinais na análise por EPR [retirado de RILEY (1997)].

Gómez et al. (2001) observaram que células melanizadas de *Cryptococcus neoformans* são menos susceptíveis aos danos causados por luz UV, fagocitose mediada por macrófagos, peptídios com atividade antimicrobiana, toxicidade por

metais pesados e a drogas como a anfotericina B comparada às células não melanizadas. Em outros fungos, como *Aspergillus carbonarius*, *Paecilomyces variotii* e *Alternaria alternata*, também foi demonstrada a capacidade antioxidantes do pigmento melanina (SHCHERBA op. cit.).

Em nosso laboratório, estudos com o pigmento melanina extraído de uma linhagem altamente melanizada do fungo *Aspergillus nidulans* mostraram que este pigmento apresenta atividade antioxidante para o peróxido de hidrogênio e o ácido hipocloroso (GONÇALVES; POMBEIRO-SPONCHIADO, 2005).

Alguns fungos marinhos têm se destacado como produtores de metabólitos biologicamente ativos. A sansalvamida é um novo agente citotóxico isolado de um fungo marinho do gênero *Fusarium* que apresentou atividade citotóxica em células de câncer de cólon e de melanoma. Os exumolidios A e B são peptídeos cíclicos isolados do fungo marinho *Scytalidium* sp. que apresentaram atividade inibidora do crescimento da alga *Dunaliella* sp. Dois novos pandangolídios, obtidos do fungo *Cladosporium herbarum* isolado da esponja marinha *Callyspongia aerizusa*, apresentaram atividade antibiótica contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. A investigação química de três espécies de fungos marinhos *Ulocladium botrytis*, *Asteromyces cruciatus* e *Varicosporina ramulosa* levou ao isolamento do inibidor da proteína kinase e de um antifúngico 1-hidroxi-6-metil-8-(hidroximetil)xantona Kelecom, A.(2002).

Em relação à atividade antioxidante, poucos estudos foram realizados com fungos marinhos. ABDEL-LATEFF et al. (2002) verificaram que derivados de hidroquinona, produzida pelo fungo marinho *Acremonium* sp., possuem uma atividade antioxidante. Estes autores também observaram que o isobenzofurano, um derivado do metabolismo secundário do fungo marinho *Epicoccum* sp., inibi a peroxidação lipídica em 95% (ABDEL-LATEFF et al., 2003).

Sun et al. (2004), analisando a atividade antioxidante de um exopolissacarídeo (EPS2) produzido pelo fungo filamentosso marinho *Keissleriella* sp., mostraram que o EPS2 possui uma atividade antioxidante contra o radical superóxido e experimentos realizados em células de rato indicaram que este composto combate a formação do peróxido de hidrogênio, evitando a peroxidação lipídica (Sun et al., 2005)

Yang et al. (2005) constataram que um polissacarídeo (YCP), produzido pelo fungo marinho *Phoma herbarum*, não mostrou atividade antioxidante in vitro, no

entanto, os dois derivados químicos sulfatados (YCP-S1 e YCP-S2), inibiram a formação do radical hidroxil e do radical superóxido.

Portanto, esta revisão mostra que os fungos marinhos foram pouco estudados do ponto de vista químico e farmacológico em comparação aos fungos terrestres. No entanto, no ambiente marinho é freqüente a simbiose e/ou competição microbiana, o que resulta na seleção de microrganismos que produzem compostos químicos para defesa e competição (FENICAL, 1997). Em razão disso, alguns pesquisadores enfatizam a importância de pesquisas em micologia marinha como uma fonte para a descoberta de produtos naturais biologicamente ativos. (BLUNT, 1979; WOODRUFF, 1980; FENICAL, 1997; HOLLER et al., 2000; FAULKNER, 2002; KELECOM, 2002).

A microbiologia marinha é atualmente considerada uma área de conhecimento estratégica, haja visto a enorme biodiversidade dos oceanos que cobrem cerca de 70% da superfície terrestre. No Brasil, levando-se em conta a grande extensão da zona costeira brasileira, o número de fungos marinhos brasileiros reportados corresponde apenas 25% do número total do continente americano (BOOTH, 1979).

Neste contexto, o estudo do potencial antioxidante de compostos produzidos por fungos marinhos possui uma grande interesse biotecnológico na descoberta de novos agentes terapêuticos visando o tratamento de doenças causadas por agentes oxidantes como câncer, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, aterosclerose, doenças auto-imunes, além do envelhecimento celular.

## **2. OBJETIVOS:**

Os objetivos deste trabalho foram:

- a)** Identificar taxonomicamente as espécies de fungos coletadas nas praias do Balneário em Peruíbe-SP e de Cabelo Gordo de Fora em São Sebastião-SP.
- b)** Analisar o crescimento dos fungos em cultura líquida agitada sob diferentes meios de cultura e fase de crescimento (exponencial e estacionária).
- c)** Avaliar o extrato bruto dos fungos cultivados em diferentes condições quanto à atividade antioxidante pelo método ABTS<sup>+</sup>.
- d)** Avaliar a influência do tempo de extração (prolongado e rápido) e a influência da temperatura de evaporação dos solventes quanto à atividade antioxidante.
- e)** Analisar cromatograficamente os extratos brutos dos fungos obtidos em diferentes condições de cultivo e de extração.

Com este estudo pretende-se conhecer a diversidade de fungos marinhos brasileiros e também descobrir microrganismos totalmente novos, potencialmente exploráveis em processos biotecnológicos, como fonte de produtos de interesse econômico e social.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS:**

#### **3.1 Fungos utilizados**

Os fungos estudados foram coletados na praia do Balneário em Peruíbe – SP e na praia de Cabelo Gordo de Fora em São Sebastião(SP), a partir de vários microambientes: algas, invertebrados e de sedimentos marinhos (De Vita, 2003). Após isolamento em Meio Completo Marinho, as amostras puras dos fungos foram armazenadas em sílica e estocados a 4°C no Laboratório de Fungos Filamentosos do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química do Instituto de Química de Araraquara, tendo como responsável a Profa. Dra. Sandra Regina Pombeiro Sponchiado.

#### **3.2 Cultivo dos Fungos**

Com a finalidade de verificar os fungos que são estritamente marinhos, o cultivo destes organismos foi realizado em duas condições nutricionais:

- a) Meio Sabourand (MS) com a seguinte composição: dextrose (4%), peptona (1%), ágar (1,5%) e água destilada.
- b) Meio Completo Marinho (MCM) contendo: glicose (2%), amido (1%), peptona (0,5%), extrato de levedura (0,5%), soytone (2%), extrato de carne (0,3%), solução de sais marinha (10mL), ágar (1,5%) e água destilada.

Os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo 20mL do meio de cultura e incubados por um período de 7-10 dias à temperatura ambiente (25°C), visando à identificação taxonômica. Os fungos que apresentarem crescimento somente em MCM serão classificados como fungos marinhos obrigatórios, enquanto os demais foram denominados como espécies capelaultativas.

#### **3.3 Identificação Taxonômica dos Fungos**

Após crescimento em Meio Sabourand, os fungos foram identificados de acordo com suas características macroscópicas e microscópicas.

A análise macroscópica das culturas foi baseada nas seguintes características:

- Velocidade de crescimento: lento (acima de 10 dias), moderado (entre 7-10 dias) ou rápido (entre 3-4 dias).
- Morfologia da colônia: lisa, rugosa ou com hifas aéreas;
- Esporulação da colônia: pulverulento ou rala;
- Cor da colônia.

O exame microscópico dos fungos foi obtido através do Exame Direto à fresco. Por esta técnica, uma pequena quantidade de material é coletada, com auxílio de uma alça de platina, do centro da colônia e emulsionado em uma gota de água destilada colocado sobre uma lâmina. Em seguida, a suspensão foi coberta com uma lamínula e observada a um microscópio óptico em relação às seguintes características:

- Aspecto da hifa: septada ou cenocítica;
- Forma dos esporos: ovalados ou esféricos;
- Presença de estrutura de reprodução: conidióforo ou esporangióforo.

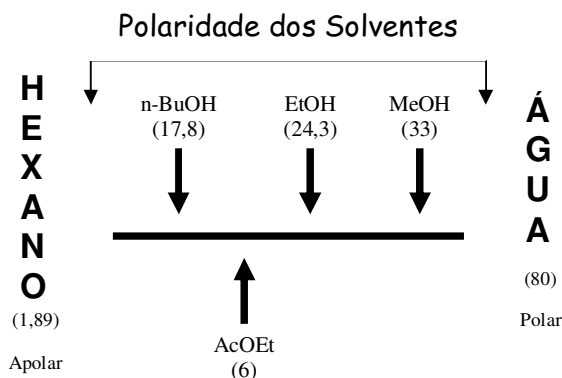
### **3.4 Cultivo dos fungos**

Os fungos foram cultivados em frascos de 250mL contendo 100mL de Meio Sabourand ou Meio Completo Marinho e  $10^5$  conídios/mL, sob agitação de 250 rpm, à temperatura ambiente (25°C a 28°C), por diferentes tempos de incubação, a fim de identificar a fase exponencial e estacionária de crescimento das espécies.

A cultura dos fungos, obtidas após cultivo em Meio Sabourand e Meio Completo Marinho em períodos pré-estabelecidos, foram filtradas com o auxílio de bomba à vácuo, para separação do meio de cultura e da massa micelial.

### **3.5 Obtenção dos Extratos Brutos**

O tipo de solvente utilizado para a obtenção do extrato determina o seu potencial antioxidante, visto que a extração de compostos bioativos depende da polaridade dos solventes. Neste trabalho foram usados três solventes orgânicos (AcOEt, BuOH e MeOH) que apresentam diferentes polaridades, como mostra a figura 2 .



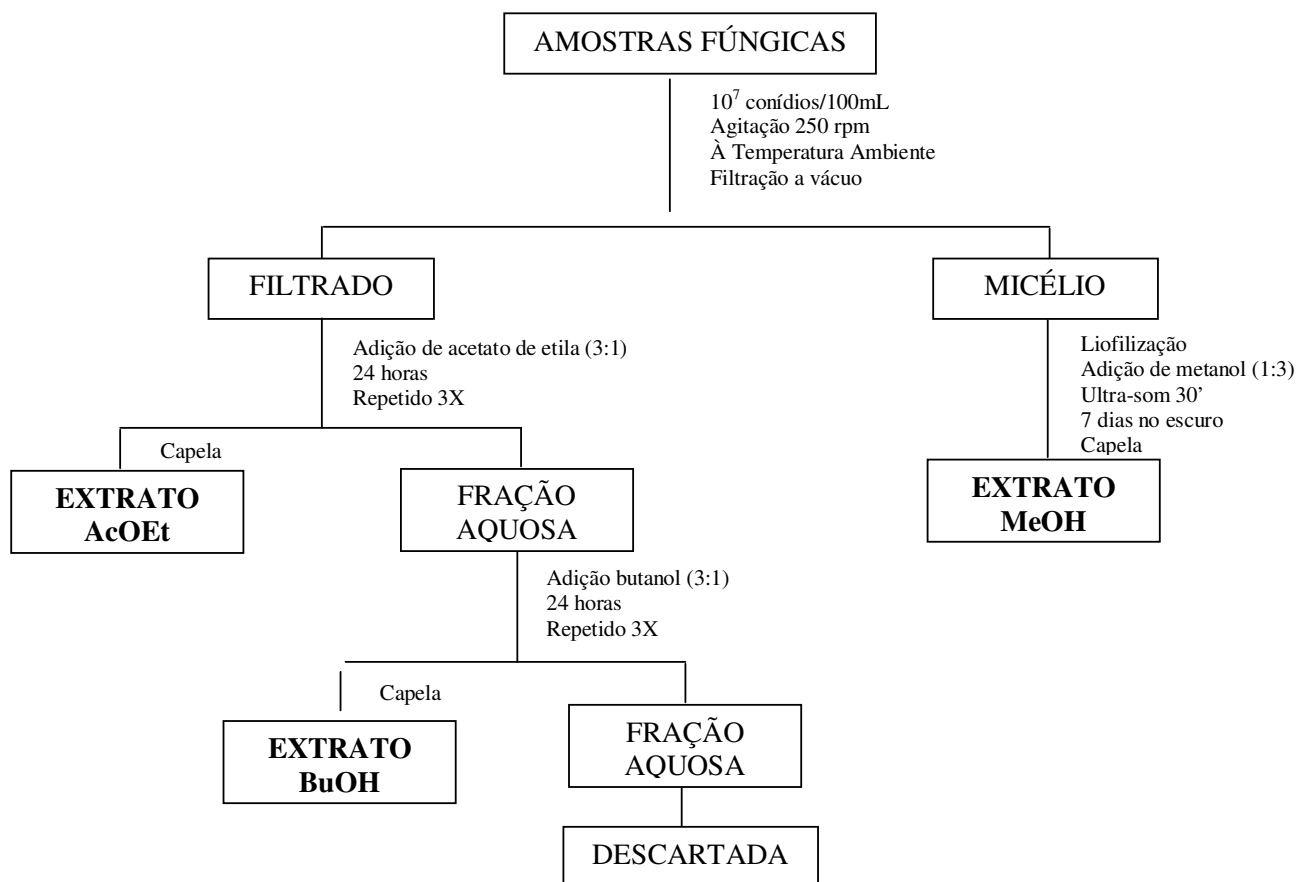
**Figura 2:** Polaridade e o momento de dipolo dos solventes (AcOEt, BuOH e MeOH) utilizados no processo de extração dos compostos com atividade antioxidante, em função da constante dielétrica. Fonte: Corrêa e Zuin, 2009.

Além da avaliação de diferentes solventes na obtenção de compostos com atividade antioxidante, foram analisados o tempo de extração (prolongado e rápido) e a temperatura de evaporação dos solventes em fluxo de ar contínuo e rotaevaporador, temperatura ambiente e 50-55°C, respectivamente.

### 3.5.1 Metodologia 1: Extração prolongada com evaporação dos solventes em capela (temperatura ambiente).

O meio de cultura filtrado foi submetido à partição líquido-líquido em acetato de etila (1:3), 1 mL de acetato de etila para cada 3 mL de meio, e deixados durante 24hs. Este processo foi repetido três vezes. Em seqüência, a fração aquosa obtida foi submetida ao mesmo procedimento usando o solvente butanol (na proporção de 1:3). Os extratos AcOEt e BuOH foram evaporados sob capela, à temperatura ambiente, por aproximadamente 7 dias.

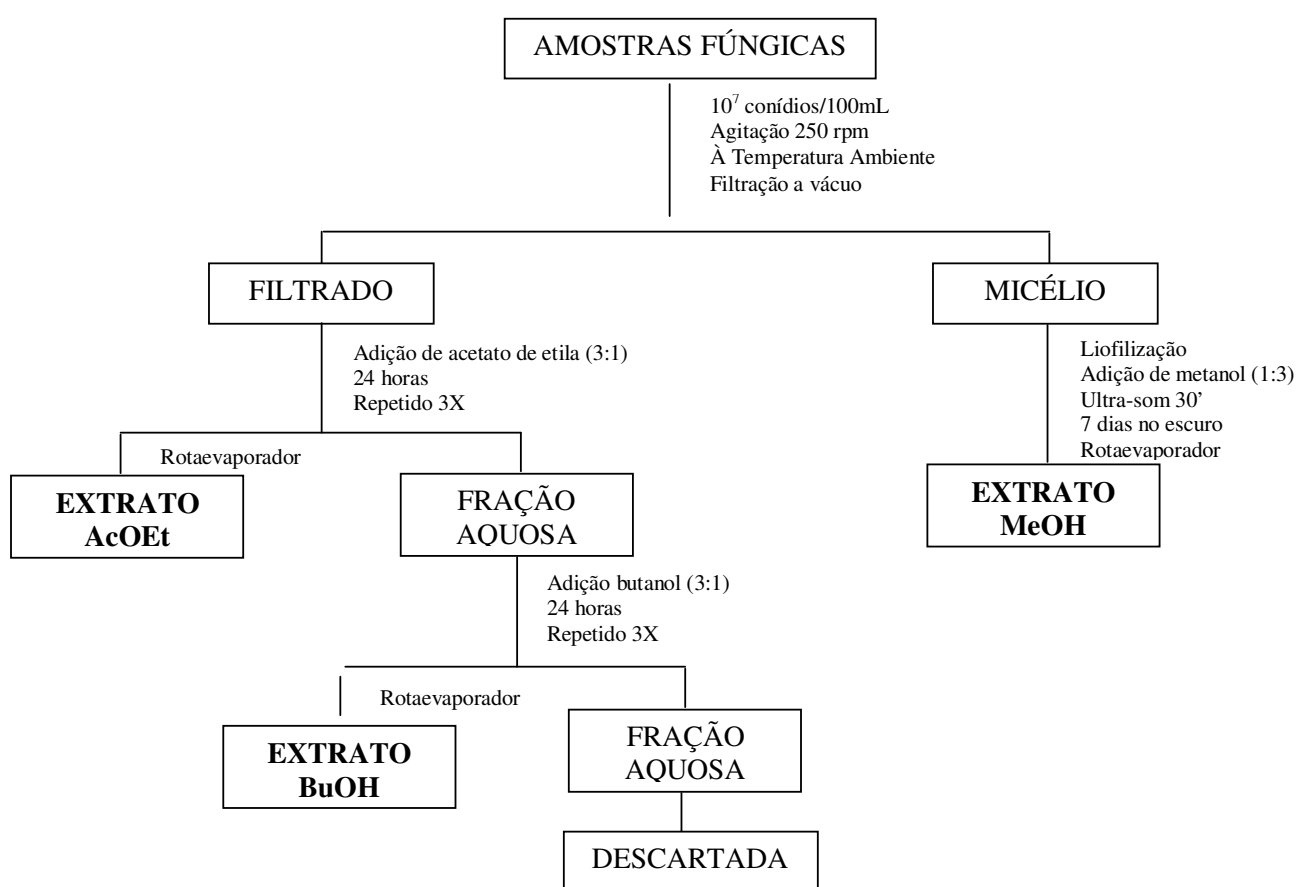
Em relação à massa micelial, após maceração em cadinho, o pó obtido foi submetido a extração usando metanol, na proporção de (3:1) 3 mL de metanol para cada 1mg de massa micelial. Após 30 minutos em equipamento de ultra-som, o material resultante foi mantido por 7 dias no escuro e posteriormente centrifugado. Este processo foi repetido por três vezes (Elias et al., 2005).



**Fluxograma 1:** Obtenção dos extratos orgânicos AcOEt, BuOH e MeOH pela metodologia 1.

### 3.5.2 Metodologia 2: Tempo de extração prolongada com evaporação dos solventes em rotaevaporador (50-55°C).

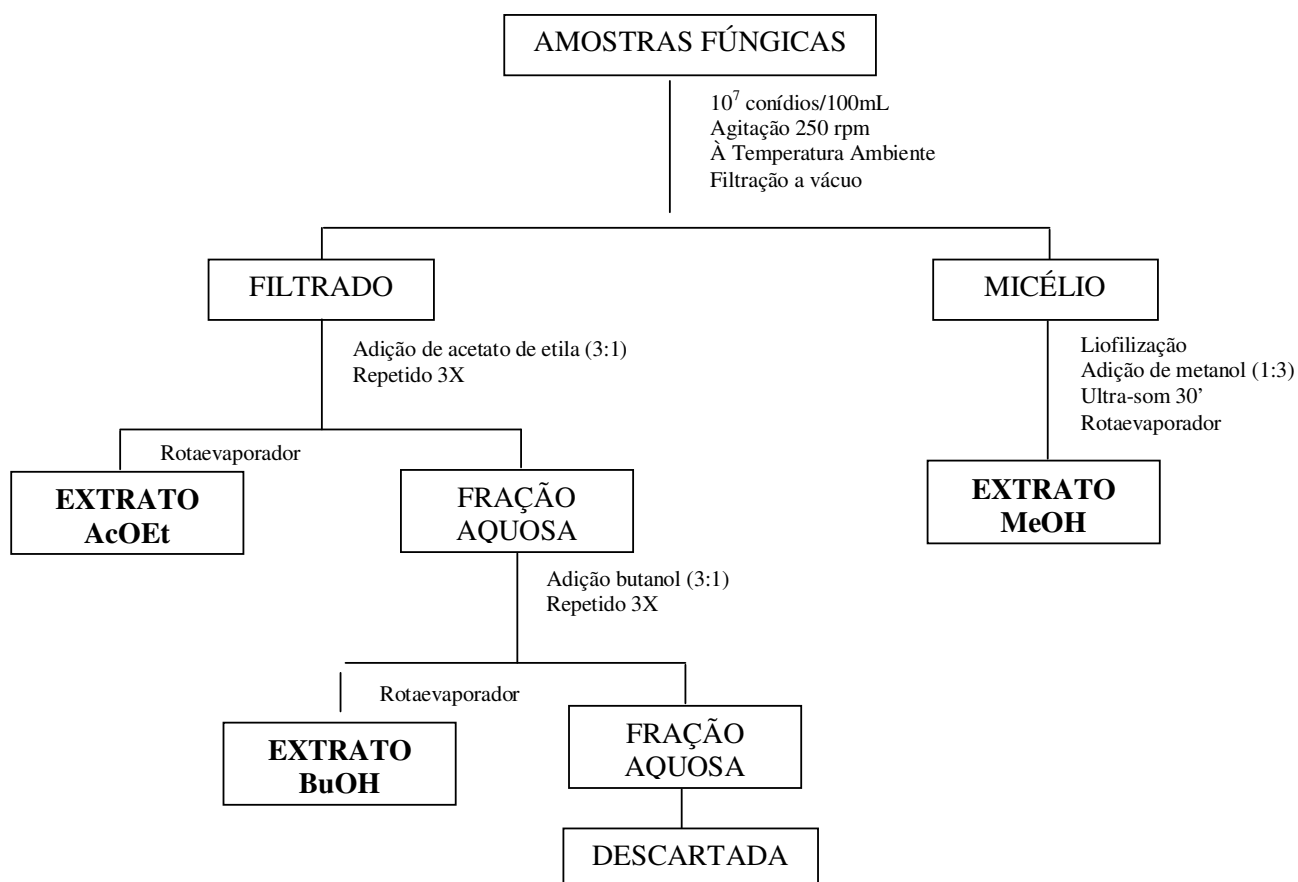
Nesta extração, foi empregada a mesma metodologia descrita acima, contudo, os extratos AcOEt, BuOH e MeOH foram evaporados usando um rotaevaporador, com temperatura que variou de 50-55°C.



**Fluxograma 2:** Obtenção dos extratos orgânicos AcOEt, BuOH e MeOH pela metodologia 2.

### 3.5.3 Metodologia 3: Extração rápida com evaporação dos solventes em rotaevaporador (50-55°C)

Neste caso também foi empregada a mesma metodologia de extração descrita no item 3.5.2, alterando-se o tempo de extração, pois a separação das duas fases ocorreu logo após a adição do solvente.



**Fluxograma 3:** Obtenção dos extratos orgânicos AcOEt, BuOH e MeOH pela metodologia 3.

### 3.6 Determinação da Capacidade Antioxidante.

Na literatura estão descritos vários métodos para determinar a capacidade antioxidante de uma substância, como mostrado na Tabela 2, sendo que tais ensaios podem ser classificados em duas categorias: Transferência do átomo de hidrogênio (HAT) e transferência de elétrons (ET) (HUANG et al, 2005).

**Tabela 2:** Metodologias para determinar a capacidade antioxidante de uma substância.

<b>Ensaio da Capacidade Antioxidante in Vitro</b>	
Ensaio envolvendo reações de transferência do átomo de hidrogênio: $ROO + AH \longrightarrow ROOH + A$  $ROO + LH \longrightarrow ROOH + L$	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ ORAC (Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio);</li> <li>▪ TRAP (Parâmetro antioxidante de captura total do radical);</li> <li>▪ Ensaio de branqueamento da crocina;</li> <li>▪ IOU (Inibição do consumo de oxigênio);</li> <li>▪ Inibição da oxidação do ácido linoléico, e</li> <li>▪ Inibição da oxidação da LDL</li> </ul>
Ensaio pela reação de transferência de elétrons: $M(n) + e \text{ (do AH)} \longrightarrow AH^+ + M(n-1)$	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ TEAC (Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox);</li> <li>▪ FRAP (Parâmetro antioxidante pela redução do íon férrico);</li> <li>▪ DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl);</li> <li>▪ Capacidade de redução do Cobre (II), e</li> <li>▪ Ensaio de fenol total pelo reagente Folin-Ciocalteu.</li> </ul>
Outros Ensaios	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Quimioluminescência e,</li> <li>▪ Eletroquimioluminescência</li> </ul>

**Fonte:** HUANG et al, 2005 (Traduzido)

Entre as duas categorias, a metodologia de transferência de elétrons é a mais utilizada e está baseada na seguinte reação:

(Oxidante) + e (do antioxidante)  $\longrightarrow$  redução do oxidante + antioxidante oxidado.

O oxidante ao ser reduzido pelo antioxidante sofre mudanças colorimétricas e a intensidade da mudança de cor é proporcional à atividade deste antioxidante ou a concentração do mesmo. A reação atinge o seu ponto final quando a mudança colorimétrica cessa (BENZIE, et. al, 1999).

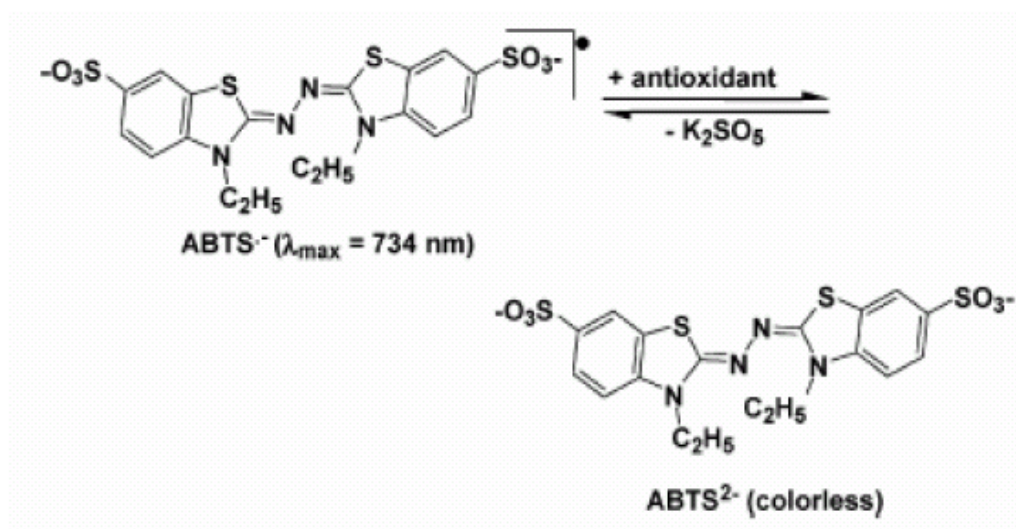
Os dados obtidos por esses ensaios podem fornecer informações quantitativas da capacidade da amostra de inibir processos oxidativos em sistemas biológicos (TOMEI & SALVADOR, 2007).

Os métodos mais aplicados que utilizam como base à transferência de elétrons são ABTS<sup>•+</sup> 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) e DPPH (radical 1,1- difenil-2-picrilhidrazila). Ambos apresentam uma excelente estabilidade, mas também mostram diferenças. O DPPH é um radical livre obtido diretamente, ou seja, sem uma preparação prévia, enquanto que o ABTS<sup>•+</sup> tem que ser gerado por uma reação química (dióxido de magnésio ou persulfato de potássio), enzimática (peroxidase) ou eletroquímica. (KUSKOSKI, et al., 2005). Com o ABTS<sup>•+</sup> pode-se determinar a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, o que lhe confere vantagem em relação ao DPPH, que só pode ser dissolvido em meio orgânico (KUSKOSKI, et al., 2005).

Outra vantagem é quanto ao tempo necessário para a realização das leituras, o método DPPH é mais demorado que o método ABTS<sup>•+</sup>; e também apresenta um custo maior que o ABTS<sup>•+</sup>, sendo que ambos os métodos permitem alcançar conclusões praticamente similares (ARNAO, 2000).

Neste sentido, o método escolhido para determinar a atividade antioxidante dos extratos fúngicos obtidos neste trabalho foi do Radical ABTS<sup>•+</sup>.

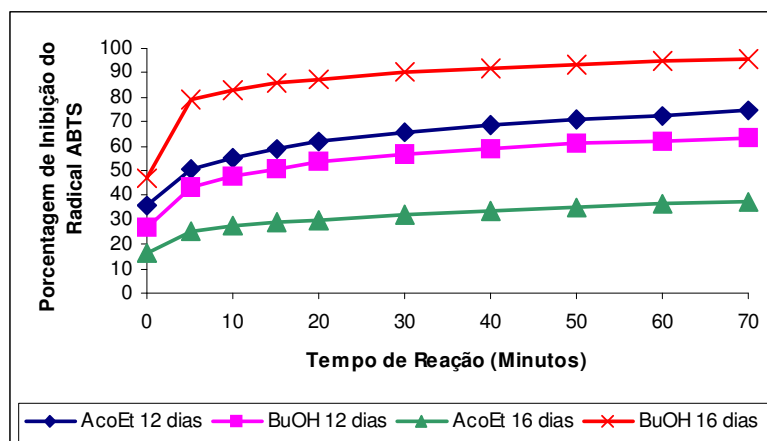
Seguindo a metodologia desenvolvida por Re et al.,1999 e descrito por KUSKOSKI et al., 2005, o radical ABTS<sup>•+</sup> é obtido após a reação de ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic) (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM de concentração final) na proporção de 1:0,5 e incubado à temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) no escuro por 16h. Uma vez formado o radical ABTS<sup>•+</sup> este é diluído com etanol para obter um valor de absorbância entre 0,70 ( $\pm 0,05$ ) em 734 nm (comprimento de onda de absorção máxima).



**Figura 3:** Estabilização do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Fonte (HUANG et al, 2005).

Embora este método utilize o tempo de reação de 6 minutos, outros autores, como Boussaada, et al., 2008; Thaipong et al., 2006; Ivekovic, et al., 2005 e Arnao, 2000, utilizam tempos de reação variados como 20, 120, 1 e 5 minutos, respectivamente, de acordo com o extrato analisado. Por este motivo com o objetivo de definir o tempo de reação necessário para a inibição máxima do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  foi realizado o ensaio para atividade antioxidante durante o tempo de 70 minutos, usando os extratos AcOEt e BuOH (na concentração de 1,25mg/mL), obtido após cultivo do fungo *T. terrestre* em meio Sabouraud por 12 e 16 dias, o extrato foi obtido por extração prolongada e evaporação dos solventes em capela (Gráfico 1).

Pelos resultados mostrados no Gráfico 1, podemos observar que a inibição do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , parece atingir um máximo em torno de 30 e 60 min, respectivamente, para todos os extratos. Neste sentido, estabelecemos o tempo de reação de 60min para os próximos ensaios.



**Gráfico 1:** Porcentagem de inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  em relação ao tempo de reação (minutos) após cultivo do fungo *T. terrestre* em Meio Sabouraud em fase exponencial e estacionária de crescimento: 12 e 16 dias, respectivamente.

Também foram realizados ensaios para determinar as concentrações de extrato a serem utilizados para avaliar a capacidade antioxidante. Os resultados mostraram que para o fungo *Trichophyton terrestre* cultivado em Meio Sabouraud, nas concentrações acima de 5mg/mL houve 100% de inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$ . Em função destes resultados, as concentrações usadas nos próximos experimentos foram de 5,0mg/mL, 2,5mg/mL, 1,25mg/mL e 0,625mg/mL para todos os fungos estudados, independentemente das condições de cultivo.

As diferentes concentrações do extrato foram preparadas por diluição em série do extrato bruto fúngico solubilizado em etanol. Em ambiente escuro, foi transferido uma alíquota de 30  $\mu$ L de cada diluição do extrato para 3,0 mL da solução do radical  $ABTS^{\cdot+}$  e homogeneizado em agitador de tubos. A leitura foi realizada a 734nm após 60 minutos de reação. O álcool etílico foi utilizado como branco para calibrar o espectrofotômetro. Todos os ensaios foram realizados em triplicata

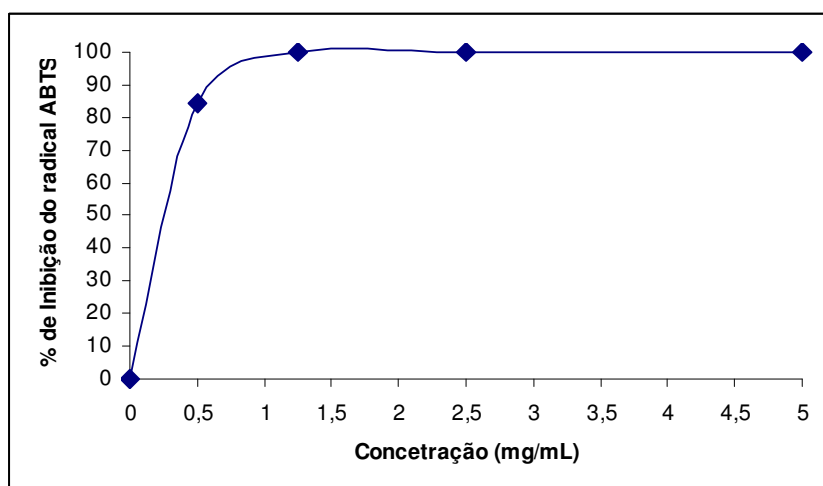
Nos ensaios avaliou-se a ação antioxidante pelo decréscimo da absorbância e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$ , de acordo com a equação 1.

**Equação 1:** 
$$\text{INIBIÇÃO (\%)} = \left[ \frac{(A_{\text{branco}} - A_{\text{amostra}})}{(A_{\text{branco}})} \right] \times 100$$

Onde:  $A_{\text{branco}}$  é a absorvância com 30 $\mu$ L Etanol + 3mL do radical ABTS<sup>•+</sup>

$A_{\text{amostra}}$  é a absorvância com 30 $\mu$ L da Amostra + 3mL do radical ABTS<sup>•+</sup>

Para determinar a atividade antioxidante do Trolox, usado como substância de referência, foram utilizadas as seguintes concentrações 0,5mg/mL, 1,25mg/mL, 2,5mg/mL e 5,0mg/mL. A partir do gráfico 2, que mostra o perfil de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>, foi calculado o valor de  $IC_{50} = 0,25\text{mg/mL}$ .



**Gráfico 2:** Porcentagem de inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> pelo TROLOX.

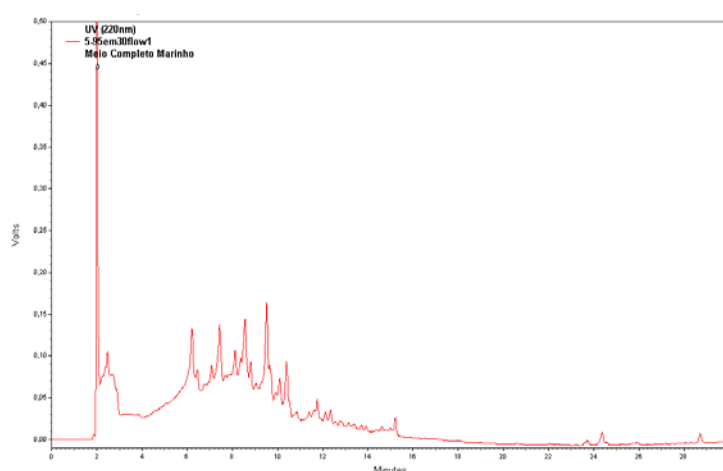
### 3. 7 Análise de CLAE

Nos extratos (AcOEt, BuOH e MeOH) foram realizadas análises cromatográficas (CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) com o objetivo de avaliar a diversidade metabólica dos fungos.

Os extratos brutos solubilizados em etanol (20 mg/mL) foram diluídos (100 $\mu$ L do extrato bruto + 900 $\mu$ L de etanol) e posteriormente filtrados em filtros Minisart® RC 15 - 0,45 $\mu$ m. As amostras foram analisadas em um CLAE Shimadzu LC-10A/C-47A com detector Shimadzu SPD-10A, equipado com coluna KROMASIL RP 18 (4,6 mm x 25 cm, 5  $\mu$ m partícula, porosidade 300 Å). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min e

o programa de eluição foi 5%-95% B em 30 min., onde: A: 0,045% TFA/ H<sub>2</sub>O; B: 0,036% TFA/ ACN. O comprimento de onda de detecção empregado foi de 220nm, pois é conhecido que a maioria dos metabólitos secundários naturais podem ser analisados em 210-215nm (FURTADO et al., 2005).

Como controle foram analisados os perfis cromatográficos de cada meio de cultura utilizado. Em relação ao MS, não foi realizada a cromatografia porque este meio não produziu extrato. O perfil cromatográfico do extrato proveniente do MCM está apresentado na Figura 4.



**Figura 4:** Análise de CLAE do extrato obtido do Meio Completo Marinho

### 3. 8 Análise Estatística

A análise estatística de variância (ANOVA) foi realizada a fim de averiguar se ocorram diferenças estatisticamente significativas, com grau de confiança de 95%, entre os métodos empregados para a obtenção dos extratos brutos testados quanto à atividade antioxidante.

### 3. 9 Determinação do IC<sub>50</sub>

De acordo com a literatura, os valores de IC<sub>50</sub> que corresponde à concentração inibitória de 50% do radical ABTS<sup>•+</sup>, são utilizados para comparar a atividade antioxidante, sendo que o menor valor de IC<sub>50</sub> corresponde à maior atividade antioxidante. Para o cálculo do IC<sub>50</sub> os gráficos da capacidade antioxidantes dos extratos foram ajustados por regressão não-linear, utilizando o

software Origin 8. A função Logística ajustou-se melhor aos dados, mostrando uma correlação de em torno de  $0,98 \pm 0,01$ . A equação da função está descrita abaixo:

$$y = \frac{a}{1 + e^{-k(x-x_c)}}$$

Onde:

**a** corresponde a amplitude máxima de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>;

**e** é a base do logaritmo neperiano;

**k** é a taxa média de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>;

**x<sub>c</sub>** é a concentração em que **y** atinge metade da inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>;

**x** é a concentração em mg/mL, e;

**y** é a porcentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>.


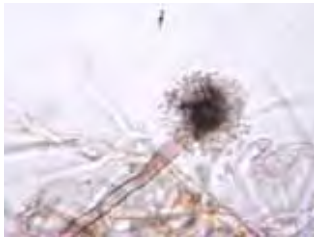


Para determinar a concentração necessária para a inibição de 50% do radical ABTS<sup>•+</sup>, é atribuído o valor de 50 para o **y** e calcula-se o valor de **x<sub>c</sub>** que é expresso em (mg/mL).


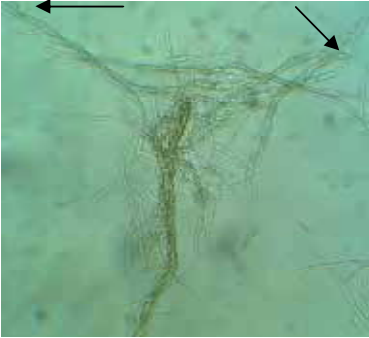


#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO



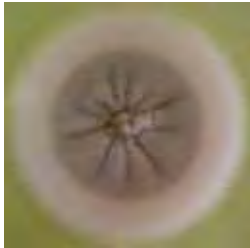

Os resultados das análises macroscópica e microscópica dos fungos isolados das praias do Balneário em Peruíbe-SP e Cabelo Gordo de Fora em São Sebastião-SP estão descritas na tabela 3





##### 4.1 Taxonomia dos Fungos Isolados das praias do Balneário em Peruíbe e Cabelo Gordo de Fora em São Sebastião.




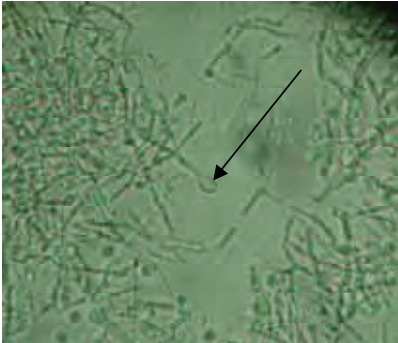
**Tabela 3:** Taxonomia dos Fungos isolados do Litoral Paulista

Fungo (Origem, Local)	Taxa de Crescimento em Meio Sabouraud (10 dias)	Características Macroscópicas	Características Microscópicas	Classificação
<i>Aspergillus niger</i> (Alga <i>Padina</i> sp, São Sebastião)	Fungo de crescimento <u>rápido</u> . (4dias)	Colônia coberta com uma densa camada de conídios negros e reverso claro. 	Conidióforos longos e escuro com fiáldes cobrindo toda vesícula. 	Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Classe: Eurotiomycetes; Ordem: Eurotiales; Família: Trichocomaceae; Gênero: <i>Aspergillus</i> ; Espécie: <i>niger</i>
<i>Aspergillus versicolor</i> (Alga <i>Caulerpa</i> sp, São Sebastião)	Fungo de crescimento <u>rápido</u> . (4 dias)	Colônia aveludada com vários tons de verde. Reverso claro. 	Conidióforo longo com fiálide cobrindo a maior parte da vesícula. 	Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Classe: Eurotiomycetes; Ordem: Eurotiales; Família: Trichocomaceae; Gênero: <i>Aspergillus</i> ; Espécie: <i>versicolor</i>

<p><i>Aureobasidium pullulans</i></p> <p>(Rocha, Peruíbe)</p>	<p>Fungo de crescimento <u>moderado</u>. (7 dias)</p>	<p>As colônias são aveludadas com coloração cinza a preta e reverso preto.</p> 	<p>Dois tipos de hifas são observadas: 1) hialinas, delicadas produzindo conídios em certos pontos férteis (seta). 2) parede grossa, escura e septada.</p> 	<p>Reino: Fungi;          Filo: Ascomycota;          Classe: Dothideomycetes;          Ordem: Dothideales;          Família: Dothioraceae;          Gênero: <i>Aureobasidium</i>;          Espécie: <i>pullulans</i></p>
<p><i>Cladosporium</i> sp</p> <p>(Sedimentos Marinhos, São Sebastião)</p>	<p>Fungo de crescimento <u>lento</u>. (20 dias)</p>	<p>Colônia aveludada de brilho opaco com uma pequena elevação no centro. Coloração cinza e reverso escuro.</p> 	<p>Hifas septadas com conidióforos terminais de tamanho variado que produzem cadeias de conídios ovais. Os conídios apresentam hila.</p> 	<p>Reino: Fungi;          Filo: Ascomycota;          Classe: Deuteromycetes;          Ordem: Moniliales;          Família: Dematiaceae;          Gênero: <i>Cladosporium</i></p>

<p><i>Exophiala</i> sp (Alga <i>Padina</i> sp, São Sebastião)</p>	<p>Fungo de crescimento <u>lento</u>. (20dias)</p>	<p>Colônia aveludada com dobras radiais e coloração verde oliva escura e reverso escuro.</p> 	<p>Hifas septadas e células ovais brotando como levedura (seta). Algumas células com septo central.</p> 	<p>Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Classe: Eurotiomycetes; Ordem: Chaetothyriales Família: Herpotri chiellaceae Gênero: <i>Exophila</i></p>
<p><i>Madurella</i> <i>grisea</i> (Sedimentos Marinhos, São Sebastião)</p>	<p>Fungo de crescimento <u>moderado</u> (12 dias)</p>	<p>Colônia enrugada no centro com fendas radiais na direção da borda. Coloração cinza no centro e bege na borda. Reverso escuro.</p> 	<p>Dois tipos de hifas são observadas: 1) Hifas septadas, largas, ramificadas e escuras formando cadeias de células arredondadas; 2) Hifas finas e hialinas. Clamidoconídios são produzidos (seta).</p> 	<p>Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Classe: Ascomycetes Ordem: Sordariales Família: Microascaceae Gênero: <i>Madurella</i> Espécie: <i>grisea</i></p>

<p><i>Mucor</i> sp (Rocha, São Sebastião)</p>	<p>Fungo de crescimento <u>rápido</u> (4 dias)</p>	<p>Colônia com superfície algodonosa; coloração cinza e reverso claro.</p> 	<p>Esporangióforos longos com esporângio globuloso com columela.</p> 	<p>Reino: Fungi; Filo: Zygomycota Classe: Zygomycetes; Ordem: Mucorales; Família: Mucoraceae; Gênero: <i>Mucor</i></p>
<p><i>Penicillium</i> sp (Sedimentos Marinhos, Peruíbe)</p>	<p>Fungo de crescimento <u>rápido</u> (4 dias)</p>	<p>Colônia aveludada verde azulada com borda branca e reverso claro.</p> 	<p>As hifas são septadas e ramificadas. Fiáldes em forma de “balão” que produzem esporos ovais em cadeia. Conidióforos com metula.</p> 	<p>Reino: Fungi; Filo: Ascomycota; Classe: Eurotiomycetes; Ordem: Eurotiales; Família: Trichocomaceae; Gênero: <i>Penicillium</i></p>

<p><i>Trichophyton terrestre</i></p> <p>(<i>Anemonia sargassensis</i>, São Sebastião)</p>	<p>Fungo de crescimento <u>moderado</u> (8 dias)</p>	<p>Colônias com aspecto aveludada. Superfície branca a amarela e reverso amarelado.</p> 	<p>Hifas septadas, ramificadas e com parede fina. Microconídios perpendiculares à hifa.</p> 	<p>Reino: Fungi;          Filo: Ascomycota;          Classe: Eurotiomycetes;          Ordem: Onygenales;          Família: Arthrodermataceae          Gênero: <i>Trichophyton</i>;          Espécie: <i>terrestre</i></p>
<p><i>Trichohyton tonsurans</i></p> <p>(Alga <i>Caulerpa</i> sp, São Sebastião)</p>	<p>Fungo de crescimento <u>lento</u>. (12 dias)</p>	<p>Colônia com dobras concêntricas e radiais. Coloração branca no centro e bege na borda. Reverso claro.</p> 	<p>Hifas septadas. Com microconídios perpendiculares ao longo das hifas. Presença de clamidoconídios (seta) intercalantes e terminais na hifa.</p> 	<p>Reino: Fungi;          Filo: Ascomycota;          Classe: Eurotiomycetes          Ordem: Onygenales          Família: Arthrodermataceae          Gênero: <i>Trichophyton</i>;          Espécie: <i>tonsurans</i></p>

Como podemos observar na Tabela 3, todos os fungos identificados neste trabalho pertencem ao filo Ascomycota, com exceção do *Mucor* sp que pertence ao Zigomycetos. Seguindo a classificação proposta por Kohlmeyer & Kohlmeyer (1979), estes fungos podem ser classificados como fungos marinhos facultativos, que são organismos provenientes de água doce ou terrestre, capazes de crescerem e, possivelmente, esporularem em ambiente marinho.

Este estudo também mostrou que a diversidade dos fungos parece estar relacionada ao substrato que foram isolados, como *Aspergillus niger*, *A. versicolor*, *Exophiala* sp e *Trichophyton tonsurans* presentes em algas; *Aureobasidium pullulans* e *Mucor* sp em rochas; *Madurella grisea*, *Cladosporium* sp e *Penicillium* sp em sedimento marinhos e *Trichophyton terrestre* em esponja. Estes resultados concordam com os relatos de Carlile & Watkinson, 2001, que a distribuição dos

fungos marinhos é determinada pelo tipo de substrato a que se aderem, tais como plantas aquáticas, algas, materiais e madeira à deriva, raízes de mangue, rochas, lodo, solos, areias e animais invertebrados.

#### 4.2 Obtenção dos Extratos Brutos

Nas tabelas 4, 5 e 6 observamos as quantidades dos extratos brutos obtidos do micélio, após tratamento com metanol (MeOH) e do meio de cultivo, após tratamento com acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), dos fungos estudados, de acordo com as metodologias 1, 2 e 3 descritas no item 1.5.

Como podemos observar houve variações na quantidade dos extratos brutos obtidos em diferentes metodologias, e também houve variações de um fungo para outro, dentro das mesmas condições de cultivo, e em relação aos diferentes meios de cultivo e tempos de crescimento para o mesmo fungo.

**Tabela 4:** Quantificação dos extratos brutos, obtidos de acordo com a metodologia 1<sup>(a)</sup>, provenientes do micélio, tratado com metanol (MeOH) e do meio de cultivo, tratados com acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), após crescimento dos fungos em 100 mL de Meio Sabouraud (MS) e Meio Completo Marinho (MCM) à temperatura ambiente sob agitação de 250 rpm.

Fungo	Meio de Cultura	Tempo de Cultivo (dias)	Biomassa (g/L)	Quantidade dos extratos AcOEt (mg)	Quantidade dos extratos BuOH (mg)	Quantidade dos extratos MeOH (mg)
<i>Aspergillus niger</i>	MCM	5	14,5	13	15	295
<i>Aspergillus niger</i>	MS	7	2,5	170	175	190
<i>Aspergillus niger</i>	MS	10	2	85	185	170
<i>Aspergillus versicolor</i>	MCM	3	12,0	40	160	210
<i>Aspergillus versicolor</i>	MCM	5	16,5	10	700	745
<i>Aspergillus versicolor</i>	MS	12	5,5	235	200	110
<i>Aspergillus versicolor</i>	MS	20	8,0	230	30	25
<i>Aureobasidium pullulans</i>	MCM	2	1	730	1070	100
<i>Aureobasidium pullulans</i>	MCM	4	0,5	1250	2410	60
<i>Aureobasidium pullulans</i>	MS	4	1	330	400	75
<i>Aureobasidium pullulans</i>	MS	7	0,5	290	540	95
<i>Cladosporium</i>	MCM	3	16,5	1050	560	310
<i>Cladosporium</i>	MCM	5	21,5	770	600	235
<i>Cladosporium</i>	MS	6	6,0	500	650	10
<i>Cladosporium</i>	MS	12	10,5	450	600	10
<i>Exophiala</i>	MCM	3	10	460	330	370
<i>Exophiala</i>	MCM	5	14	130	345	415
<i>Exophiala</i>	MS	5	1,5	460	75	125
<i>Exophiala</i>	MS	8	3,0	690	180	155
<i>Madurella grisea</i>	MCM	3	10,5	465	360	105
<i>Madurella grisea</i>	MCM	5	13	680	170	245
<i>Madurella grisea</i>	MS	3	2,0	66	210	45
<i>Madurella grisea</i>	MS	5	3,0	180	280	55

<i>Penicillium</i>	MCM	3	13	180	205	235
<i>Penicillium</i>	MCM	5	13,5	370	240	444
<i>Penicillium</i>	MS	5	3,5	255	325	110
<i>Penicillium</i>	MS	8	5	200	300	110
<i>Rhizopus oryzae</i>	MCM	3	15,5	300	340	180
<i>Rhizopus oryzae</i>	MCM	5	25,2	130	40	905
<i>Rhizopus oryzae</i>	MS	4	3	270	335	70
<i>Rhizopus oryzae</i>	MS	8	6,5	190	270	225
<i>Trichophyton terrestre</i>	MCM	3	11,5	70	35	205
<i>Trichophyton terrestre</i>	MCM	5	16,5	380	220	295
<i>Trichophyton terrestre</i>	MS	12	8,0	80	125	20
<i>Trichophyton terrestre</i>	MS	16	7,0	250	10	20
<i>Trichophyton tonsurans</i>	MCM	4	11,5	45	50	170
<i>Trichophyton tonsurans</i>	MCM	7	13,5	25	90	210
<i>Trichophyton tonsurans</i>	MS	2	0,5	90	155	60
<i>Trichophyton tonsurans</i>	MS	5	1	120	1160	125
Controle	MCM	3	-	10	100	-
Controle	MCM	5	-	30	20	-
Controle	MS	10	-	-	-	-

(a): Metodologia 1 refere-se ao tempo de extração prolongado e capela para evaporação dos solventes.

**Tabela 5:** Quantificação dos extratos brutos, obtidos de acordo com a metodologia 2<sup>(b)</sup>, provenientes do micélio, tratado com metanol (MeOH) e do meio de cultivo, tratado com acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), após crescimento dos fungos em 100 mL de Meio Sabouraud (MS) e Meio Completo Marinho (MCM) à temperatura ambiente sob agitação de 250 rpm.

Fungo	Meio de Cultura	Tempo de Cultivo (dias)	Biomassa (g/L)	Quantidade dos extratos AcOEt (mg)	Quantidade dos extratos BuOH (mg)	Quantidade dos extratos MeOH (mg)
<i>Aspergillus niger</i>	MS	7	2,5	100	240	160
<i>Aspergillus niger</i>	MS	10	2,0	180	180	60
<i>Trichophyton terrestre</i>	MS	12	8,0	50	124	40
<i>Trichophyton terrestre</i>	MS	16	7,0	91	97	99
Controle	MS	-	-	-	-	-

(b): Metodologia 2 refere-se ao tempo de extração prolongado e a utilização de rotaevaporador para evaporação dos solventes.

**Tabela 6:** Quantificação dos extratos brutos, obtidos de acordo com a metodologia 3<sup>(c)</sup>, provenientes do micélio, tratado com metanol (MeOH) e do meio de cultivo, tratado com acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH), após crescimento dos fungos em 100 mL de Meio Sabouraud (MS) e Meio Completo Marinho (MCM) à temperatura ambiente sob agitação de 250 rpm.

Fungo	Meio de Cultura	Tempo de Cultivo (dias)	Biomassa (g/L)	Quantidade dos extratos AcOEt (mg)	Quantidade dos extratos BuOH (mg)	Quantidade dos extratos MeOH (mg)
<i>Aspergillus niger</i>	MS	7	2,5	200	200	100
<i>Aspergillus niger</i>	MS	10	2,0	200	200	100
<i>Trichophyton terrestre</i>	MS	12	8,0	40	115	100
<i>Trichophyton terrestre</i>	MS	16	7,0	40	113	99
Controle	MS	-	-	-	-	-

(c): Metodologia 3 refere-se ao tempo de extração rápido e a utilização de rotaevaporador para evaporação dos solventes.

Comparando as metodologias 2 e 3, podemos observar que a variação do tempo de extração, maior e menor, respectivamente, influenciou na quantidade do extrato bruto. Para o fungo *A. niger*, as maiores variações foram observadas para o extrato AcOEt, obtidas do fungo na fase exponencial de crescimento (7 dias). Neste caso uma redução de 50% foi observada quando a extração prolongada foi utilizada. Por outro lado, para o extrato MeOH houve uma redução de massa de 37,5% com a extração rápida. Já, o fungo *A. niger* em fase estacionária de crescimento (10 dias), mostrou um rendimento maior para todos os extratos (AcOEt, BuOH e MeOH) com a extração rápida. Para o fungo *T. terrestre* com 12 dias de crescimento, os extratos obtidos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH) obtiveram um rendimento maior na extração prolongada, enquanto o extrato MeOH apresentou uma redução de 60% no rendimento quando a extração foi prolongada. Em fase estacionária de crescimento (16 dias), observamos que não há alteração no rendimento do extrato MeOH, uma vez que ambos apresentam 99mg/100mL, mas para o extrato AcOEt, obtivemos maior rendimento na extração prolongada e para o extrato BuOH, o maior rendimento foi obtido na extração rápida.

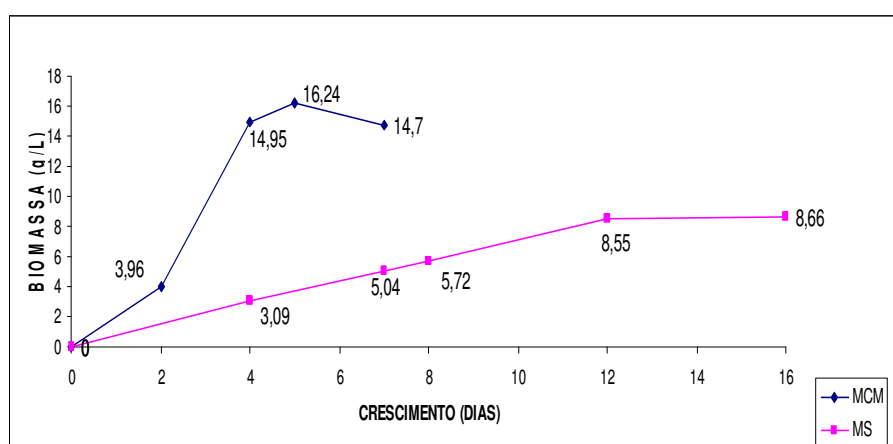
Analisando as metodologias 1 e 2, referentes a temperatura de evaporação dos solventes, observamos que houve influência no rendimento dos extratos brutos. Para o fungo *A. niger* com 7 dias de crescimento, a maior diferença está no extrato AcOEt que apresentou uma redução de 41% no rendimento quando utilizamos o rotaevaporador (metodologia 2). Mas, o mesmo fungo em fase estacionária de crescimento (10 dias), observamos que a maior variação está no extrato MeOH, que mostra 61% de redução no rendimento quando utilizamos o rotaevaporador. Já para o fungo *T. terrestre* em fase exponencial (12 dias), vemos uma redução de 50% do rendimento no extrato MeOH quando utilizamos o capela. Essa diferença também é encontrada em na fase estacionária (16 dias) onde todos os extratos apresentam variações maiores que 100%, sendo que apenas o extrato AcOEt mostra um rendimento maior em capela 250mg/100mL, enquanto os extratos BuOH e MeOH obtiveram um rendimento maior em rotaevaporador, 97mg/100mL e 99mg/100mL, respectivamente.

### 4.3 Avaliação da Capacidade Antioxidante nos Extratos

#### 4.3.1 *Trichophyton terrestre*

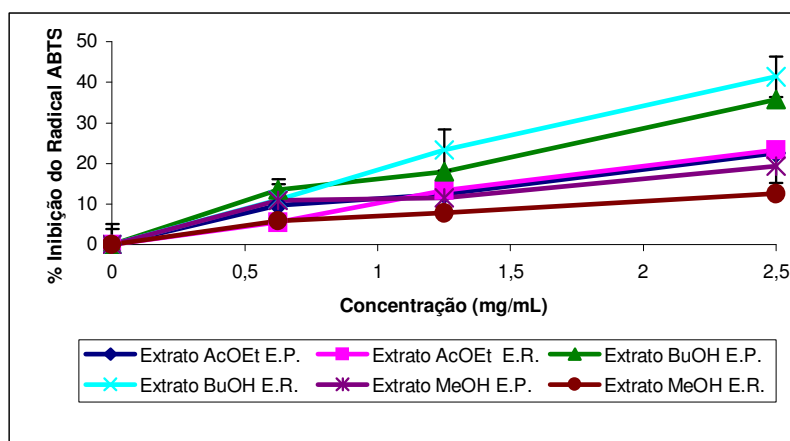
##### 4.3.1.1 Influência do Tempo de Extração na Capacidade Antioxidante dos Compostos Obtidos do Fungo *Trichophyton terrestre*.

Neste trabalho foi analisado o efeito do tempo de extração (prolongado ou rápido) na obtenção de compostos antioxidantes do fungo *T. terrestre* cultivado em Meio Sabouraud em fase estacionária e exponencial de crescimento. Estas fases foram determinadas através de cinética de crescimento (gráfico 3). Os resultados mostraram que o pico da fase exponencial ocorre em torno do 12º dia a partir do qual inicia-se a fase estacionária de crescimento.



**Gráfico 3:** Cinética de crescimento do fungo *Trichophyton terrestre* em Meio Sabouraud (MS) e Meio Completo Marinho (MCM).

No gráfico 4 estão os resultados da atividade antioxidante dos extratos obtidos em fase exponencial de crescimento (12 dias) do meio de cultura (AcoEt e BuOH) e micélio (MeOH) de acordo com a metodologia 2 e 3.



**Gráfico 4:** Porcentagem de Inibição do Radical  $ABTS^{\cdot+}$  dos compostos antioxidantes obtidos por extração prolongada (EP) ou rápida (ER) após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud em fase exponencial de crescimento (12 dias).

No gráfico 4 observamos que na concentração de 0,625mg/mL praticamente todos os extratos apresentam a mesma porcentagem de inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  (10%). Entretanto, quando analisamos as concentrações de 1,25mg/mL e 2,5mg/mL observamos que o extrato BuOH apresenta maior capacidade antioxidante, em ambos os tempos de extração, quando comparado aos extratos de AcOEt e MeOH. Os extratos BuOH mostraram uma porcentagem de inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  de 41% e 35% na concentração de 2,5mg/mL quando obtidos com o tempo de extração prolongado ( $IC_{50}=3,5\text{mg/mL}$ ) e rápido ( $IC_{50}=3,0\text{mg/mL}$ ), respectivamente. Aplicando a análise de variância, tabela 6-apêndice, obtivemos o *F calculado* (4,57) menor que o *F crítico* (7,71), indicando que não há diferença significativa entre as porcentagens de inibição dos compostos com atividade antioxidante obtidos por extração rápida ou prolongada.

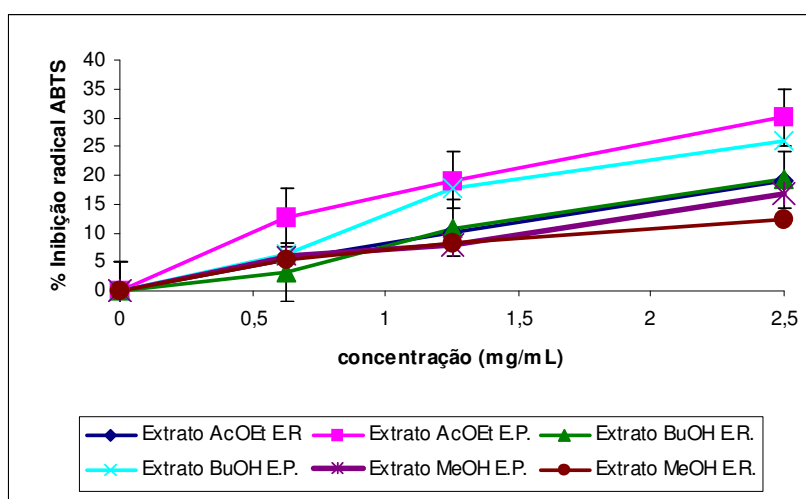
Resultados semelhantes são obtidos quando analisamos os extratos AcOEt, pois na concentração de 2,5mg/mL, independentemente do tempo de extração ser prolongado ou rápido, foi obtido uma inibição de 23% do radical  $ABTS^{\cdot+}$  ( $IC_{50}=5,3\text{mg/mL}$ ). Na análise de variância (ANOVA), tabela 7-apêndice, o *F calculado* (3,91) é menor que o *F crítico* (7,71), assim, não há diferença significativa entre os tempos de extração (prolongado e rápido), independentemente da concentração utilizada.

Para os compostos obtidos do micélio (MeOH), a análise de variância, mostrou que as diferenças não são significantes em relação ao tempo de extração prolongado e rápido, tabela 8-apêndice, pois, o *F calculado* (7,24) é menor que o *F*

crítico (7,71). No gráfico 4, observamos que na concentração de 2,5mg/mL, há inibição de 19% e 13% para a extração prolongada ( $IC_{50}=6,5\text{mg/mL}$ ) e rápida ( $IC_{50}=6,8\text{mg/mL}$ ), respectivamente.

Dessa forma, tanto para os extratos obtidos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH) quanto o extrato obtido do micélio (MeOH), o tempo de extração prolongado e rápido não afeta a obtenção de compostos antioxidantes do fungo *T.terrestre* cultivado em meio Sabouraud por 12 dias.

No gráfico 5 apresenta a capacidade antioxidante dos compostos obtidos do fungo *T. terrestre* cultivado em meio Sabouraud em fase estacionaria de crescimento (16 dias) com diferentes tempos de extração (prolongado e rápido), de acordo com as metodologias 2 e 3.



**Gráfico 5:** Porcentagem de Inibição do Radical  $ABTS^{\cdot+}$  dos compostos antioxidantes obtidos por extração prolongada (EP) ou rápida (ER) após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud em fase exponencial de crescimento (16 dias).

Comparando os extratos AcOEt em diferentes tempos de extração observamos que a maior atividade antioxidante foi obtida quando utilizamos o tempo de extração prolongado (EP) em todas as concentrações. Em 2,5mg/mL, por exemplo, as porcentagens de inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  são de 30% e 19% para a extração prolongada ( $IC_{50}=4,1\text{mg/mL}$ ) e rápida ( $IC_{50}=6,6\text{mg/mL}$ ), respectivamente. Aplicando a análise de variância, tabela 9-apêndice, verificamos que o  $F$  calculado (95,43) é maior que o  $F$  crítico (7,71), confirmando que há diferença significativa nas porcentagens de inibição entre os tempos de extração prolongado e rápido.

O mesmo comportamento foi observado para os extratos butanólicos (BuOH), onde na concentração de 2,5mg/mL, a inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  foi de 26% e 19%,

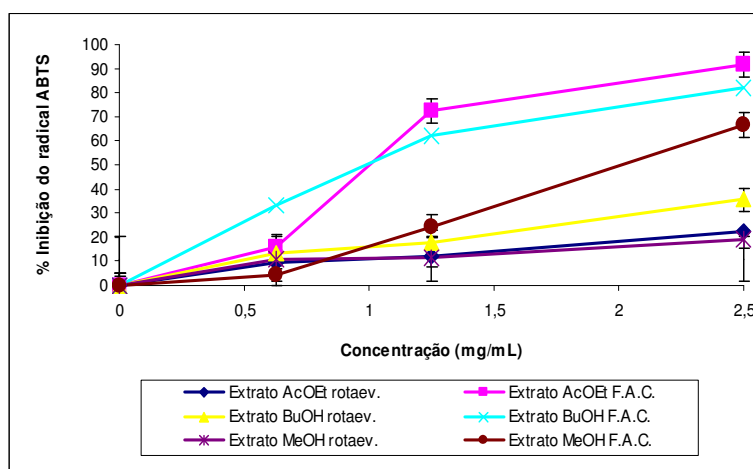
respectivamente para a extração prolongada ( $IC_{50}=4,6\text{mg/mL}$ ) e rápida ( $IC_{50}=6,2\text{mg/mL}$ ). Essa diferença também é observada em concentrações mais baixas ( $1,25\text{mg/mL}$  e  $0,625\text{mg/mL}$ ). A análise de variância, tabela 10-apêndice, mostra que o  $F$  calculado (163,7) é maior que o  $F$  crítico (7,71), portanto para os extratos BuOH há uma diferença significativa entre os valores obtidos, sendo a extração prolongada mais eficaz.

Já para o extrato MeOH obtido do micélio, não observamos diferenças quanto à atividade antioxidante nos diferentes tempos de extração nas concentrações de  $0,625\text{mg/mL}$  (6%) e  $1,25\text{mg/mL}$  (8%). Em  $2,5\text{mg/mL}$  apesar da porcentagem de inibição ser de 16% e 12% para o tempo de extração prolongado ( $IC_{50}=7,7\text{mg/mL}$ ) e rápido ( $IC_{50}=8,0\text{mg/mL}$ ), respectivamente, a análise estatística mostrou que essa diferença não foi significativa.

Assim, para o fungo *T.terrestre* cultivado em Meio Sabouraud por 16 dias (fase estacionária), o tempo de extração influenciou na atividade antioxidante dos compostos extraídos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH), sendo que o tempo de extração prolongado foi mais eficaz. Entretanto, não ocorre o mesmo para o extrato obtido do micélio (MeOH).

#### **4.3.1.2 Influência da Temperatura de Evaporação dos Solventes Orgânicos nos Compostos com Capacidade Antioxidante obtidos do fungo *Trichophyton terrestre*.**

A influência da temperatura de evaporação dos solventes na capacidade antioxidante dos extratos obtidos do fungo *T.terrestre* cultivado em meio Sabouraud por 12 dias está mostrado no gráfico 6.



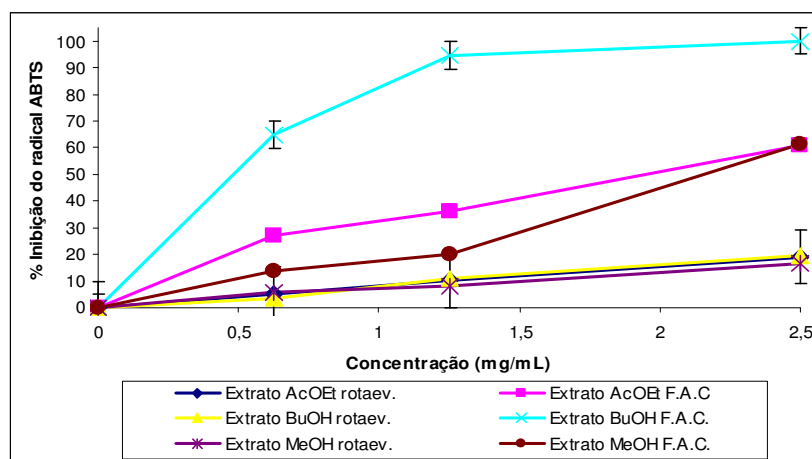
**Gráfico 6:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação a temperatura de evaporação dos solventes rotaevaporador (rotaev.) ou capela dos compostos antioxidantes do fungo *T.terrestre* cultivado em Meio Sabouraud em fase exponencial de crescimento (12 dias)

Como podemos observar, nas concentrações de 1,25mg/mL e 2,5mg/mL, os extratos provenientes do meio de cultivo (AcOEt e BuOH) e do micélio (MeOH), obtidos em capela, apresentam maior capacidade antioxidante comparado aos extratos obtidos em rotaevaporador. Por exemplo, na concentrações de 1,25mg/mL, o extrato AcOEt obtido em capela inibiu, 73% do radical ABTS<sup>•+</sup> ( $IC_{50}=1,0\text{mg/mL}$ ), enquanto o mesmo extrato obtido em rotaevaporador inibi apenas 12% ( $IC_{50}=5,6\text{mg/mL}$ ). A análise de variância, tabela 15-apêndice, mostra que existe uma diferença significativa entre os extratos, uma vez que o *F calculado* (1858) é maior que o *F crítico* (7,71). Já para o extrato BuOH a diferença entre a temperatura de evaporação começa a ser observada a partir da menor concentração 0,625mg/mL, onde encontramos uma inibição de 33% e 13% para extratos obtidos em capela ( $IC_{50}=1,0\text{mg/mL}$ ) e rotaevaporador ( $IC_{50}=3,5\text{mg/mL}$ ), respectivamente. Na concentração de 1,25mg/mL, extratos obtidos por capela inibem 62% do radical ABTS<sup>•+</sup> enquanto aqueles do rotaevaporador inibem apenas 18%. Obviamente há uma diferença estatística significativa entre as capacidades antioxidantes dos extratos quanto à temperatura de evaporação dos solventes para o extrato BuOH, como mostra a análise de variância, tabela 13-apêndice, onde *F calculado* (3161) é maior que *F crítico* (7,71). Para o extrato MeOH obtido do micélio, com o aumento da concentração, o extrato obtido em capela ( $IC_{50}=1,7\text{mg/mL}$ ) apresenta uma inibição maior do radical ABTS<sup>•+</sup> quando comparado ao extrato obtido em rotaevaporador ( $IC_{50}=6,8\text{mg/mL}$ ), sendo respectivamente 24% e 11% para a concentração de

1,25mg/mL e 6% e 19% para a concentração de 2,5mg/mL. Na análise de variância (tabela 14-apêndice) os valores de  $F$  calculado (12280) e  $F$  crítico (7,71), mostram que há diferença significativa quanto à temperatura de evaporação.

A partir desses resultados podemos concluir que os extratos obtido do meio de cultivo (AcOEt e BuOH) e micélio (MeOH) do fungo *T.terrestre* cultivado em Meio Sabouraud por 12 dias (fase exponencial), a evaporação dos solventes em capela é mais eficaz que a evaporação em rotaevaporador.

Para os extratos do fungo *T.terrestre* obtido após 16 dias de crescimento em meio Sabouraud (fase estacionária), observamos o mesmo comportamento dos extratos obtidos durante a fase exponencial, quanto à temperatura de evaporação dos solventes (Gráfico 7).



**Gráfico 7:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS\*\* em relação a temperatura de evaporação dos solventes rotaevaporador ou capela dos compostos antioxidantes do fungo *T.terrestre* cultivado em Meio Sabouraud em fase estacionária de crescimento (16 dias)

Todos os extratos obtidos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH) e do micélio (MeOH) em capela mostraram maior capacidade antioxidante quando comparado aos extratos em rotaevaporador. Sendo diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato (Gráfico 7).

O extrato AcOEt obtido em capela, na concentração de 0,625mg/mL, tem uma capacidade antioxidante de 27% enquanto o mesmo extrato obtido em rotaevaporador apresenta apenas 5%. Na concentração de 2,5 mg/mL, essa diferença, atinge 61% e 19% para capela e rotaevaporador, respectivamente. Dessa forma, o extrato AcOEt obtido em capela ( $IC_{50}=1,6$ mg/mL) apresenta uma capacidade antioxidante significativamente maior quando comparado ao mesmo

extrato obtido em rotaevaporador ( $IC_{50}=6,6\text{mg/mL}$ ), uma vez que  $F_{calculado}$  (12482) é maior que  $F_{crítico}$  (7,71). Tabela 15-apêndice.

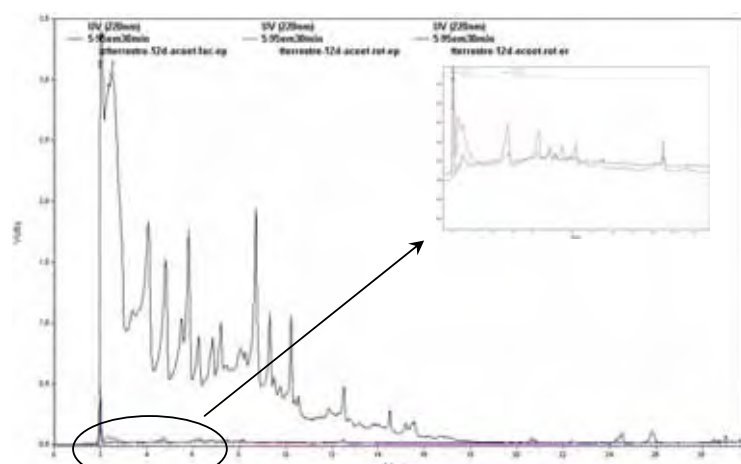
Para o extrato BuOH, gráfico 7, na concentração de  $0,625\text{mg/mL}$ , a diferença na capacidade antioxidante é ainda maior, sendo de 64% e 3% para capela e rotaevaporador, respectivamente. Para a concentração  $2,5\text{mg/mL}$ , a porcentagem de inibição do radical  $ABTS^{•+}$  atinge 100% para capela e 19% para rotaevaporador. A análise de variância tabela 19-apêndice, confirma a diferença significativa entre a utilização de capela ( $IC_{50}=0,6\text{mg/mL}$ ) e rotaevaporador ( $IC_{50}=6,2\text{mg/mL}$ ), pois o valor de  $F_{calculado}$  é 3215 e  $F_{crítico}$  é 7,71 (Tabela 16-apêndice).

O gráfico 7 mostra que o extrato MeOH, tanto na concentração de  $0,625\text{mg/mL}$  como na  $1,25\text{mg/mL}$  obteve-se uma inibição do radical  $ABTS^{•+}$  de aproximadamente 17% para capela e 8% para rotaevaporador, sendo essa diferença significativa como comprovada pela análise de variância (ANOVA), mostrada na tabela 27-apêndice. Essa diferença é ainda maior quando analisamos a concentração de  $2,5\text{mg/mL}$  onde encontramos 61% e 16% para capela ( $IC_{50}=2,2\text{mg/mL}$ ) e rotaevaporador ( $IC_{50}=7,7\text{mg/mL}$ ), respectivamente.

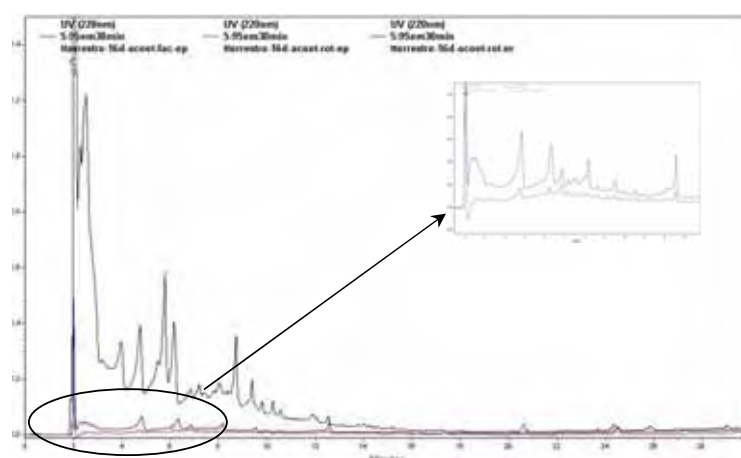
Portanto, para o fungo *T.terrestre* cultivado em meio Sabouraud por 16 dias, a evaporação dos solventes, tanto do meio de cultivo como do micélio, em capela mostrou-se mais apropriada para a obtenção de compostos com atividade antioxidante quando comparado à evaporação em rotaevaporador.

#### **4.3.1.3 Perfil de CLAE dos extratos obtidos do fungo *T. terrestre***

As figuras 5 e 6 mostram o perfil químico dos extratos obtidos após cultivo do fungo *T.terrestre* cultivado em meio Sabouraud por 12 e 16 dias, correspondendo respectivamente as fases exponencial e estacionária.



**Figura 5:** Análise de CLAE dos extratos AcOEt obtidos após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud por 12 dias usando a Metodologia 1- capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (vermelho) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul).



**Figura 6:** Análise de CLAE dos extratos AcOEt obtidos após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud por 16 dias usando a Metodologia 1- capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (vermelho) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul).

Pelas figuras 5 e 6 podemos observar pequenas diferenças no perfil químico do extrato AcOEt quando o fungo *T.terrestre* é cultivado em meio Sabouraud por 12 e 16 dias, ou seja, fase exponencial e estacionária. Pelo extrato obtido em capela (preto) vemos que os picos são semelhantes havendo mudança na intensidade, sendo que o extrato AcOEt obtido em fase exponencial (12 dias) mostra uma intensidade maior que o mesmo extrato obtido com 16 dias de cultivo. Comparando os cromatogramas obtidos com os resultados de capacidade antioxidante do extrato AcOEt obtido em capela temos que, quanto maior a inibição do radical  $ABTS^{*+}$ , mais

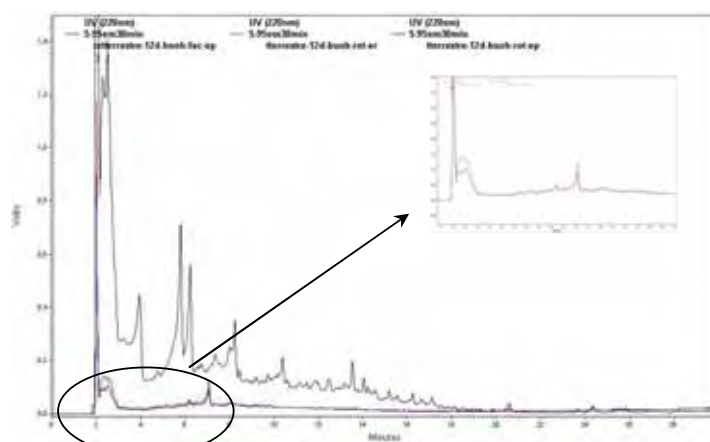
rico (maior quantidade de picos) e intenso é o perfil cromatográfico obtido. Desta forma, para 12 dias a inibição foi maior que em 16 dias de crescimento, 91% e 60%, e o máximo de absorção encontrado foi de 2,5 e 1,5 de AUFS, respectivamente. Assim, podemos dizer que a intensidade dos picos obtida nos cromatogramas é diretamente proporcional à atividade antioxidante. Ressaltamos que, quando comparamos o cromatograma em 12 e 16 dias, em 12 dias todos os picos foram encontrados em maior quantidade – maior intensidade.

Analisando a Figura 5 quanto ao tempo de extração prolongado e rápido, dos extratos obtidos com 12 dias de crescimento (fase exponencial), não observamos diferenças entre o perfil químico, o que foi confirmado pelo ensaio da atividade antioxidante, o qual não detectou uma diferença estatisticamente significativa quanto ao tempo utilizado para extração dos compostos antioxidantes. Entretanto, quando observamos o perfil referente ao tempo de extração rápido e prolongado dos extratos na fase estacionária de crescimento (figura 6), observamos que há uma intensidade um pouco maior dos picos quando utilizamos o tempo de extração rápido (azul). Mas, a análise estatística de variância (ANOVA) mostrou no teste antioxidante *in vitro* que há uma diferença significativa entre o tempo de extração, sendo a extração prolongada melhor que a extração rápida. E nesse caso não conseguimos encontrar uma relação entre o teste antioxidante e o perfil químico do extrato.

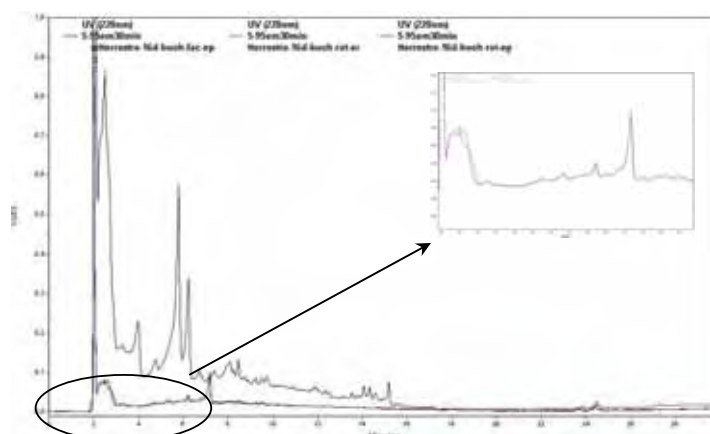
Quando comparamos a temperatura de evaporação dos solventes capela (linha preta) e rotaevaporador (linha vermelha), observamos que há uma grande diferença quanto ao perfil químico das amostras, tanto para 12 dias (figura 5) como para 16 dias (figura 6). Em ambos, o extrato AcoEt obtido em capela tem vários picos, mostrando a grande quantidade de compostos extraídos, enquanto o mesmo extrato obtido em rotaevaporador, comparativamente, não mostra pico significativo. A explicação para tal fato pode estar no baixo ponto de ebulição dos compostos, sendo assim, quando submetemos o extrato a temperaturas de 50-55°C, os compostos produzidos pelo fungo *T.terrestre* evaporam e isso se reflete no teste antioxidante, onde estatisticamente há uma diferença na temperatura de evaporação utilizada, sendo que o extrato obtido em capela (12 dias) apresenta 91% de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> contra 22% quando obtido em rotaevaporador. E o extrato AcOEt obtido em capela (16 dias) tem 60% de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> enquanto o mesmo extrato em rotaevaporador apresenta 19%. Em relação ao tempo de

extração prolongado ou rápido, observamos que não há modificação no perfil químico do extrato AcOEt com 12 e 16 dias de cultivo, ou seja, as substâncias obtidas com o tempo de extração prolongado ou rápido são iguais. Como há diversos picos no extrato AcOEt obtido em capela, para ambas as fases de crescimento, não podemos afirmar se apenas um é o responsável pela alta atividade antioxidante ou a somatória deles.

As figuras 7 e 8 ilustram o perfil químico dos compostos extraídos com butanol do meio de cultura em fase exponencial e estacionária de crescimento.



**Figura 7:** Análise de CLAE dos extratos BuOH obtidos após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud por 12 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (vermelho).



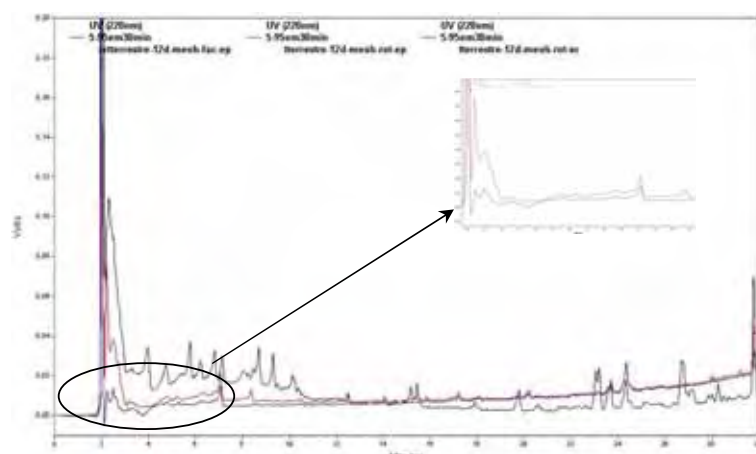
**Figura 8:** Análise de CLAE dos extratos BuOH obtidos após cultivo do fungo *T.terrestre* em Meio Sabouraud por 16 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (vermelho).

Não parece haver grande diferença no perfil químico do extrato BuOH quando comparamos a fase estacionária (12 dias) e exponencial (16 dias) de crescimento.

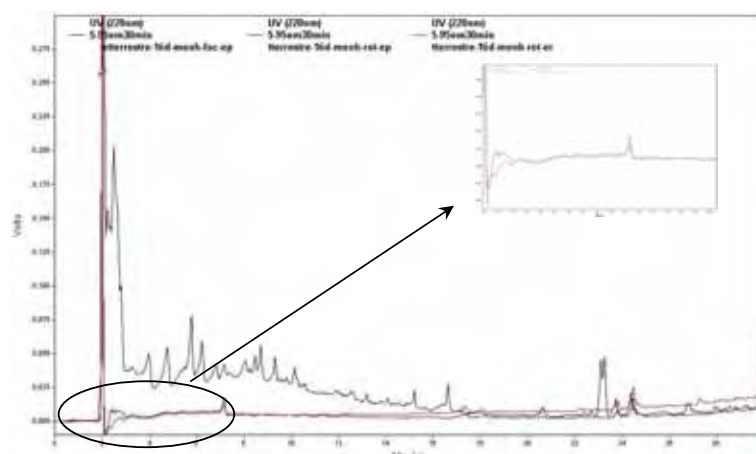
Observamos o extrato obtido em capela (preto), há apenas uma intensidade maior do primeiro pico (1,4) na fase exponencial de crescimento (figura 7) enquanto o mesmo apresenta uma intensidade de 0,9 na figura 8. Entretanto, pelo teste antioxidante, o extrato BuOH capela em 16 dias de cultivo inibe 100% dos radicais livres, enquanto o mesmo extrato em 12 dias inibe 82%. O mesmo perfil químico obtido com o extrato AcOEt ocorre com o extrato BuOH, pois quando analisamos o tempo de extração prolongado (azul) e rápido (vermelho) da figura 7 não observamos grande diferença no perfil químico, exatamente como no teste antioxidante, o qual não mostrou diferença estatisticamente significativa entre o tempo de extração utilizado. Entretanto, para a fase estacionária (figura 8), a análise de variância mostrou melhor eficácia da extração prolongada, mas não observamos diferença no perfil químico dos extratos (linhas vermelha e azul).

A grande alteração no perfil químico está quando comparamos a temperatura de evaporação dos solventes. Novamente, o extrato obtido em capela apresenta grande quantidade de compostos, enquanto nos extratos obtidos em rotaevaporador essa quantidade diminui drasticamente (figura 7 e 8). Isso também é observado no teste da capacidade antioxidante onde o extrato BuOH (capela), na concentração de 2,5mg/mL, em fase exponencial (12 dias), inibi 82% do radical ABTS<sup>•+</sup> e o mesmo extrato em rotaevaporador inibi 35% (Gráfico 6), e em fase estacionaria (16 dias) temos 100% e 19% de inibição dos radicais, na concentração de 2,5mg/mL, para capela e rotaevaporador, respectivamente (Gráfico 7). Também não é possível identificar o pico responsável pela atividade antioxidante, nem saber se há um ou vários compostos responsáveis por tal atividade, mas observamos a grande quantidade de compostos mais polares, como no extrato AcOEt.

Também não parece haver diferença no perfil químico do extrato obtido do micélio (MeOH) quando o fungo *T.terrestre* é cultivado em 12 e 16 dias.



**Figura 9:** Análise de CLAE dos extratos MeOH obtidos após cultivo do fungo *T.terrestris* em Meio Sabouraud por 12 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (vermelho) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul).



**Figura 10:** Análise de CLAE dos extratos MeOH obtidos após cultivo do fungo *T.terrestris* em Meio Sabouraud por 16 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (vermelho) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul).

O teste antioxidante mostra que para o extrato MeOH obtido em capela, a inibição do radical  $ABTS^{*+}$  é de 66% e 61% para a fase exponencial (12 dias) e estacionária (16 dias), respectivamente. O que está de acordo com as figuras 9 e 10 que não mostram grandes diferenças no perfil químico dos extratos, nem na intensidade dos picos.

Em geral, o extrato obtido do micélio (MeOH) apresenta um perfil químico diferente daqueles extratos obtidos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH), uma vez que observamos tanto compostos mais polares quanto compostos menos polares. Quando analisamos a porcentagem de inibição do radical  $ABTS^{*+}$  dos extratos

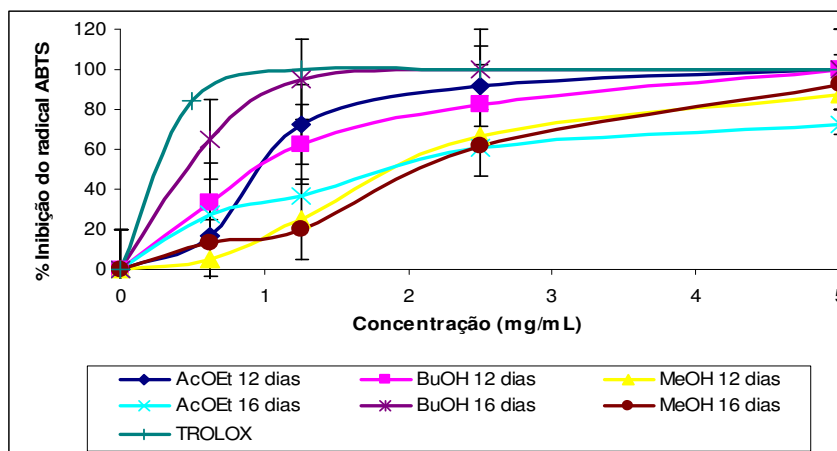
MeOH 12 dias (gráfico 4) e também 16 dias (gráfico 5) quanto ao tempo de extração prolongado e rápido, temos 19% e 12%, respectivamente, entretanto essa diferença não é estatisticamente significativa. Analisando o cromatograma, tempo de extração prolongado (vermelho) e rápido (azul), observamos diferenças no primeiro pico, onde na extração prolongada é maior que na extração rápida, assim como na atividade antioxidante. Na figura 10, a intensidade é 0,04 para o tempo de extração prolongado e próximo ao 0,00 na extração rápida.

Na figura 9, quando comparamos a temperatura de evaporação dos solventes capela (preto) e rotaevaporador (vermelho), há uma diferença no primeiro pico, sendo a capela maior que o rotaevaporador, assim como no teste em vitro, onde o extrato obtido em capela atinge 66% da capacidade antioxidante e o extrato em rotaevaporador atinge 19%. O mesmo é observado na figura 10 e a diferença da capacidade antioxidante é de 61% para o extrato em capela e 16% para o extrato em rotaevaporador. Como a intensidade desse pico difere muito, é possível que ele seja o responsável pela capacidade antioxidante do extrato MeOH capela. Entretanto, há os demais picos observados no extrato MeOH obtido em capela, também podem contribuir para elevar o potencial antioxidante da amostra.

Dessa forma, podemos concluir que para todos os extratos (AcOEt, BuOH e MeOH), não houve diferenças no perfil químico em relação ao tempo de crescimento (12 e 16 dias) e ao tempo de extração (prolongado e rápido). Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado para o método de evaporação usado, capela e rotaevaporador, pois os extratos obtidos por capela apresentam mais picos que aqueles obtidos em rotaevaporador. Assim para obtenção de uma maior variedade de substâncias, optamos por utilizar a metodologia 1 (Tempo de extração prolongado e capela) .

#### **4.3.1.4 Avaliação da capacidade antioxidante do fungo *T. terrestre* em diferentes condições de cultivo**

O gráfico 8 mostra os resultados do ensaio da atividade antioxidante dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos após 12 e 16 dias de cultivo do fungo *Trichophyton terrestre* em Meio Sabouraud.

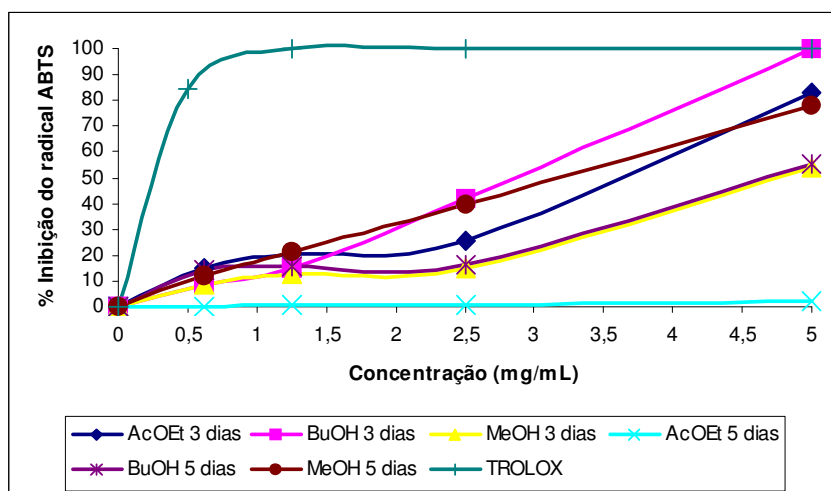


**Gráfico 8:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Trichophyton terrestre* por 12 e 16 dias em Meio Sabouraud.

Como podemos observar no gráfico 8, o extrato BuOH, obtido após 16 dias de crescimento ( $IC_{50}=0,6\text{mg/mL}$ ), apresentou a maior inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> (95%), enquanto que o extrato MeOH (do mesmo período) ( $IC_{50}=2,15\text{mg/mL}$ ) mostrou a menor porcentagem de inibição (20%), considerando a concentração de 1,25mg/mL. Estes resultados indicam que as substâncias com atividade antioxidante estão presentes em maior quantidade no meio de cultura do que no micélio do fungo *T. terrestre*.

Ao comparar os extratos BuOH, nos diferentes tempos de cultivo, gráfico 8, observa-se uma maior inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> (95%) após 16 dias ( $IC_{50}=0,6\text{mg/mL}$ ) quando comparado com o tempo de 12 dias ( $IC_{50}=1,0\text{mg/mL}$ ), (62%), na concentração de 1,25mg/mL. Estes resultados mostram que uma maior quantidade de compostos ativos são produzidos durante a fase estacionária de crescimento, a qual corresponde ao tempo de 16 dias de cultivo, como mostrado no gráfico 3. Deste modo, observamos que o extrato BuOH obtido com 16 dias de cultivo ( $IC_{50}=0,6\text{mg/mL}$ ), apresenta uma capacidade antioxidante semelhante ao composto antioxidante de referência (Trolox -  $IC_{50}$  de 0,25mg/mL).

O Gráfico 9 apresenta os resultados da atividade antioxidante dos extratos (AcOEt, BuOH e MeOH), obtidos em Meio Completo Marinho após 3 e 5 dias de crescimento.



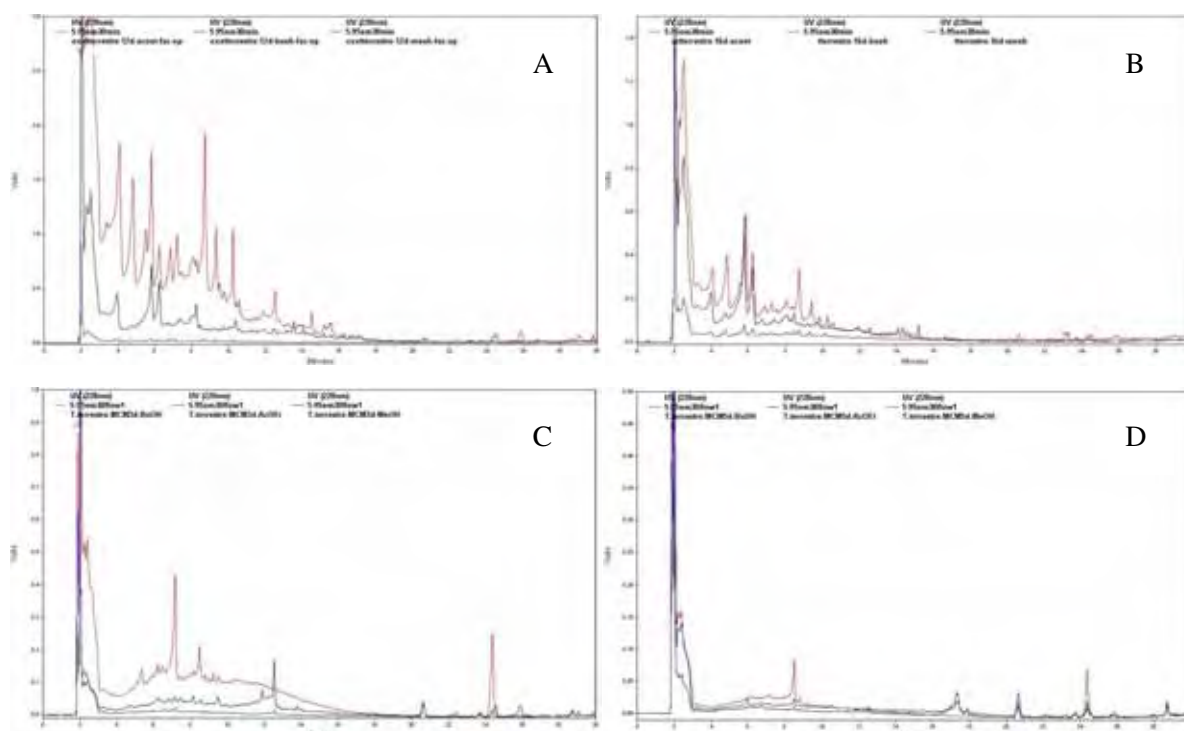
**Gráfico 9:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Trichophyton terrestre* por 3 e 5 dias em Meio Completo Marinho.

Podemos verificar que nenhum dos extratos analisados apresentou uma alta inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>, semelhante ao Trolox. Exceto o extrato BuOH, obtido após 3 dias de crescimento que conseguiu atingir 100% de inibição, quando usado na concentração de 5,0 mg/mL, entretanto, o valor de IC<sub>50</sub>=2,8mg/mL, ainda é mais alto que o Trolox IC<sub>50</sub>=0,25mg/mL. Comparando o mesmo extrato (BuOH), no tempo de 5 dias (IC<sub>50</sub>=4,7mg/mL), nota-se uma menor porcentagem de inibição, cerca de 55% para a concentração de 5,0 mg/mL. Então, em Meio Completo Marinho, substâncias com atividade antioxidantes são produzidas na fase exponencial, uma vez que esta fase é alcançada pelo fungo *T. terrestre* com 3 dias de crescimento, enquanto com 5 dias observa-se o início da fase estacionária, como mostrado no gráfico 3.

Portanto, os resultados obtidos com este fungo mostram-se muito promissores em função da maior atividade antioxidante (95% de inibição do radical) ter sido conseguida em concentrações baixas (1,25mg/mL), no extrato BuOH, quando o fungo é cultivado em Meio Sabouraud. Entretanto, em Meio Completo Marinho nenhum extrato foi capaz de inibir 50% dos radicais ABTS<sup>•+</sup> na concentração de 1,25mg/mL.

#### 4.3.1.5 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo *T. terrestre* no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.

A figura 11 mostra a análise de CLAE dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *T. terrestre* cultivado em Meio Sabouraud e Meio Completo Marinho em fase exponencial e estacionária de crescimento.



**Figura 11:** Análise de CLAE dos extratos AcOEt (preto), BuOH (vermelho) e MeOH (azul) obtidos do fungo *T.terrestre* cultivado em Meio Sabouraud por 12 dias (A) e 16 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 3 dias (C) e 5 dias (D).

Observando os cromatogramas A e B referentes aos extratos (AcOEt, BuOH e MeOH) obtidos do fungo *T. terrestre* cultivado em Meio Sabouraud por 12 e 16 dias, respectivamente, vemos que ambos apresentam predominância de substâncias mais polares, sendo que na fase exponencial de crescimento, 12 dias (A), a intensidade dos picos é maior quando comparado à fase estacionária, 16 dias (B). Ainda na fase exponencial (A), observamos que os extratos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH) mostram maior quantidade de picos e maior intensidade dos mesmos quando comparados ao extrato obtido do micélio (MeOH). Essa diferença

no perfil químico dos extratos do meio de cultivo e do micélio é refletida na atividade antioxidante, onde os extratos AcOEt e BuOH inibem cerca de 60% do radical ABTS<sup>•+</sup> na concentração de 1,25mg/mL, enquanto o extrato MeOH inibe apenas 20% do radical na mesma concentração. Em relação os extratos do meio de cultivo, (cromatograma A), apesar do extrato BuOH mostrar picos de maior intensidade comparados aos picos do extrato AcOEt, não há diferença significativa quanto à atividade antioxidante dos extratos BuOH e AcOEt, uma vez que ambos apresentam cerca de 60% de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>, como mostrado no gráfico 8. O inverso é observado nos extratos em fase estacionária de crescimento 16 dias, (cromatograma B), pois apesar dos extratos AcOEt e BuOH, mostrarem pouca diferença no perfil químico, existe uma diferença quanto á atividade antioxidante, 30% e 95%, respectivamente, gráfico 8. Assim, apesar dos extratos obtidos em fase exponencial – 12 dias, (cromatograma A), mostrarem maior intensidade dos picos em relação aos extratos obtidos em fase estacionária – 16 dias (cromatograma B), quando relacionamos a atividade antioxidante percebemos que o extrato de maior potencial (95%) é obtido em fase estacionária.

Em Meio Completo Marinho, fase exponencial de crescimento – 3 dias, (cromatograma C), os extratos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH) apresentam picos de maior intensidade quando comparados ao extrato MeOH, entretanto, em fase estacionaria - 5 dias (cromatograma D), observamos pouca diferença no perfil químico dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH. Quando analisamos o teste antioxidante (gráfico 9), vemos que em fase exponencial, os extratos AcOEt e BuOH, a partir da concentração de 2,5 mg/mL, apresentam maior inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>, enquanto em fase estacionária, o extrato MeOH mostra maior atividade.

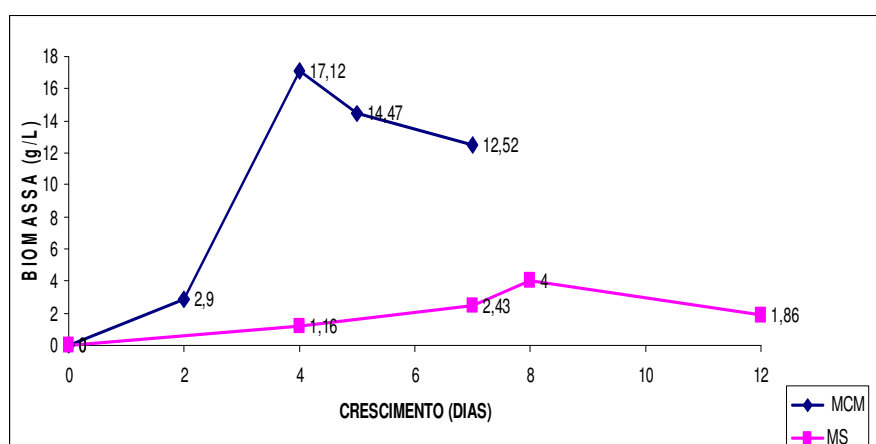
Deste modo, podemos concluir que o perfil químico dos extratos brutos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *T. terrestris* cultivado em Meio Completo Marinho difere dos extratos obtidos em Meio Sabouraud, assim como, a atividade antioxidante. (Gráfico 8 e 9).

### **4.3.2 *Aspergillus niger***

#### **4.3.2.1 Influência do tempo de extração na capacidade antioxidante dos compostos obtidos do fungo *Aspergillus niger*.**

Primeiramente avaliamos a influência do tempo de extração na obtenção dos compostos antioxidantes obtidos em fase estacionária e exponencial de

crescimento. A cinética de crescimento do o fungo *Aspergillus niger* (Gráfico 10) mostra que o início da fase estacionária ocorre com 4 e 8 dias, respectivamente, para os Meio Completo Marinho (MCM) e o Meio Sabourand (MS), sendo que neste meio o crescimento do fungo corresponde a 10% daquele observado em MCM.

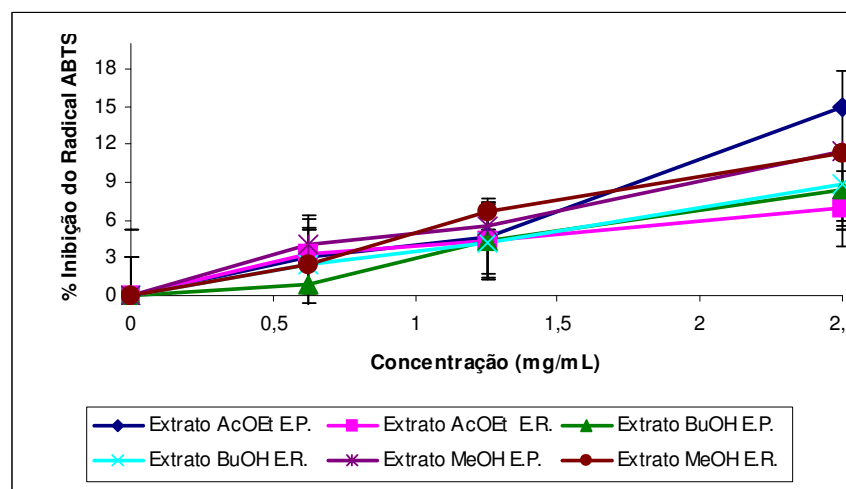


**Gráfico 10:** Cinética de Crescimento do fungo *Aspergillus niger* em Meio Sabourand (MS) e Meio Completo Marinho (MCM).

O gráfico 11 mostra a atividade antioxidante dos extratos obtidos pelas metodologias de extração rápida e prolongada durante a fase de crescimento exponencial (7 dias) do fungo *Aspergillus niger* cultivado em Meio Sabouraud.

Analisando os resultados referentes à concentração de 1,25 mg/mL verificamos que não há efeito do tempo de extração na capacidade antioxidante dos diferentes extratos AcOEt, BuOH e MeOH.

Por outro com os resultados obtidos na concentração de 2,5mg/mL, podemos observar que o extrato AcOEt obtido por extração prolongada ( $IC_{50}=8,6\text{mg/mL}$ ) exibiu uma inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  maior (em torno de 15%) em relação ao mesmo extrato (AcOEt) obtido com extração rápida ( $IC_{50}=19,0\text{mg/mL}$ ), o qual foi aproximadamente 7%. A análise de variância, tabela 18-apêndice, indica que esta diferença é significativa, pois o  $F$  calculado (15,24) é maior que o  $F$  crítico (7,71) e, portanto, a extração prolongada mostrou-se mais eficiente que a extração rápida na obtenção de compostos com atividade antioxidante.

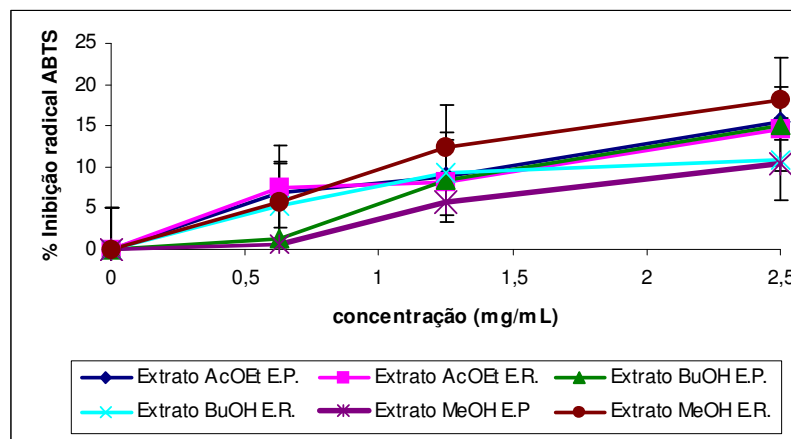


**Gráfico 11:** Porcentagem de Inibição do Radical  $ABTS^{*+}$  em relação ao tempo de extração prolongado (EP) e rápido (ER) dos compostos antioxidantes do fungo *A.niger* cultivado em Meio Sabouraud em fase exponencial de crescimento (7 dias).

Para o extrato BuOH a porcentagem de inibição do radical foram praticamente a mesma, na concentração de 2,5 mg/mL, 8,5% e 8,9%, respectivamente, para as extrações prolongada ( $IC_{50}=14,2\text{mg/mL}$ ) e rápida ( $IC_{50}=14,2\text{mg/mL}$ ) (gráfico 11). A tabela 19-apêndice, mostra a análise de variância, cujos valores de  $F$  calculado (2,20) e  $F$  crítico (7,71) indicam que a diferença não é significativa.

O mesmo comportamento foi observado para o extrato MeOH (Gráfico 11), cuja porcentagem de inibição do radical  $ABTS^{*+}$  foi aproximadamente 11% na concentração de 2,5 mg/mL, para ambas metodologias de extração, apresentando um  $IC_{50}=10,8\text{mg/mL}$  para a extração rápida e  $IC_{50}=11,3\text{mg/mL}$ , para extração prolongada. Portanto, pelos resultados obtidos podemos considerar que o tempo de extração não afetou a atividade antioxidante nos extratos BuOH e MeOH, porém para o extrato AcOEt o tempo de extração prolongado mostrou-se mais apropriado, pois a atividade antioxidante foi o dobro comparado com o extrato obtido por extração rápida.

O gráfico 12 mostra a influência do tempo de extração na atividade antioxidante dos extratos obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em meio Sabouraud, após 10 dias de crescimento (Fase Estacionária).



**Gráfico 12:** Porcentagem de Inibição do Radical  $ABTS^{*+}$  em relação ao tempo de extração dos compostos antioxidantes obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus niger* por 10 dias em meio Sabouraud.

O extrato metanólico obtido por extração rápida ( $IC_{50}=6,7\text{mg/mL}$ ) apresentou maior capacidade de inibição do radical  $ABTS^{*+}$ , cerca de 18,5% na concentração de 2,5 mg/mL, em comparação ao mesmo extrato obtido por extração prolongada ( $IC_{50}=11,3\text{mg/mL}$ ), cuja inibição foi 10,5%. O mesmo perfil é observado em concentrações mais baixas (1,25 mg/mL) onde a porcentagem de inibição foi de 5,5% e 12,5% para a extração prolongada e rápida, respectivamente. Na análise de variância observamos que o  $F$  calculado (220) é maior que o  $F$  crítico (7,71), indicando que a diferença é significativa entre o tempo de extração (Tabela 20-apêndice).

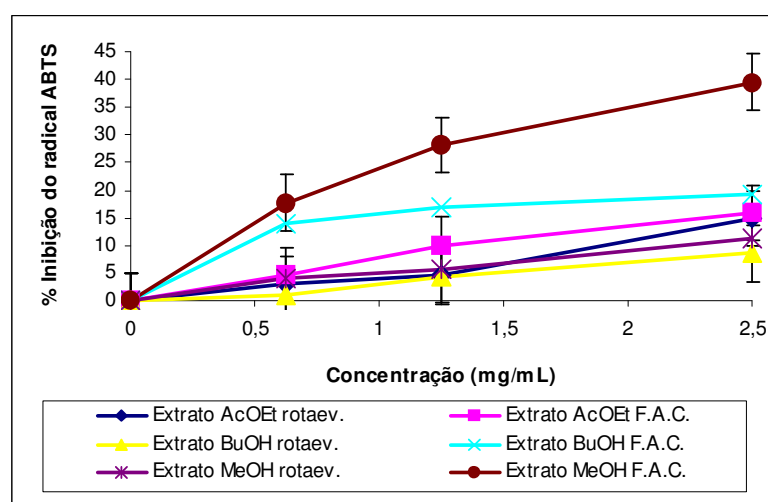
Já para os extratos obtidos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH), na concentração de 1,25mg/mL, não houve diferença na porcentagem de inibição do radical  $ABTS^{*+}$  quanto ao tempo de extração. O extrato AcOEt na concentração de 2,5 mg/mL, apresentou uma inibição do radical  $ABTS^{*+}$  de 14,5% e 15,5%, respectivamente para a extração rápida ( $IC_{50}=9,0\text{mg/mL}$ ) e prolongada ( $IC_{50}=8,3\text{mg/mL}$ ). Entretanto, o extrato BuOH, na concentração de 2,5 mg/mL, mostrou uma capacidade antioxidante maior (15%) quando obtido com extração prolongada ( $IC_{50}=8,0\text{mg/mL}$ ) em relação ao extrato obtido com extração rápida (11%) ( $IC_{50}=11,5\text{mg/mL}$ ). Como  $F$  calculado (38) é maior que o  $F$  crítico (7,71) (tabela 21-apêndice), a análise de variância indica que existe uma diferença

significativa quanto ao tempo de extração, sendo a extração prolongada mais eficiente que a extração rápida.

Assim, para o extrato AcOEt, o tempo de extração não influenciou os compostos com atividade antioxidante, entretanto, para o extrato BuOH o tempo de extração prolongado mostrou-se mais eficaz. Já para o extrato MeOH, o tempo de extração rápido é melhor para obtenção dos compostos com atividade antioxidante.

#### 4.3.2.2 Influência da Temperatura de Evaporação dos Solventes Orgânicos nos Compostos com Capacidade Antioxidante obtidos do fungo *Aspergillus niger*.

No gráfico 13 está a capacidade antioxidante dos extratos obtidos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH) e do micélio (MeOH) do fungo *A.niger* cultivos em Meio Sabouraud por 7 dias, de acordo com a metodologia 1 (capela) e metodologia 2 (rotaevaporador).

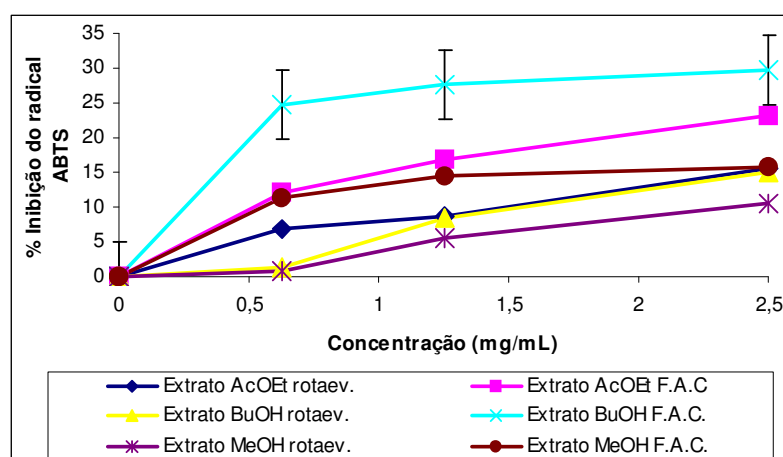


**Gráfico 13:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à temperatura de evaporação dos solventes obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus niger* por 7 dias em Meio Sabouraud.

Observando o gráfico 13 vemos que o extrato metanólico obtido por capela ( $IC_{50}=3,0\text{mg/mL}$ ) apresenta maior inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> quando comparado aos extratos AcOEt ( $IC_{50}=7,7\text{mg/mL}$ ) e BuOH ( $IC_{50}=6,6\text{mg/mL}$ ) obtidos pela mesma metodologia. Na concentração de  $1,25\text{mg/mL}$ , o extrato MeOH (capela), apresentou uma inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> de aproximadamente 28%, enquanto o mesmo extrato utilizando o rotaevaporador inibiu apenas 5,5% ( $IC_{50}=11,3\text{mg/mL}$ ).

O mesmo comportamento é observado para os extratos do meio de cultivo. O AcOEt na concentração de 1,25 mg/mL, apresenta uma capacidade antioxidante de 10% quando utilizamos a evaporação por capela ( $IC_{50}=7,7\text{mg/mL}$ ) e 4,5% com o rotaevaporador ( $IC_{50}=8,6\text{mg/mL}$ ). Já para o extrato BuOH, a diferença é ainda maior, com uma inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  de 17% e 4% em capela ( $IC_{50}=6,6\text{mg/mL}$ ) e rotaevaporador ( $IC_{50}=14,2\text{mg/mL}$ ), respectivamente. A análise de variância para o extrato de AcOEt e BuOH (tabela 23-apêndice) mostra que o  $F$  calculado (91) e (601), respectivamente é maior que o  $F$  crítico (7,71), comprovando que a diferença é significativa entre as porcentagens de inibição na temperatura utilizada na evaporação dos solventes.

O gráfico 14 mostra a influência da temperatura de evaporação dos solventes na fase estacionária de crescimento (10 dias) do fungo *A. niger* cultivado em Meio Sabouraud.



**Gráfico 14:** Porcentagem de Inibição do Radical  $ABTS^{\cdot+}$  em relação à temperatura de evaporação dos solventes dos compostos antioxidantes obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus niger* por 10 dias em meio Sabouraud.

Os extratos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH) e do micélio (MeOH) obtidos por capela apresentam uma capacidade antioxidante maior quando comparados aos extratos obtidos por rotaevaporador. O extrato butanólico na concentração de 0,625 mg/mL, submetido a evaporação por capela ( $IC_{50}=4,0\text{mg/mL}$ ) apresenta uma inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  de 27% quando comparado ao mesmo extrato proveniente do rotaevaporador (1,5%) ( $IC_{50}=8,0\text{mg/mL}$ ). Essa diferença foi considerada significativa entre os extratos BuOH, em todas as concentrações, pela

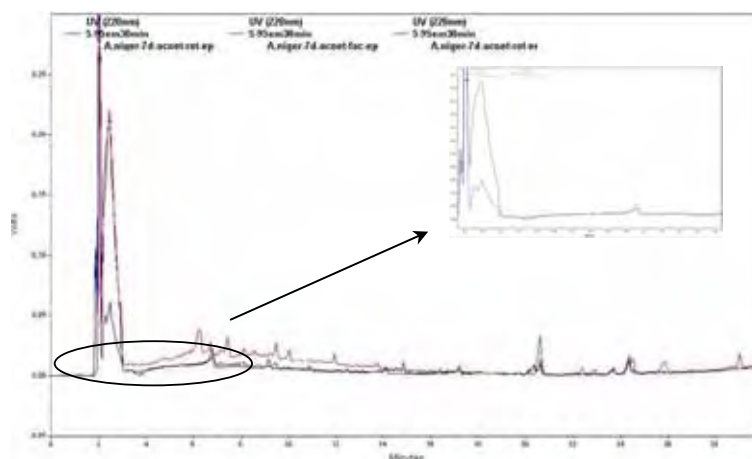
análise de variância, onde  $F$  calculado (310) é maior que o  $F$  crítico (7,71). (Tabela 25-apêndice).

Para os extratos AcOEt obtidos por evaporação em capela ( $IC_{50}=5,4\text{mg/mL}$ ) e rotaevaporador ( $IC_{50}=8,3\text{mg/mL}$ ) temos respectivamente 12% e 6,8% de inibição do radical  $ABTS^{\bullet+}$  na concentração de  $0,625\text{mg/mL}$ . A análise de variância mostra que o  $F$  calculado (48) é maior que o  $F$  crítico (7,71), portanto há diferença significativa quanto á temperatura de extração dos solventes (Tabela 26 –apêndice).

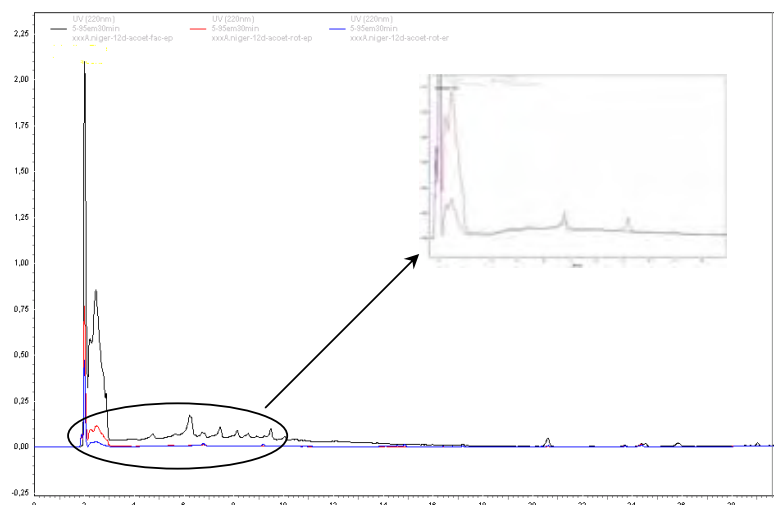
Em relação ao extrato MeOH obtido do micélio, quando utilizamos o rotaevaporador ( $IC_{50}=11,3\text{mg/mL}$ ) a capacidade antioxidante é baixa, já que na concentração de  $0,625\text{mg/mL}$ , a inibição do radical  $ABTS^{\bullet+}$  não atinge 1%; enquanto, sob capela ( $IC_{50}=8,2\text{mg/mL}$ ) essa inibição alcança 11,5% na mesma concentração. Esses resultados mostram que a temperatura de evaporação dos solventes é um fator de extrema importância na obtenção de compostos antioxidantes, independentemente da fase de crescimento do fungo.

#### 4.3.2.3 Perfil de CLAE dos extratos obtidos do fungo *Aspergillus niger*

Os extratos obtidos em diferentes metodologias foram submetidos a análise em CLAE, a fim de verificar o perfil químico e analisar a variedade de substâncias produzidas pelo fungo *A. niger*.



**Figura 12:** Análise de CLAE dos extratos AcOEt obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 7 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(vermelho); metodologia 2-Rotaev/EP (preto) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul).



**Figura 13:** Análise de CLAE dos extratos AcOEt obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 10 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (vermelho) e metodologia 3-Rotaev/ER (azul).

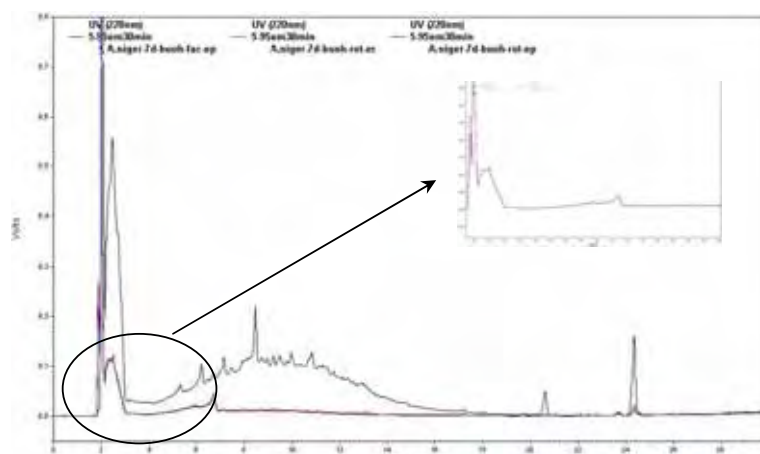
Analisando a figura 12, observamos diferenças entre o perfil químico dos extratos AcOEt (7 dias) obtidos em diferentes metodologias. O extrato com maior capacidade antioxidante (15%) foi obtido de acordo com a metodologia 1 (capela) que corresponde ao traço vermelho no cromatograma, onde o primeiro pico se destaca dos demais atingindo na escala pouco mais que 0,2 AUFS, além de outros picos menores. Quando esse mesmo extrato é exposto a uma temperatura de evaporação mais elevada (rotaevaporador) que a temperatura ambiente (capela), há uma mudança apenas nos picos menores, deste modo, podemos pressupor que são substâncias com baixo ponto de ebulição. Como no teste antioxidante foi observada uma diferença significativa entre os extratos obtidos a temperatura ambiente em capela e rotaevaporador a 50-55°C, 15% e 7%, respectivamente, e o cromatograma mostra uma diferença apenas na região que compreende tempos maiores de eluição (menores picos), podemos pressupor que as substâncias com capacidade antioxidante estão representadas por estes materiais. Quando analisamos o tempo de extração prolongado e rápido, há uma diferença significativa na atividade antioxidante, sendo a extração prolongada mais eficiente. Já o cromatograma mostra apenas uma diferença no primeiro pico, pois na extração prolongada (preto) a escala mostra mais de 0,2 AUFS, enquanto para a extração rápida (azul), o mesmo pico alcança pouco mais de 0,05. Portanto, esse pico também pode ser o

responsável pela atividade antioxidante. Assim, percebemos que vários picos podem conter os materiais responsáveis pela atividade antioxidante observada nos extratos AcOEt.

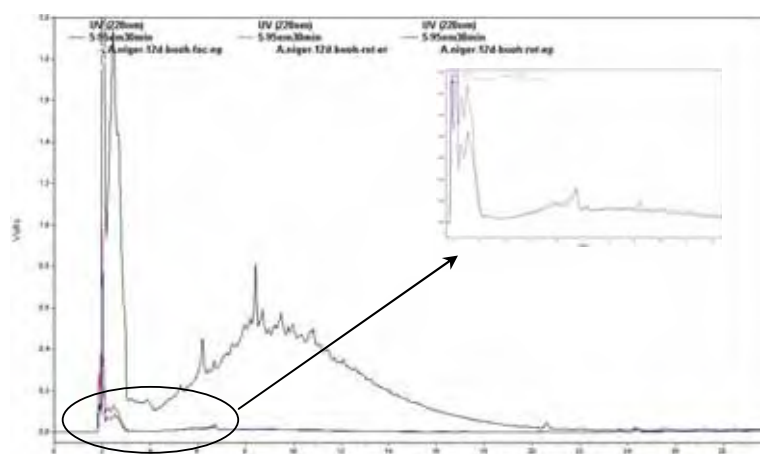
Os extratos AcOEt referentes a fase estacionária (figura 13) mostram uma grande diferença quando comparamos as temperaturas de evaporação utilizadas (capela e rotaevaporador). O extrato que é submetido a capela (preto) apresenta vários picos de grande intensidade, enquanto aquele extrato que foi submetido ao rotaevaporador (vermelho) não apresenta picos significantes. Novamente podemos concluir que essas são substâncias com baixo ponto de ebulição e por essa razão evaporam quando é submetido ao rotaevaporador. Provavelmente o(s) composto(s) que apresentam capacidade antioxidante faz parte dessas substâncias com baixo ponto de ebulição, uma vez que os extratos provenientes de capela e do rotaevaporador apresentaram, respectivamente 23% e 6% de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> (Gráfico 14). Em relação ao tempo de extração dos compostos antioxidantes obtidos em fase estacionária de crescimento (Figura 13), não observamos diferença no perfil químico entre o tempo de extração prolongado e rápido. Este resultado é confirmado pela atividade antioxidante do extrato AcOEt, que na concentração de 2,5 mg/mL, em fase estacionária de crescimento (10 dias), apresentou uma inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> de 14,5% e 15,5%, respectivamente para a extração rápida e prolongada (Gráfico 12).

Pelas figuras 12 e 13, observamos que o extrato AcOEt obtido em capela apresentam uma grande diferença no perfil químico em relação ao tempo de cultivo. O extrato AcOEt obtido após 10 dias de cultivo apresenta picos com intensidade bem maiores quando comparado ao mesmo extrato obtido com 7 dias de cultivo. Estes extratos também apresentam diferenças na atividade antioxidante com 21% de inibição para o extrato AcOEt com 7 dias e 31% para o extrato com 10 dias. Dessa forma, a atividade antioxidante pode estar relacionada com essa diferença no perfil cromatográfico, já que o extrato que apresentou maior intensidade dos picos mostrou maior capacidade antioxidante.

A figura 14 mostra o cromatograma do extrato BuOH obtido do fungo *A. niger* cultivado em meio Sabouraud por 7 dias extraído com diferentes metodologias, enquanto a figura 18 mostra o mesmo extrato, porém obtido com 10 dias de cultivo.



**Figura 14:** Análise de CLAE dos extratos BuOH obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 7 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (vermelho).



**Figura 15:** Análise de CLAE dos extratos BuOH obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 10 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (vermelho).

Comparando o extrato BuOH obtido em fase estacionária e em fase exponencial, observamos que os perfis químicos são muito semelhantes, existe uma diferença quanto a intensidade dos picos, uma vez que o extrato BuOH obtido em capela da fase estacionária (figura 15) apresenta picos mais intensos quando comparado ao mesmo extrato obtido em fase exponencial.

Analisando a atividade antioxidante do extrato BuOH obtido por capela (metodologia 1) em 7 e 10 dias, vemos (gráficos 12 e 13), na concentração de 2,5 mg/mL, uma porcentagem de inibição do radical  $ABTS^{*+}$  de 19% e 30%,

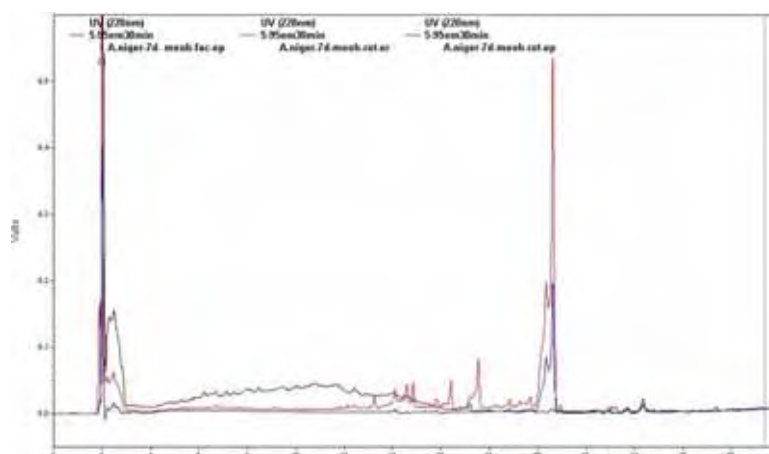
respectivamente. Como o perfil cromatográfico em 10 dias apresenta uma maior quantidade de material (picos mais intensos), podemos pressupor que o(s) composto(s) presente(s) no cromatograma são os responsáveis pela capacidade antioxidante do extrato .

Analisando a figura 14, referente ao extrato da fase exponencial, quanto aos diferentes métodos empregados na obtenção dos extratos, observamos que não há diferença entre o tempo de extração prolongado (azul) e rápido (vermelho), uma vez que o perfil químico do extrato BuOH é exatamente o mesmo. Isto está de acordo com os resultados referentes à atividade antioxidante, pois para ambas condições a inibição foi cerca de 8%. Entretanto, há uma grande diferença quando comparamos a temperatura de evaporação, sendo que o extrato BuOH obtido em capela (preto) mostra uma quantidade de compostos extraídos muito maior que o mesmo extrato submetido ao rotaevaporador (azul). Provavelmente os compostos extraídos do fungo *A. niger* apresentam baixo ponto de ebulição e dessa forma, não é aconselhável a utilização do rotaevaporador. O perfil obtido pode estar correlacionado com a atividade antioxidante, pois enquanto o extrato BuOH obtido em capela inibi 19% do radical ABTS<sup>•+</sup>, o mesmo extrato obtido em rotaevaporador inibi 8%. Essa atividade antioxidante do extrato BuOH obtido em rotaevaporador pode estar relacionada com o primeiro pico de intensidade 0,1, uma vez que não há outros picos significativos no extrato.

Já para o extrato BuOH obtido da fase estacionária de crescimento do fungo (10 dias), gráfico 14, a análise de variância da atividade antioxidante mostrou uma diferença significativa quanto ao tempo de extração utilizado, sendo o tempo prolongado (15%) melhor que o tempo de extração rápido (11%). Observando o cromatograma (figura 15), vemos que o perfil químico entre o tempo de extração prolongado (azul) e o tempo de extração rápido (vermelho) é muito semelhante, havendo apenas uma pequena diferença na intensidade do primeiro pico, contudo, o pico mais elevado diz respeito à extração rápida que não mostrou melhor atividade. Assim, não conseguimos estabelecer relação entre o perfil químico observado e a atividade antioxidante. Por outro lado, o extrato BuOH obtido em capela mostra uma quantidade muito maior de compostos quando comparado ao obtido em rotaevaporador. O baixo ponto de ebulição dos compostos deve ser a explicação para isso. Quanto a atividade antioxidante, o extrato BuOH obtido em capela

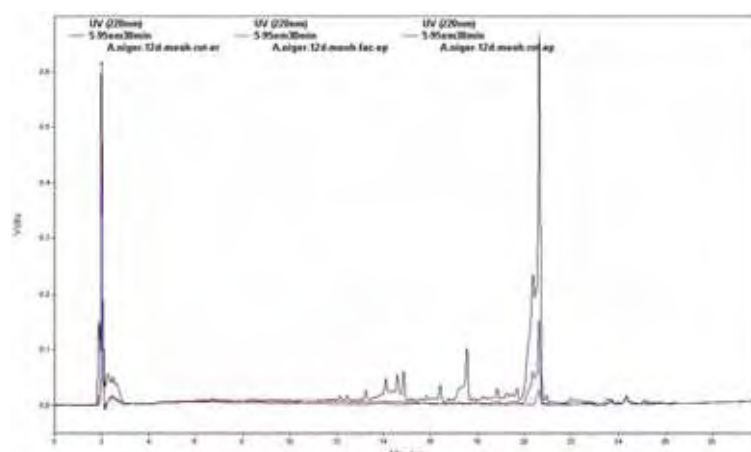
apresentou o dobro (30%) da atividade antioxidante observada no extrato obtido em rotaevaporador (15%), levando a conclusão que os compostos evaporados quando utilizamos o rotaevaporador, contribuem para a atividade antioxidante, tal como ocorre com os extratos referentes a fase exponencial de crescimento do fungo (7 dias) (Figura 14).

Os extratos obtidos do micélio (MeOH), figura 16 e 17, apresentam um perfil químico diferente dos extrato obtidos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH). Pois estes mostraram maior quantidade de substâncias polares, enquanto o extrato metanólico apresenta grande quantidade de substancias menos polar, como podemos observar na figura 16.



**Figura 16:** Análise de CLAE dos extratos MeOH obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 7 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(preto); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (vermelho).

Comparando os extratos MeOH referentes a fase exponencial (7dias) e a fase estacionaria (10 dias), observamos duas diferenças: 1) a intensidade do primeiro pico é maior com 7 dias de cultivo (figura 19) em relação à fase estacionária (10 dias) (Figura 17) e, 2) o extrato obtido em 10 dias (figura 17) não apresenta picos na região de 4 a 12 minutos. Entretanto, a fração menos polar 13 a 22 minutos é muito semelhante nos dois perfis. Essa diferença entre os extratos parece estar relacionada com a capacidade antioxidante, uma vez que o extrato MeOH obtido com 7 dias de cultivo em capela apresenta 56% de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> e o mesmo extrato em fase estacionária (10 dias) mostra apenas uma inibição de 15% , ambos em 2,5 mg/mL.



**Figura 17:** Análise de CLAE dos extratos MeOH obtidos após cultivo do fungo *A. niger* em Meio Sabouraud por 10 dias usando a Metodologia 1-capela/EP(vermelho); metodologia 2-Rotaev/EP (azul) e metodologia 3-Rotaev/ER (preto).

Diante disso, podemos pressupor que os compostos mais polares são os responsáveis pela capacidade antioxidante dos extratos MeOH.

Na figura 17 observamos uma pequena diferença no perfil químico do extrato MeOH em relação ao tempo de extração prolongado (azul) e rápido (vermelho), sendo que a extração rápida mostra uma intensidade maior no primeiro pico e a presença de compostos menos polar, que a extração prolongada (azul) não apresenta. No entanto, estes resultados parecem não estar relacionado com a capacidade antioxidante, pois ambos extratos inibem 11% do radical  $ABTS^{*\cdot}$ . Quando comparamos os extratos obtidos em diferentes temperaturas de evaporação dos solventes, observamos que o extrato MeOH obtido em capela (preto) em fase exponencial de crescimento (Figura 16), mostra uma intensidade maior do primeiro pico, além de uma serie de picos que estão entre 4 e 16 minutos, o que não ocorre no mesmo extrato obtido em rotaevaporador (azul). O fato desses picos menores compreendidos entre 4 e 16 minutos sumirem no extrato MeOH obtido em rotaevaporador, pode estar relacionado ao baixo ponto de ebulição desses compostos. É provável que esses compostos e/ou os compostos do primeiro pico estejam relacionados com a atividade antioxidante, pois o extrato MeOH obtido em capela inibiu 39% dos radicais  $ABTS^{*\cdot}$ , quanto o extrato obtido em rotaevaporador inibiu apenas 12% (Gráfico 13).

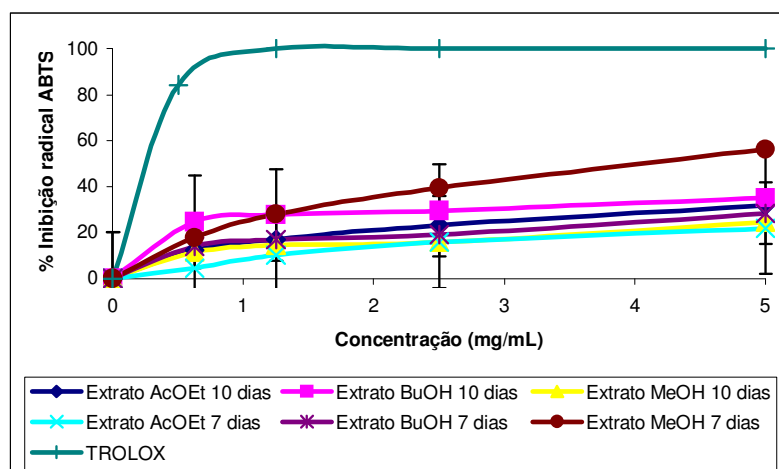
A análise do extrato MeOH obtido do fungo *A. niger* com 10 dias de cultivo em meio Sabouraud mostra diferença entre o tempo de extração dos metabólitos Figura

17, a extração rápida (preto) apresenta maior quantidade de compostos, principalmente na região menos polar, quando comparamos com a extração prolongada (azul). Isso pode ocorrer porque a extração prolongada pode levar a oxidação e/ou decomposição desses compostos. Este perfil parece estar relacionado com a atividade antioxidante, pois a extração rápida (18,5%) apresentou uma inibição de 18,5%, enquanto a extração prolongada (10,5%). Provavelmente há compostos com atividade antioxidante no primeiro pico, que apresenta intensidade maior na extração rápida, e/ou há compostos menos polar com capacidade antioxidante. Quando observamos a temperatura de evaporação dos solventes percebemos que a capacidade antioxidante do extrato MeOH em capela (capela – vermelho) é maior (15%) quando comparado ao extrato obtido em rotaevaporador (10%) (azul). Como ambos apresentam a mesma intensidade do primeiro pico, podemos presumir que essa diferença na atividade antioxidante está nos pequenos picos que aparecem entre 4 e 12 minutos aproximadamente, pois, eles são maiores no extrato MeOH obtido em capela.

Diante de todos os resultados, escolhemos trabalhar com a metodologia 1, ou seja, tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, a fim de analisar a influência das condições de cultivo: fase de crescimento (exponencial e estacionária) e de cultivo (Meio Sabouraud e Meio Completo Marinho) para obtenção de substâncias com atividade antioxidante.

#### **4.3.2.4 Avaliação da capacidade antioxidante do fungo *A. niger* em diferentes condições de cultivo.**

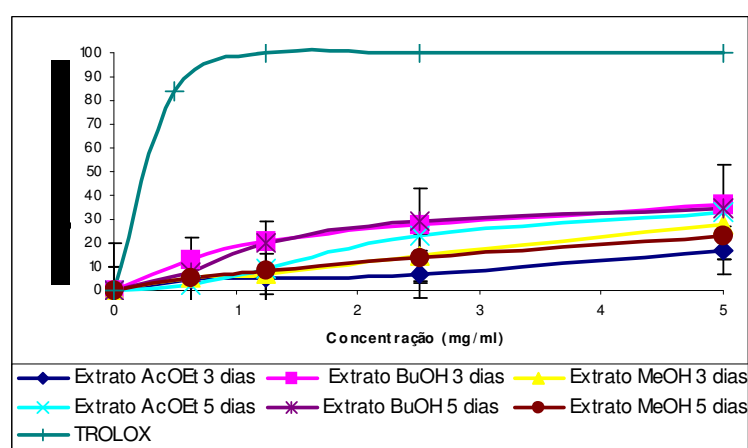
Analisando o gráfico 15, verificamos que, na concentração de 1,25mg/mL, há pouca diferença na porcentagem de inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  quando comparamos os extratos do meio de cultivo (BuOH e AcOEt) e micelial (MeOH). Considerando a maior concentração (5,0mg/mL), nenhum extrato foi capaz de inibir 100% do radical  $ABTS^{\cdot+}$ , sendo que o extrato que mostrou maior inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  foi o MeOH, após 7 dias de cultivo, atingindo 56% nesta concentração, pois, a análise de variância mostrou diferença significativa entre este e o extrato BuOH 10 dias, onde  $F_{calculado}$  (465) é maior que  $F_{crítico}$  (7,71).



**Gráfico 15:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus niger* por 7 e 10 dias em Meio Sabouraud.

Em relação ao tempo de crescimento, o extrato MeOH, obtido após 10 dias de cultivo, mostrou uma inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> menor que o do extrato MeOH de 7 dias, respectivamente 24% e 56%, na concentração de 5,0mg/mL. Deste modo, as substâncias com capacidade antioxidante estão sendo produzidas durante a fase exponencial, que corresponde ao tempo de 7 dias de cultivo.

A análise da capacidade antioxidante do fungo *A. niger* também foi realizada em Meio Completo Marinho, cujos resultados estão mostrados no gráfico 16.



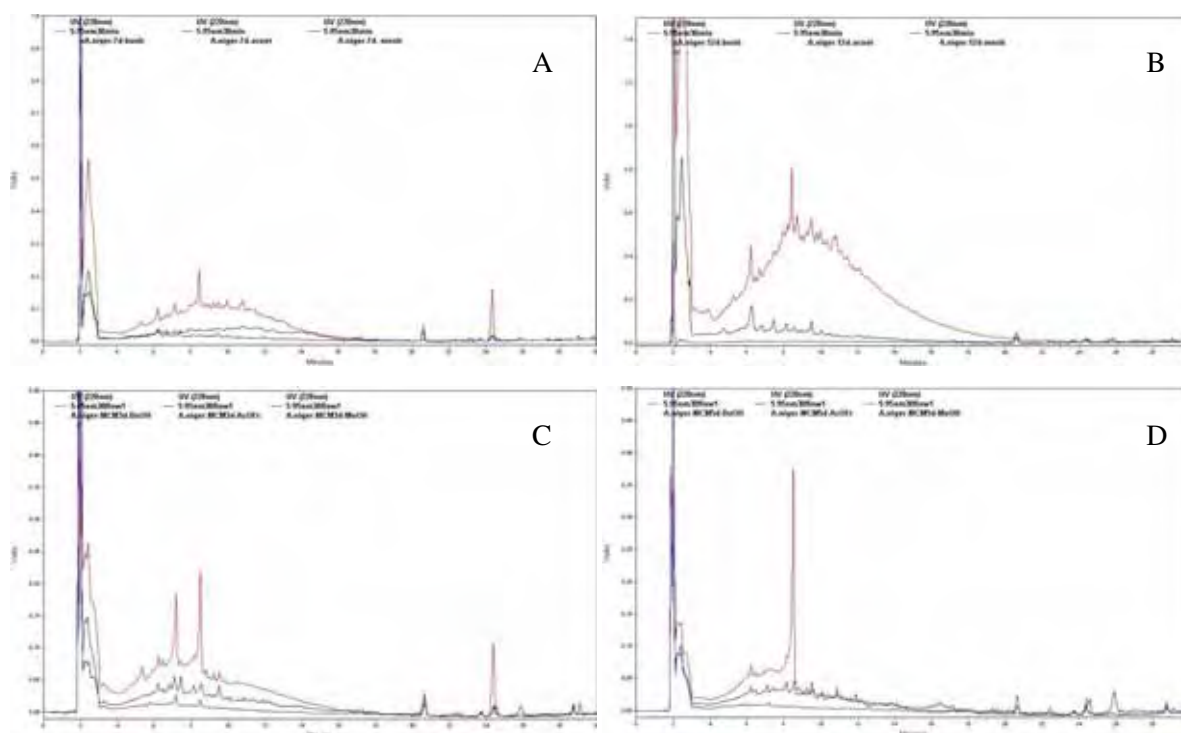
**Gráfico 16:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus niger* por 3 e 5 dias em Meio Completo Marinho.

Em Meio Completo Marinho, os extratos obtidos do meio de cultura (AcOEt e BuOH) apresentam maior porcentagem de inibição do radical comparado ao extrato do micélio (MeOH). Entre os extratos do meio de cultivo, na concentração de 5,0

mg/mL, o de AcOEt, após 5 dias de cultivo, inibe 33% do radical enquanto que o mesmo extrato, no tempo de 3 dias, a inibição foi de 17%. Isto mostra que os extratos obtidos durante a fase estacionária (5 dias) tem maior capacidade antioxidante que aqueles da fase exponencial (3 dias). No entanto, independente das condições de cultivo, este fungo não apresentou potencial para obtenção de substâncias antioxidantes.

#### 4.3.2.5 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo *A. niger* no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.

Na figura 18 estão os cromatogramas dos extratos brutos de AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *A. niger* cultivado em Meio Sabouraud por 7 e 10 dias e em Meio Completo Marinho por 3 e 5 dias.



**Figura 18:** Análise de CLAE dos extratos AcOEt (preto), BuOH (vermelho) e MeOH (azul) obtidos do fungo *A. niger* cultivado em Meio Sabouraud por 7 dias (A) e 10 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 3 dias (C) e 5 dias (D).

Comparando os cromatogramas A e B referentes aos extratos obtidos do fungo *A.niger* cultivado em Meio Sabouraud por 12 e 16 dias, respectivamente, podemos observar há diferenças no perfil químico dos extratos AcOEt, BuOH e

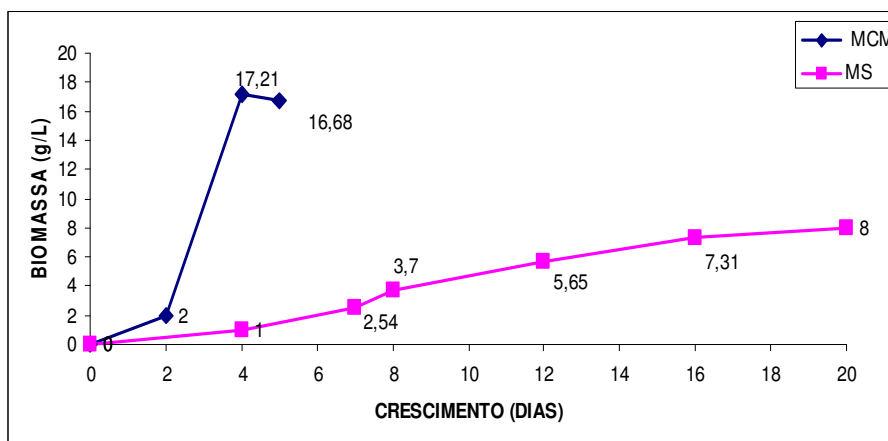
MeOH. Uma semelhança entre os cromatogramas A e B, está no extrato BuOH (vermelho) que apresenta picos de maior intensidade quando comparado aos extratos AcOEt e MeOH, independentemente do tempo de crescimento (12 e 16 dias). Entretanto, o extrato BuOH obtido em fase estacionária (B) mostra picos de maior intensidade quando comparado ao mesmo extrato obtido em fase exponencial (A). Quanto á atividade antioxidante (Gráfico 15), observamos que na concentração de 5,0mg/mL, o extrato BuOH obtido com 12 e 16 dias de crescimento, inibem 30% do radical ABTS<sup>•+</sup>.

O extrato MeOH (azul) apresenta menor quantidade de picos quando comparado aos extratos de AcOEt e BuOH, independentemente do tempo de cultivo (12 ou 16 dias), mas quando observamos o gráfico 15, vemos que em fase exponencial de crescimento (16 dias) o extrato MeOH, na concentração de 5,0mg/mL, inibi 56% do radical ABTS<sup>•+</sup>, enquanto que os outros extratos apresentam um máximo de 30% de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>, com 12 e 16 dias de crescimento.

Os extratos obtidos em Meio Completo Marinho com 3 e 5 dias de crescimento estão representados nos cromatogramas C e D, respectivamente. Maior quantidade de substâncias mais polares podem ser observadas em ambos os cromatogramas, sendo que o extrato BuOH (vermelho) apresenta maior intensidade dos picos, comparado com os extratos AcOEt e MeOH, independentemente da fase de crescimento. Em relação à atividade antioxidante dos extratos obtidos em fase exponencial – 3 dias, vemos que o extrato BuOH inibe 36% do radical ABTS<sup>•+</sup>, o extrato MeOH 28%, e o extrato AcOEt inibe 17% (Gráfico 16). Observando o cromatograma C, referentes aos extratos obtidos em fase exponencial, vemos que o primeiro pico, que está entre 2 e 3 minutos, mostra maior intensidade no extrato BuOH (0,26), seguido do extrato MeOH (0,15) e por último do AcOEt (0,08). Para os extratos obtidos em fase estacionária – 5 dias, o cromatograma D mostra diferenças no perfil químico entre AcOEt, BuOH e MeOH, sendo que o extrato BuOH é o único que apresenta um pico de intensidade 0,40 próximo ao tempo de 8 minutos. Também observamos que após o extrato BuOH, os picos de maior intensidade são do extrato AcOEt, seguido do extrato MeOH. Na atividade antioxidante, o extrato BuOH inibe 35% do radical ABTS<sup>•+</sup>, seguido do extrato AcOEt (33%) e do extrato MeOH (22%) Gráfico 16.

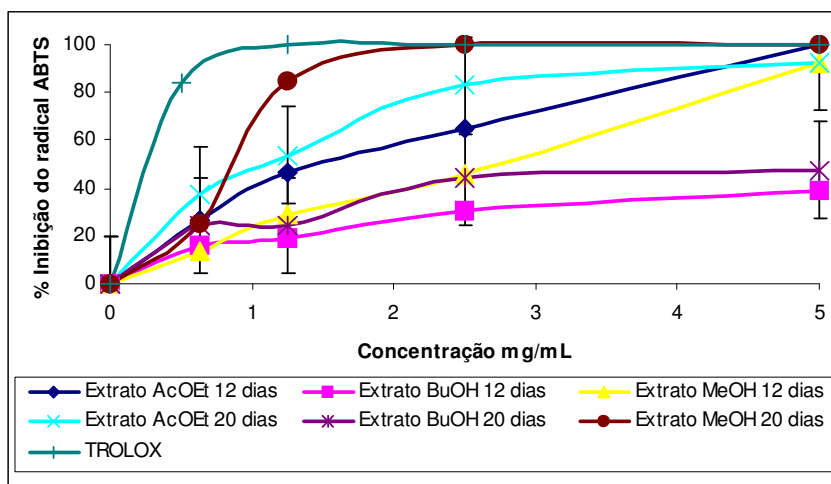
### 4.3.3 *Aspergillus versicolor*

Como mostrado no gráfico 17, quando o fungo *Aspergillus versicolor* foi cultivado em Meio Sabouraud a fase estacionária de crescimento iniciou-se somente após 16 dias enquanto que no Meio Completo Marinho esta fase foi alcançada 5 dias, sendo que o fungo produziu maior biomassa em MCM que em MS.



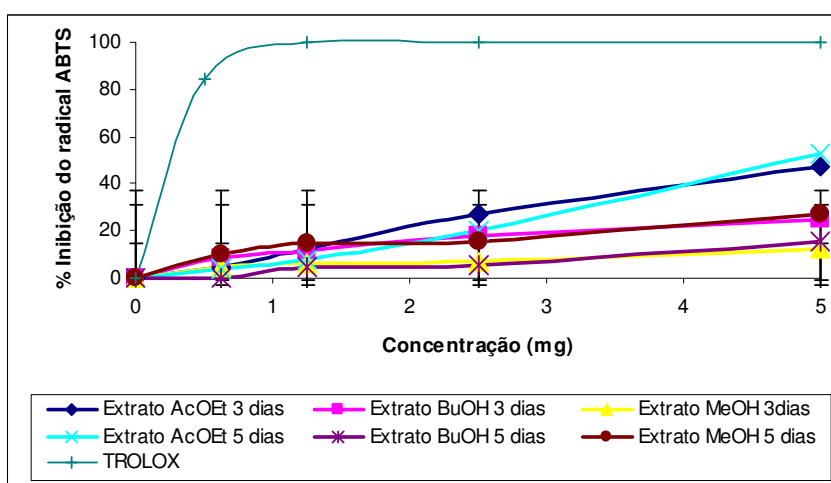
**Gráfico 17:** Cinética de Crescimento do fungo *Aspergillus versicolor* em Meio Sabouraud e Meio Completo Marinho.

No extrato MeOH, obtidos após 20 dias de cultivo em MS ( $IC_{50}=0,9\text{mg/mL}$ ), observamos um perfil semelhante ao Trolox (Gráfico 18). Em fase estacionária (20 dias de crescimento), o extrato MeOH, apresenta  $IC_{50}=0,9\text{mg/mL}$ , enquanto os extratos de AcOEt e BuOH mostraram um  $IC_{50}$  de 1,1mg/mL e 5,3mg/mL, respectivamente. Estes resultados sugerem que quantidades maiores de substâncias com atividades antioxidantes são encontradas no micélio do que no meio de cultura.



**Gráfico 18:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus versicolor* por 12 e 20 dias em Meio Sabouraud.

Em relação à influência da fase de crescimento, verifica-se que as substâncias com maior capacidade antioxidante estão presentes na fase estacionária, pois o extrato MeOH, obtido após 20 dias de cultivo, o qual corresponde a esta fase, mostrou uma capacidade antioxidante maior quando comparado ao mesmo extrato com 12 dias, correspondendo a fase exponencial. Os valores obtidos na concentração de 1,25mg/mL foram respectivamente 85% e 29%.



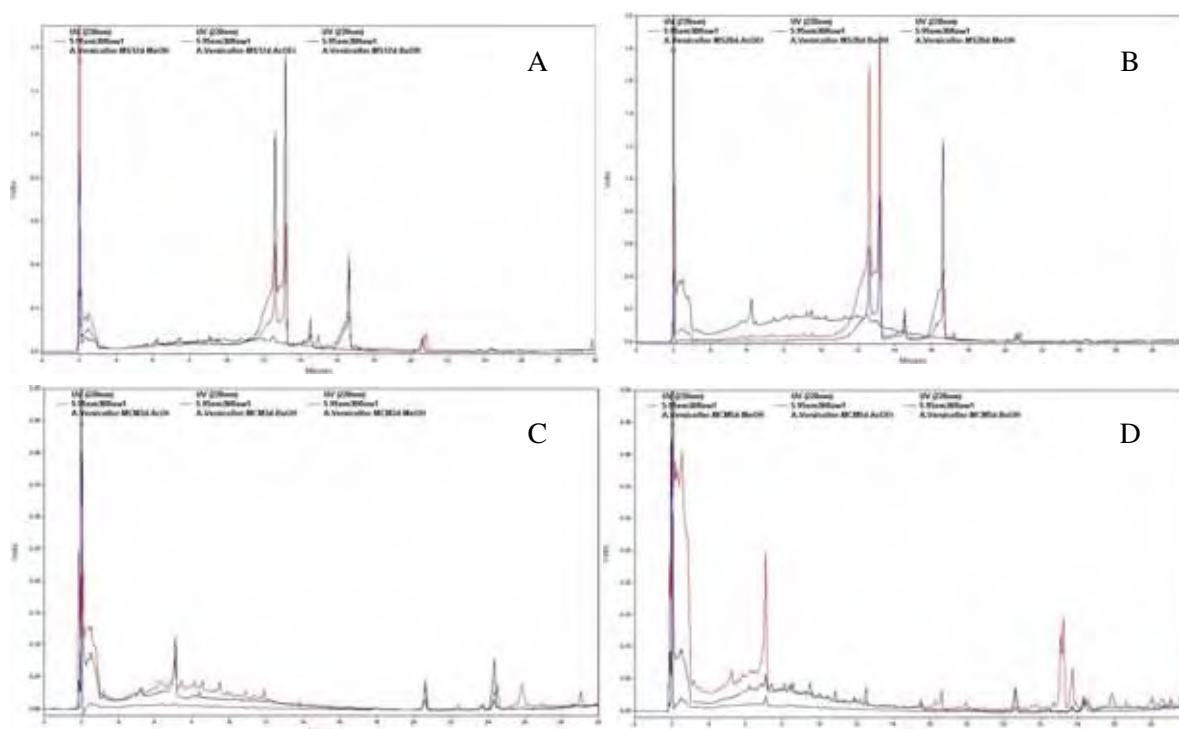
**Gráfico 19:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> pelos extratos obtidos após cultivo do fungo *Aspergillus versicolor* por 3 e 5 dias em Meio Completo Marinho.

De acordo com o gráfico 19, o Meio Completo Marinho parece não apropriado para a produção de metabólitos secundários com atividades antioxidantes, comparado ao meio Sabouraud (Gráfico 18), pois nenhum dos extratos apresentou uma inibição maior que 50%, mesmo na concentração de 5,0mg/mL. Os menores valores de  $IC_{50}$  são dos extratos de AcOEt com 3 e 5 dias de crescimento ( $IC_{50}=5,3\text{mg/mL}$ ).

#### 4.3.3.1 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo *A. versicolor* no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.

A figura 19 mostra o perfil químico dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos a partir do cultivo do fungo *A. versicolor* em Meio Sabouraud por 12 e 20 dias e do cultivo em Meio Completo Marinho por 3 e 5 dias.

Diferentemente dos perfis encontrados nos fungos *A. niger* e *T. terrestre*, os cromatogramas A e B, referentes aos extratos brutos do fungo *A. versicolor* cultivado em Meio Sabouraud por 12 e 20 dias, respectivamente, mostra predominância de substâncias que estão compreendidas entre o tempo de 11 e 18 minutos.



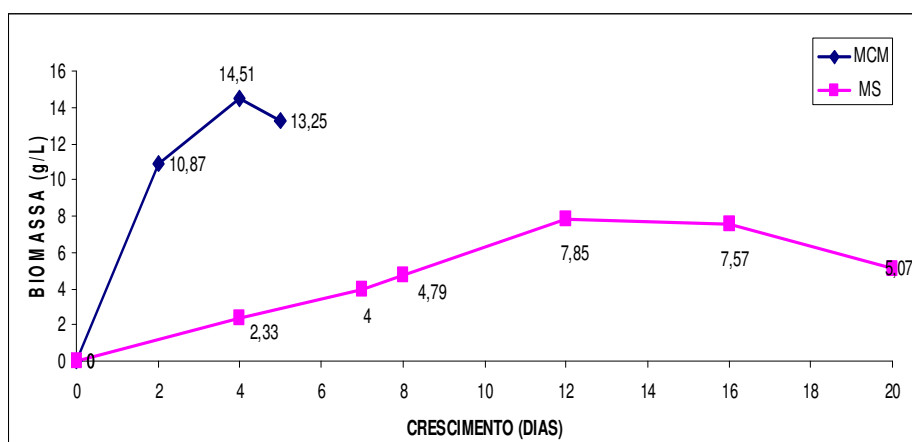
**Figura 19:** Análise de CLAE dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *A. versicolor* cultivado em Meio Sabouraud por 12 dias (A) e 20 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 3 dias (C) e 5 dias (D).

Em ambos os cromatogramas A e B, referentes ao tempo de crescimento de 12 e 20 dias, respectivamente, observamos três picos de destaque: 2 picos estão entre o tempo de 12 a 14 minutos e o outro pico está pouco antes do tempo de 17 minutos. A diferença entre eles está na intensidade, uma vez que os picos do cromatograma B, referente à fase estacionária 20 dias, apresentam maior intensidade. No gráfico 18 vemos que o extrato MeOH 20 dias, na concentração de 1,25mg/mL, inibe 85% do radical ABTS<sup>•+</sup>, atingindo 100% na concentração de 2,5mg/mL. O mesmo extrato, obtido em fase exponencial 12 dias, inibe 29% do radical na mesma concentração. O terceiro pico pode estar relacionado com a atividade antioxidante, uma vez que o extrato MeOH 20 dias ( cromatograma B) atinge uma intensidade de 1,3 enquanto o mesmo extrato com 12 dias (cromatograma A), atinge apenas 0,5. O primeiro e o segundo pico referem-se ao extrato de AcOEt, que apesar da alta intensidade, inibem apenas 46% do radical ABTS<sup>•+</sup> com 12 dias de crescimento e 53% com 20 dias, na concentração de 1,25mg/mL. (Gráfico 18)

As análises de CLAE dos extratos em Meio Completo Marinho estão ilustradas nos cromatogramas C e D. Podemos observar que o perfil químico dos extratos obtidos em Meio Completo Marinho difere do perfil químico dos extratos obtidos em Meio Sabouraud. Os extratos referentes à fase estacionária, 5 dias (D) apresentam picos de maior intensidade quando comparados aos extratos em fase exponencial, 3 dias (C), tendo como destaque o extrato MeOH (vermelho) que apresenta 2 picos mais polares, sendo um no tempo entre 2 e 3 minutos (0,4) e o outro no tempo de 7 minutos (0,25); além de um pico mais apolar no tempo de 23 minutos de intensidade 0,15. O extrato MeOH (5 dias de crescimento) mostra 27% de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> na concentração de 5,0mg/mL (Gráfico 19). Mas, são os extratos AcOEt 3 e 5 dias de crescimento, que apresentam maior inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> (47%), na concentração de 5,0mg/mL, (Gráfico 19),

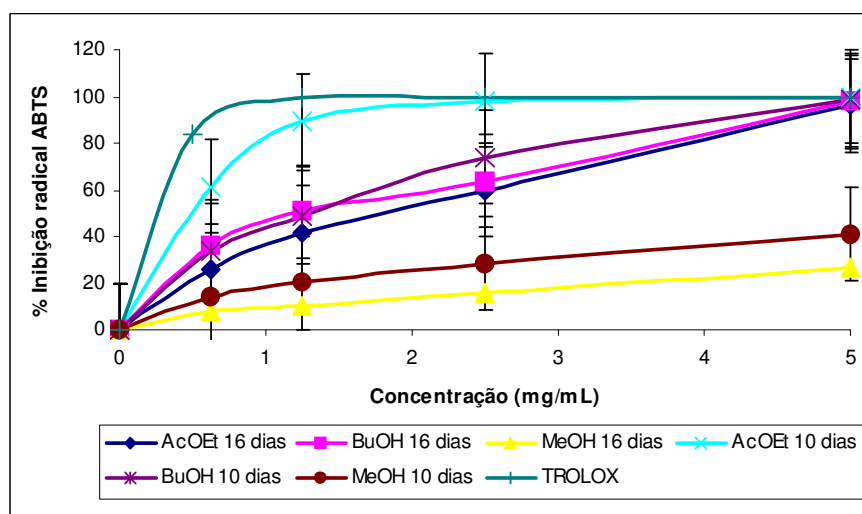
#### **4.3.4 *Penicillium* sp**

A cinética de crescimento do fungo *Penicillium* (gráfico 20) mostrou que a fase estacionária é alcançada com 4 dias, quando o fungo foi cultivado em MCM, e com 12 dias para o cultivo em MS, sendo que neste meio a produção de biomassa foi cerca da metade daquela obtida em MCM nesta fase.



**Gráfico 20:** Cinética de Crescimento do fungo *Penicillium* sp em Meio Sabourand e Meio Completo Marinho.

Analisando a capacidade antioxidante dos extratos obtidos em Meio Sabouraud (Gráfico 20), verifica-se que os extratos provenientes do meio de cultivo (AcOEt e BuOH) mostraram maiores níveis de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> que os extratos obtidos do micélio (MeOH).

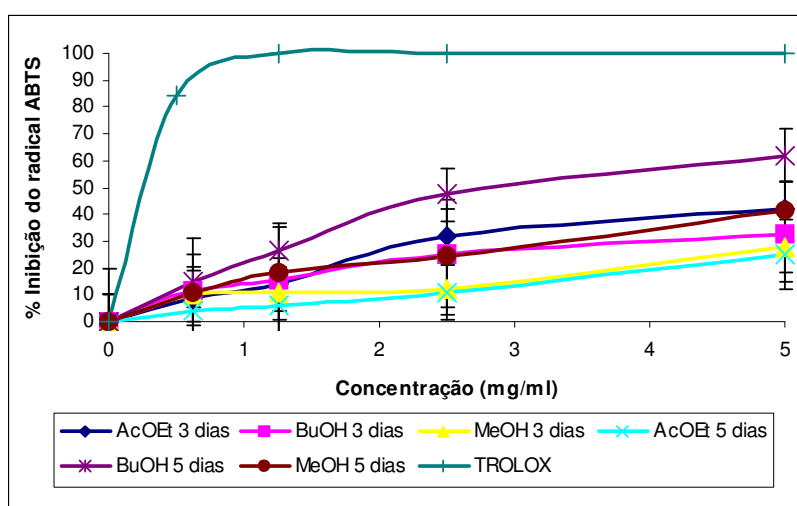


**Gráfico 21:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Penicillium* sp por 10 e 16 dias em Meio Sabouraud.

Entre os extratos obtidos do meio de cultura, o de AcOEt, obtido após 10 dias de crescimento, apresentou a maior capacidade antioxidante, sendo que na concentração de 1,25mg/mL observa-se 90% de inibição do radical, enquanto que o mesmo extrato com 16 dias de cultivo, apresentou apenas 41% de inibição na mesma concentração. Estes resultados indicam que o fungo *Penicillium* sp durante a

fase exponencial de crescimento, que corresponde ao período de 10 dias de cultivo, mostra substâncias com maior capacidade antioxidante ( $IC_{50}=0,56\text{mg/mL}$ ), comparado ao extrato de 16 dias, quando é alcançada a fase estacionária, ( $IC_{50}=1,8\text{mg/mL}$ ).

Para os extratos obtidos em Meio Completo Marinho (Gráfico 22), nenhum deles apresentou 100% de inibição do radical  $ABTS^{\bullet+}$ , mesmo na concentração de  $5,0\text{mg/mL}$ . Desta forma, diferentemente do MS, os extratos provenientes do MCM não apresentam uma capacidade antioxidante considerável, ou seja, um perfil semelhante ao Trolox.

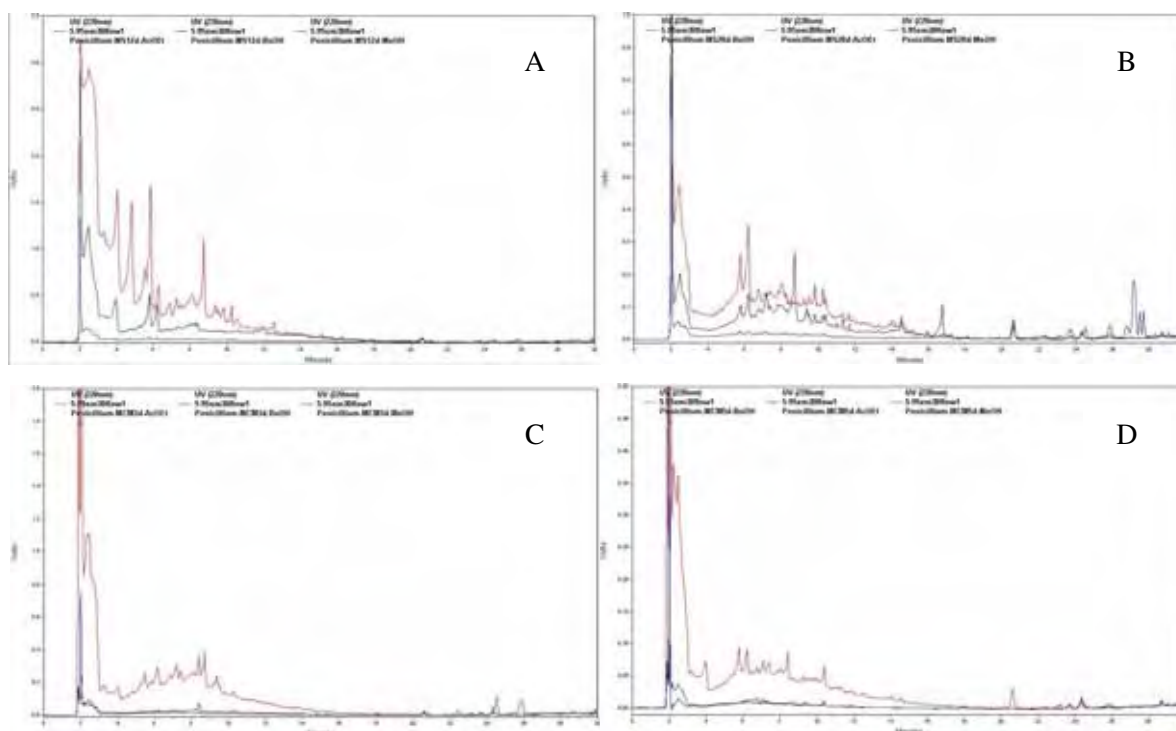


**Gráfico 22:** Porcentagem de Inibição do Radical  $ABTS^{\bullet+}$  em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Penicillium* sp por 3 e 5 dias em Meio Completo Marinho.

Dentre os extratos analisados, o BuOH, após 5 dias de crescimento, exibiu a maior inibição do radical  $ABTS^{\bullet+}$ , cerca de 62% na concentração de  $5,0\text{mg/mL}$  ( $IC_{50}=2,5\text{mg/mL}$ ). Comparando este resultado com o tempo de 3 dias de cultivo, observa-se uma menor inibição do radical (32%) ( $IC_{50}=7,4\text{mg/mL}$ ). Sendo que estes tempos correspondem, respectivamente, às fases estacionária e exponencial de crescimento do *Penicillium* (como mostrado no gráfico 22).

#### 4.3.4.1 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo *Penicillium* sp no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.

Na figura 20 estão os cromatogramas dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *Penicillium* sp cultivado em Meio Sabouraud por 10 e 16 dias e cultivado em Meio Completo Marinho por 3 e 5 dias.



**Figura 20:** Análise de CLAE dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *Penicillium* sp cultivado em Meio Sabouraud por 10 dias (A) e 16 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 3 dias (C) e 5 dias (D).

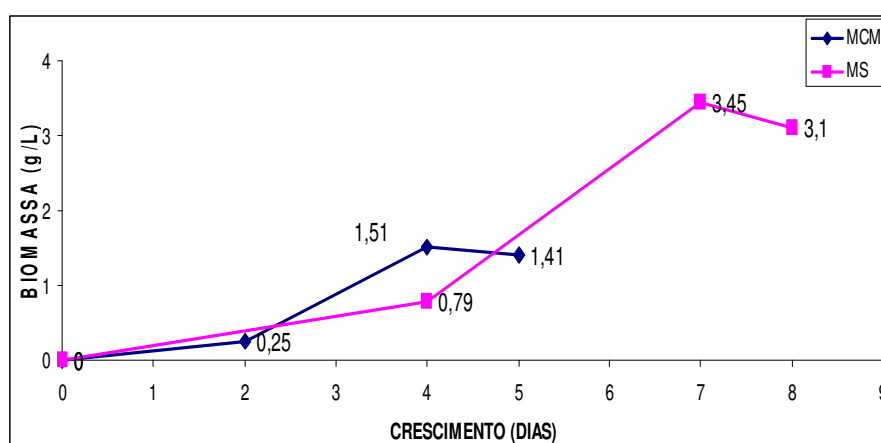
Os extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do cultivo do fungo *Penicillium* sp em Meio Sabouraud por 10 dias (A) e 16 dias (B), figura 20, apresentam um perfil químico semelhante, havendo predominância de substâncias mais polares. A diferença entre os cromatogramas A e B, está na intensidade, sendo os picos dos extratos obtidos em fase exponencial (10 dias), maiores. Analisando o cromatograma A, vemos que os picos de maior intensidade pertencem ao extrato AcOEt (vermelho), seguido do extrato BuOH (preto) e finalmente o extrato MeOH (azul) quase não apresenta picos. Algum(ns) desses picos podem estar relacionado(s) com a atividade antioxidante do extrato já que na concentração de 1,25mg/mL o extrato AcOEt tem capacidade de inibição do radical  $ABTS^{+}$  de 90%, o extrato BuOH 48% e o extrato MeOH 20% (Gráfico 21). Para os extratos em fase estacionária 16 dias, cromatograma B, vemos que os extratos do meio de cultivo BuOH (vermelho) e AcOEt (preto) apresentam picos de maior intensidade, quando

comparados ao extrato do micélio MeOH (azul). Também observamos na atividade antioxidante o extrato AcOEt com capacidade de inibição de 41% do radical ABTS<sup>•+</sup>, o extrato BuOH 50% e o extrato MeOH 10% (Gráfico 21).

Em Meio Completo Marinho também observamos predominância de substâncias mais polares. A diferença entre os cromatogramas C e D está no extrato que mostra maior quantidade e intensidade dos picos, onde em fase exponencial (C), o extrato AcOEt é representado em vermelho, já em fase estacionária (D), a cor vermelha representa o extrato BuOH. Quanto à atividade antioxidante, vemos que em fase exponencial, 3 dias, o extrato AcOEt na concentração de 5,0mg/mL, inibe 42% do radical ABTS<sup>•+</sup>, sendo que os extratos BuOH e MeOH inibem apenas 32% e 28%, respectivamente (Gráfico 22). Em fase estacionária, 5 dias, enquanto o extrato BuOH inibe 62% do radical ABTS<sup>•+</sup>, os extrato AcOEt e MeOH inibem 25% e 41%, respectivamente. (Gráfico 22).

#### 4.3.5 *Exophiala* sp

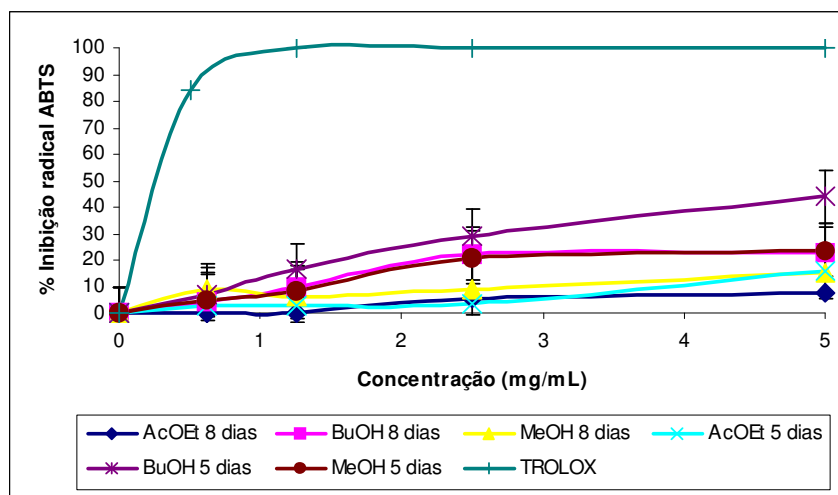
A fase estacionária de crescimento do *Exophiala* cultivado em MS inicia-se mais tardiamente em comparação ao MCM, sendo respectivamente 7 e 5 dias, como mostrado no gráfico 23. Por outro lado, o fungo *Exophiala* produziu maior biomassa em meio Sabouraud que em meio Completo Marinho.



**Gráfico 23:** Cinética de Crescimento do fungo *Exophiala* sp em Meio Sabouraud e Meio Completo Marinho.

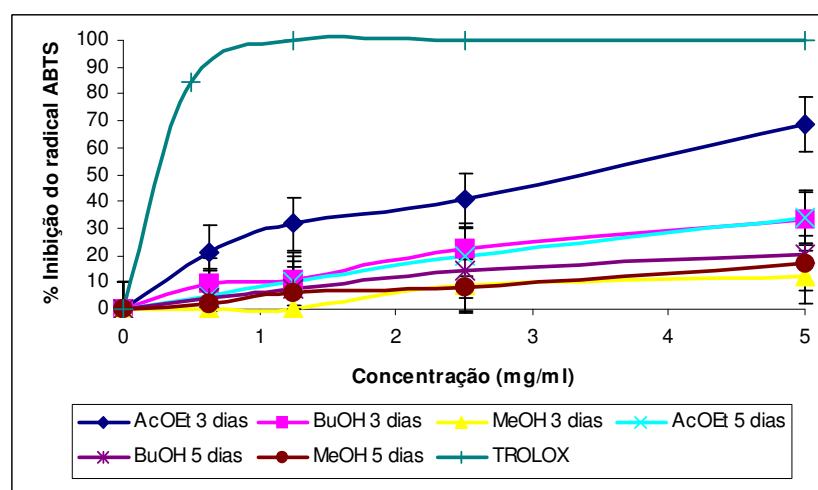
Para todos os extratos obtidos após cultivo em meio Sabouraud (Gráfico 24) não foi observada uma inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> semelhante ao Trolox.

Comparativamente, o extrato BuOH, obtido após 5 dias de cultivo, exibiu a maior inibição do radical  $ABTS^{+\cdot}$ , mas atingindo somente 45%, mesmo na maior concentração testada (5,0 mg/mL). A análise de variância nos extratos BuOH 8 dias ( $IC_{50}=10,0\text{mg/mL}$ ) e 5 dias ( $IC_{50}=5,4\text{mg/mL}$ ), verificou que há diferença estatística, pois,  $F_{calculado}$  (760) é maior que  $F_{crítico}$  (7,71). Tabela 29-apêndice.



**Gráfico 24:** Porcentagem de Inibição do Radical  $ABTS^{+\cdot}$  em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Exophiala* sp por 5 e 8 dias em Meio Sabouraud.

Em Meio Completo Marinho, a maior inibição do radical  $ABTS^{+\cdot}$  foi observada no extrato AcOEt, obtido após 3 dias de cultivo, com valor de 68% na concentração de 5,0mg/mL (Gráfico 25).



**Gráfico 25:** Porcentagem de Inibição do Radical  $ABTS^{+\cdot}$  em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Exophiala* sp por 3 e 5 dias em Meio Completo Marinho.

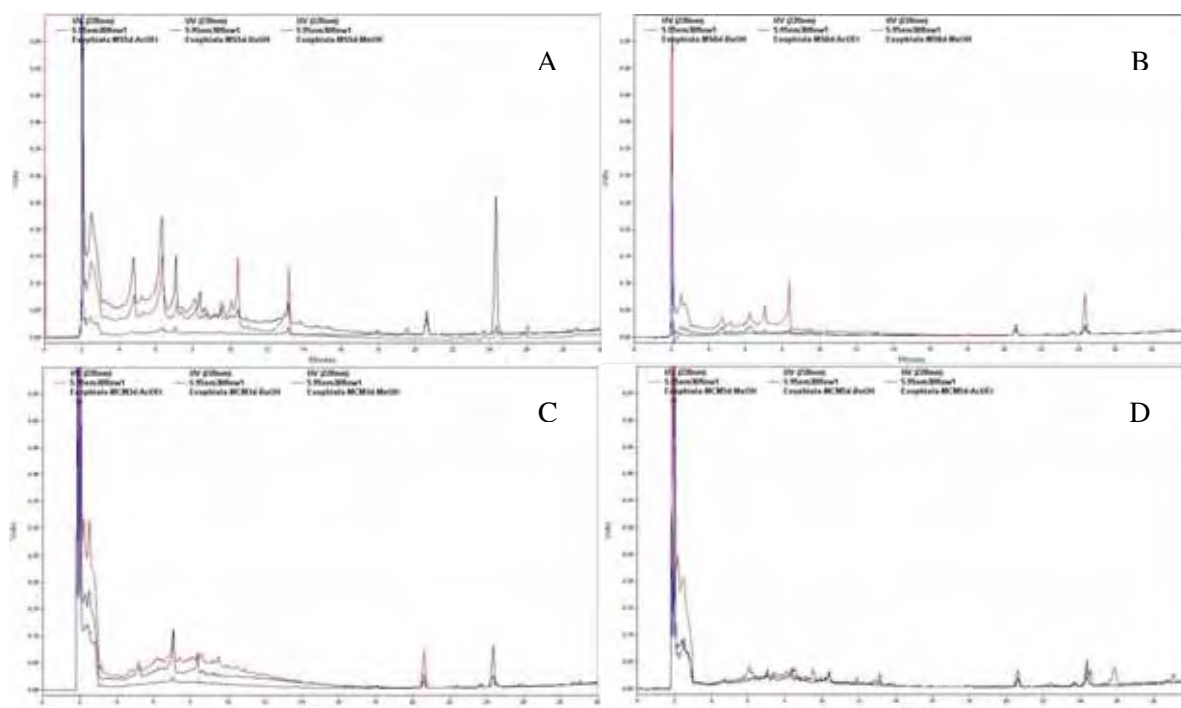
Para este fungo, a maior porcentagem de inibição do radical foi observada em Meio Completo Marinho (68% em AcOEt 3 dias, com  $IC_{50}=2,8\text{mg/mL}$ ) comparada àqueles do Meio Sabouraud (45% em BuOH 5 dias, com  $IC_{50}=5,4\text{mg/mL}$ ). Este resultado pode estar relacionado com a cinética de crescimento desse fungo, pois, como mostrado no gráfico 23, o seu crescimento em Meio Sabouraud foi aproximadamente o dobro em relação ao Meio Completo Marinho, o que poderia sugerir uma relação inversa entre crescimento (biomassa) e produção de metabólitos bioativos.

Em ambas condições de cultivo, a produção de substâncias com atividade antioxidante foi obtida durante a fase exponencial, ao contrário dos relatos da literatura, que relaciona a produção de metabólitos bioativos com a fase estacionária de crescimento.

Independente da fase de crescimento ou do meio de cultivo, o fungo *Exophiala* não pode ser considerado apropriado para a produção de substâncias com atividade antioxidante, em função da baixa porcentagem de inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$ .

#### **4.3.5.1 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo *Exophiala* sp no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.**

Os cromatogramas abaixo, figura 21, referem-se aos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos a partir do cultivo do fungo *Exophiala* sp em Meio Sabouraud por 5 dias (A) e 8 dias (B) e do cultivo em Meio Completo Marinho por 3 e 5 dias, (C) e (D), respectivamente.



**Figura 21:** Análise de CLAE dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *Exophiala* sp cultivado em Meio Sabouraud por 10 dias (A) e 16 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 3 dias (C) e 5 dias (D).

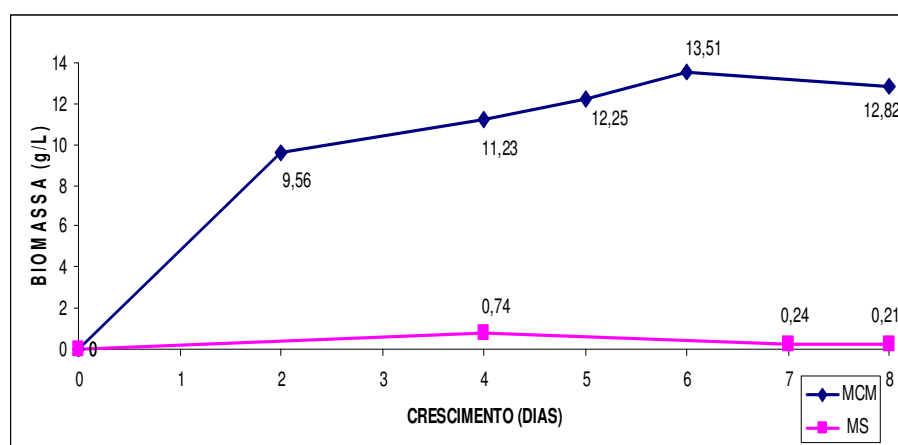
Em relação aos cromatogramas obtidos a partir do cultivo do fungo *Exophiala* sp em Meio Sabouraud (A) e (B), podemos observar que em fase exponencial de crescimento (A) há maior quantidade de substâncias, de característica mais polar, quando comparado à fase estacionária (B). A degradação das substâncias produzidas, com o passar do tempo, pode ser uma possível explicação. Os extratos do meio de cultivo, AcOEt (vermelho) e BuOH (preto), são os que apresentam maior quantidade de substâncias, uma vez que o extrato micelial, MeOH (azul) mostra uma linha praticamente sem picos (A). Em fase estacionária (B), o extrato BuOH (vermelho), apresenta picos de intensidade maior que os extratos AcOEt e MeOH. A baixa intensidade dos picos em ambos os cromatogramas (A) e (B), pode estar relacionada à baixa atividade antioxidante, visto que o extrato BuOH 5 dias (cromatograma A em vermelho), na concentração de 5,0 mg/mL, foi o responsável pela inibição de 44% do radical ABTS<sup>•+</sup>, sendo este o melhor resultado para o fungo *Exophiala* sp cultivado em MS (Gráfico 24).

O mesmo acontece nos extratos obtidos em Meio Completo Marinho. Em fase exponencial (C) observamos maior quantidade de substâncias comparado à fase

estacionária (D), novamente, essas substâncias podem ter sofrido degradação com o passar do tempo. No cromatograma C, vemos que os extratos AcOEt (vermelho) e BuOH (preto) apresentam picos de maior intensidade que o extrato MeOH (azul), já no cromatograma D, os extratos não se diferenciam significativamente em relação aos picos. Assim como em MS, o extrato que apresenta maior atividade antioxidante está na fase exponencial, 3 dias, sendo o extrato AcOEt, na concentração de 5,0mg/mL, o responsável por 68% da inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  (Gráfico 25). No cromatograma C podemos ver que o primeiro pico entre 2 e 3 minutos, se destaca dos demais, apresentando uma intensidade 0,3.

#### 4.3.6 *Trichophyton tonsurans*

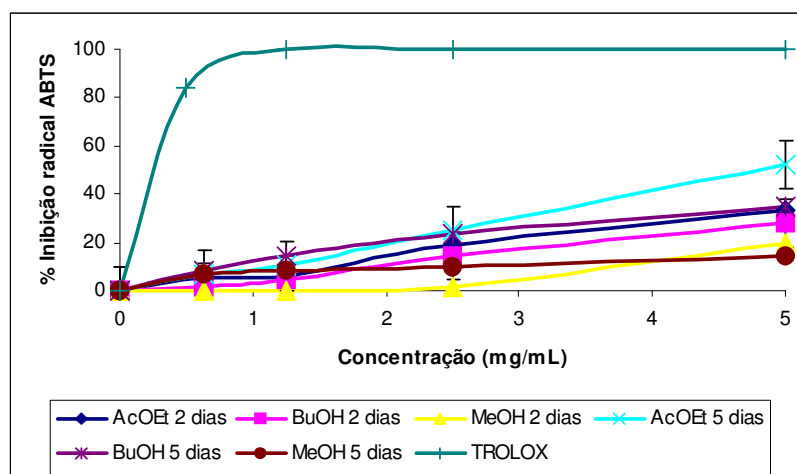
Como observado no Gráfico 26, em Meio Completo Marinho o fungo *Trichophyton tonsurans* está no início da fase estacionária com 6 dias de crescimento e no Meio Sabourand isto ocorre com 4 dias de crescimento. Nota-se também que a produção de biomassa foi muito menor em MS do que em MCM, indicando que este fungo requerer um meio rico em nutrientes para o seu crescimento.



**Gráfico 26:** Cinética de Crescimento do fungo *Trichophyton tonsurans* em Meio Sabourand e Meio Completo Marinho.

Quando analisamos o fungo *Trichophyton tonsurans* em Meio Sabourand (Gráfico 27), podemos observar que nenhum dos extratos apresentou uma inibição do radical  $ABTS^{\cdot+}$  próxima a 100%. Na concentração de 2,5mg/mL, os extratos AcOEt e BuOH, ambos com 5 dias de crescimento, inibiram 20% do radical  $ABTS^{\cdot+}$ ,

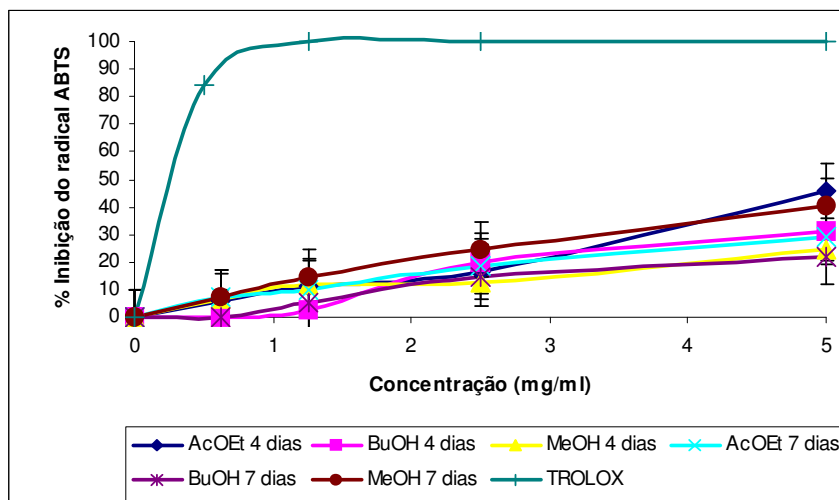
enquanto o extrato MeOH de 2 dias não apresentou inibição do radical. Na maior concentração (5,0mg/mL), observamos uma inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> de 50% para o extrato AcOEt, obtidos após 5 dias de cultivo, enquanto os extratos do micélio (MeOH) de 2 e 5 dias apresentam baixos valores de inibição do radical, respectivamente 19 e 15% de inibição.



**Gráfico 27:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Trichophyton tonsurans* por 2 e 5 dias em Meio Sabouraud.

Comparando os extratos AcOEt nos tempos de 2 e 5 dias, observa-se uma inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> de 33 e 50%, respectivamente, o que indica que o fungo *Trichophyton tonsurans* apresenta uma maior capacidade antioxidante na fase estacionária de crescimento, ou seja, após 5 dias de crescimento. Pela análise de variância comprovamos que há uma diferença significativa entre o extrato AcOEt com 2 dias ( $IC_{50}=7,4\text{mg/mL}$ ) e 5 dias ( $IC_{50}=5,0\text{mg/mL}$ ), já que  $F_{calculado}$  (15552) é maior que  $F_{crítico}$  (7,71) (Tabela 30 – apêndice)

Em Meio Completo Marinho (Gráfico 28), os extratos de AcOEt (após 4 dias de cultivo) e o MeOH (após 7 dias de cultivo) são os que apresentam maiores níveis de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup>, cujos valores são respectivamente 45% e 40% na concentração de 5,0mg/mL. Desse modo, não há diferenças marcantes entre os extratos obtidos do meio de cultura (AcOEt, com  $IC_{50}=5,5\text{mg/mL}$ ), e do micélio (MeOH, com  $IC_{50}=6,0\text{mg/mL}$ ), independente da concentração, já que pela análise de variância obtivemos um  $F_{calculado}$  (1,22) menor que o  $F_{crítico}$  (7,71) (Tabela 31- apêndice)



**Gráfico 28:** Porcentagem de Inibição do Radical ABTS<sup>•+</sup> em relação à concentração dos extratos obtidos após cultivo do fungo *Trichophyton tonsurans* por 4 e 7 dias em Meio Completo Marinho.

Em relação ao tempo de cultivo, observa-se que a inibição do radical pelo extrato AcOEt de 4 dias (45%) é maior que aquele de 7 dias (29%). Estes resultados indicam que durante a fase exponencial o fungo produz substâncias com maior capacidade antioxidante comparada à fase estacionária, pois, de acordo com o gráfico 26, ao fungo atinge estas fases respectivamente após 4 e 7 dias de cultivo. Ao contrário, no extrato obtido do micélio observamos que a inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> é maior em fase estacionária, pois, MeOH 4 dias inibe 24% enquanto o extrato MeOH 7 dias 40%.

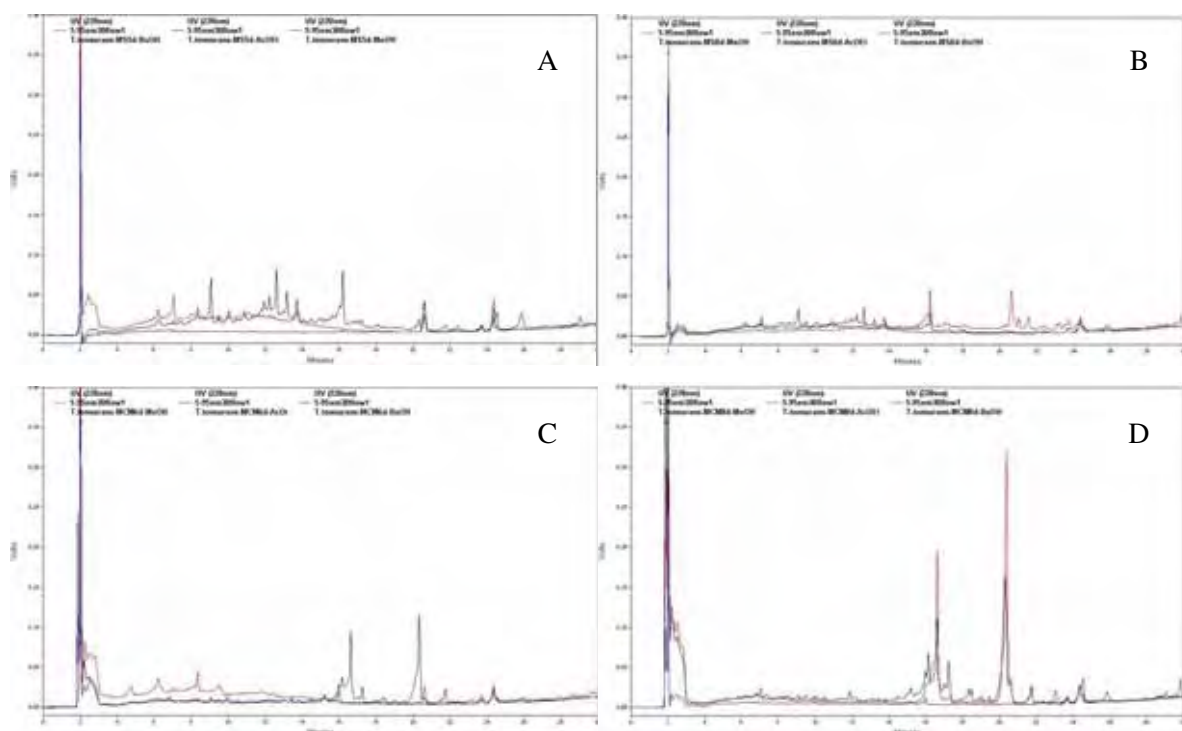
De maneira semelhante ao observado em MS, todos os extratos obtidos em Meio Completo Marinho (Gráfico 28), apresentam uma inibição menor que 50% do radical ABTS<sup>•+</sup>, indicando que *Trichophyton tonsurans* não é um fungo promissor quanto a produção de substâncias com capacidade antioxidante.

#### **4.3.6.1 Perfil por CLAE dos extratos obtidos do fungo *T. tonsurans* no tempo de extração prolongado e utilização de capela para evaporação dos solventes, em diferentes meios de cultivo e fases de crescimento.**

Abaixo estão as análises de CLAE (Figura 22) dos extratos brutos do meio de cultivo AcOEt e BuOH e do micélio MeOH obtidos a partir do cultivo do fungo *T. tonsurans* em Meio Sabouraud por 2 e 5 dias, A e B, respectivamente e cultivo em Meio Completo Marinho por 4 dias (C) e 7 dias (D).

O perfil químico dos cromatogramas A e B, referentes aos extratos obtidos em fase exponencial e estacionária, respectivamente, são semelhantes, tendo o cromatograma A picos com intensidade maior. Os extratos do meio de cultivo AcOEt (preto) e BuOH (vermelho) são os que apresentam maior quantidade de substâncias, uma vez que o extrato MeOH (azul) apresenta uma linha reta sem picos significativos (A). Em fase estacionária (B), todos os extratos apresentam um perfil químico semelhante. Apesar da fase exponencial apresentar maior quantidade de substâncias, é o extrato AcOEt 5 dias (cromatograma B em preto) que mostra maior capacidade de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> (50%), na concentração de 5,0 mg/mL (Gráfico 27)

Para o Meio Completo Marinho observamos picos mais significativos quando comparado ao Meio Sabouraud. Os cromatogramas C e D mostram predominância de substâncias menos polares. Em fase exponencial (C) há dois picos: um em 16 minutos e outro em 20 minutos, ambos pertencentes ao extrato AcOEt (preto) que mostra 45% de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> (Gráfico 28). Já em fase estacionária (D), esses mesmos picos pertencem ao extrato MeOH (vermelho) que é capaz de inibir 40% do radical. (Gráfico 28).



**Figura 22:** Análise de CLAE dos extratos AcOEt, BuOH e MeOH obtidos do fungo *T. tonsurans* cultivado em Meio Sabouraud por 2 dias (A) e 5 dias (B), e cultivado em Meio Completo Marinho por 4 dias (C) e 7 dias (D).

## 5. DISCUSSÃO

A diversidade genética e metabólica dos fungos representa uma fonte importante para a obtenção de produtos biotecnológicos, pois o potencial catalítico que eles possuem, adequadamente aproveitado, pode levar a produção de substâncias de interesse industrial, como novos antibióticos, agentes terapêuticos, enzimas, ácidos orgânicos, álcoois, dentre outros (BENETT, 1998). Os fungos de origem marinha têm despertado o interesse pela descoberta de novos metabólitos bioativos devido à enorme biodiversidade dos ecossistemas marinhos. Estudos têm mostrado que os metabólitos produzidos por estes organismos apresentam estruturas peculiares e uma extraordinária diversidade de alvos moleculares com ação seletiva, o que aumenta o potencial farmacológico e terapêutico destas substâncias (FENICAL, 1997; KELECON, 2000). A partir do fungo *Beauveria felina*, isolado da alga *Caulerpa sp* em nosso laboratório, foram obtidos ciclodepsipeptídeos, relacionados a destruxinas, os quais apresentaram atividade antimicobacteriana e antitumoral (VITA-MARQUES et al., 2008). Segundo Costa-Latuf et al.(2009) já foram isoladas cerca de 4500 novos produtos naturais marinhos, sendo que atualmente 4 fármacos relacionados a estas substâncias estão em uso clínico: ara-C (Citarabina) e trabectedina (Yondelis) como antitumoral; Ara-A (Vidarabina) como antiviral e ziconotídeo (Prialt) como analgésico neuropático.

Neste trabalho, foram estudados alguns fungos, isolados do litoral paulista, com o objetivo de explorar a biodiversidade dos fungos brasileiros de origem marinha em relação à produção de substâncias com capacidade antioxidante. Pela análise foi possível identificar as seguintes espécies: *Aspergillus niger*, *Aspergillus versicolor*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium sp*, *Exophiala sp*, *Madurella grisea*, *Mucor sp*, *Penicillium sp*, *Trichophyton terrestre* e *Trichophyton tonsurans*. De acordo com Kohlmeyer e Kohlmeyer (1979), estes organismos podem ser classificados como fungos marinhos capelautativos, que são aqueles provenientes de áreas terrestres ou de água doce que também são capazes de crescer em ambiente marinho. No entanto, como muitos microrganismos mantêm uma relação de simbiose com plantas ou animais aquáticos, os fungos estudados neste trabalho podem ter desenvolvido vias metabólicas específicas para a produção de substâncias relacionadas com a defesa e competição no ambiente marinho, as quais não estariam presentes nos fungos terrestres.

A descoberta dos fungos com potencial para a produção de substâncias antioxidantes foi feita usando as técnicas tradicionais de isolamento e seleção do(s) microrganismo(s) produtor(es) do composto de interesse. No entanto, algumas dificuldades existem nesta pesquisa, como a baixa concentração de compostos bioativos, o alto custo da síntese química desta substância devido a sua complexidade estrutural, a inviabilidade da extração direta do composto a partir do isolado marinho e a determinação da origem biossintética do composto para organismos simbiotes (BULL, 2000). Vários estudos têm mostrado que o perfil químicos dos extratos podem variar em função do método usado para sua obtenção (Andreo e Jorge, 2006). Assim, torna-se necessário determinar o método de extração mais adequado para o tipo de compostos a ser estudado.

Um dos objetivos deste trabalho foi determinar as condições ótimas para a extração de compostos antioxidantes dos fungos estudados. Diferentes solventes (AcOEt, BuOH e MeOH) foram usados durante a extração para avaliar a influencia da polaridade do solvente na obtenção de compostos antioxidantes.

Os resultados mostraram que para o fungo *A. niger*, a maior porcentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> foi observado nos extratos MeOH e BuOH, obtidos respectivamente após 7 e 10 dias de crescimento em Meio Sabouraud. Por outro lado, para o ao fungo *T. terrestre*, os extratos AcOEt e BuOH obtidos, respectivamente, após 12 e 16 dias de crescimento em Meio Sabouraud, apresentaram maior atividade antioxidante.

Estes resultados podem ser explicados em função de vários fatores como natureza química dos compostos, grande variedade de compostos bioativos presentes e as possíveis interações destes compostos com carbono, proteína e outros componentes celulares (Andreo e Jorge, 2006).

Karaman et al., 2009 estudaram as frações metanólica, clorofórmica e aquosa, obtidas do extrato bruto dos fungos *Ganoderma lucidium*, *G. applanatum*, *Flammuluna velutipes* e *Meripilus giganteus* e constataram que os extratos MeOH de *G. applanatum* exibiram o maior grau de inibição de peroxidação lipídica com IC<sub>50</sub> =1mg/mL, que os extratos de CHCl<sub>3</sub> (clorofórmio) está no extrato MeOH, sendo que o extrato aquoso não mostrou efeito na inibição da lipoperoxidação lipídica. Fabri, 2009 avaliou a atividade antioxidante das frações de Hexano, MeOH, AcoEt, n-BuOH e aquosa, obtidas do extrato bruto de *Mitracarpus frigidus* e concluiu que os menores valores de IC<sub>50</sub> estavam nas frações AcOEt e n-BuOH. Alves et al., 2003

analisando frações hexânica, clorofórmica, AcOEt, n-butanólica e aquosa do extrato bruto de *Schinus molle*, observaram que a atividade antioxidante foi maior na fração de acetato de etila, com valor de IC<sub>50</sub> igual a 23µg/mL, enquanto que na fração butanólica o IC<sub>50</sub> foi de 122µg/mL.

O efeito do tempo de extração na obtenção de substâncias bioativas também foi avaliado neste trabalho, pois longos períodos de extração podem aumentar a possibilidade de oxidação destas substâncias alterando conseqüentemente a capacidade antioxidante. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a atividade antioxidante dos extratos (AcOEt, BuOH e MeOH) dos fungos *A. niger* e *T. terrestre*, em fase exponencial de crescimento, não variou em função do tempo de extração. No entanto, nos extratos da fase estacionária de crescimento o tempo de extração prolongado resultou em maior atividade antioxidante, provavelmente porque durante este tempo maior quantidade de substâncias antioxidantes foram extraídas.

Lapornik, et al., (2005) estudando o efeito do tipo de solvente e do tempo de extração em extratos de uva e groselha, observaram que a atividade antioxidante aumentou com o tempo de extração (1 a 24 horas), sendo maior nos extratos metanólicos comparados aos extratos etanólicos e aquosos.

A temperatura de evaporação é um outro parâmetro que deve ser considerada na obtenção de compostos bioativos. A estabilidade destes compostos durante a extração pode ser afetada pela degradação química e enzimática e também pela volatilização das substâncias e/ou decomposição térmica. Os resultados obtidos mostraram que, independentemente da fase de crescimento, todos os extratos dos fungos *A. niger* e *T. terrestre* submetidos à capela apresentaram maior atividade antioxidante quando comparado aos extratos submetidos ao rotaevaporador. Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com estudos realizados por Herrero et al., (2005) de otimização do processo de extração de compostos antioxidantes da microalga *Spirulina platensis*. Eles observaram que a polaridade do solvente como também a temperatura de extração, tem uma enorme influência na atividade antioxidante dos extratos enquanto que o efeito do tempo de extração foi negligenciável.

Os resultados referentes à análise de CLAE confirmaram que a metodologia de extração altera o perfil químico dos metabólitos obtidos dos fungos *A. niger* e *T. terrestre*. Os extratos que obtiveram os solventes evaporados em temperatura

ambiente mostraram um cromatograma com maior quantidade de picos, em relação àqueles extratos que foram submetidos ao rotaevaporador.

De acordo com Demain (2000), a produção e diversidade dos metabólitos de interesse (bioativos) é influenciada pelas condições de cultivo, como temperatura, pH, aeração, nutrientes e tempo de crescimento. Neste sentido, os fungos estudados neste trabalho foram cultivados em duas condições nutricionais diferentes: Meio completo marinho e meio Sabouraud. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a composição do meio influenciou a produção de substâncias com capacidade antioxidante, pois nenhum dos fungos, cultivados em Meio Completo Marinho, apresentou inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> superior ou igual àquela observada em Meio Sabouraud. Analisando a cinética de crescimento destes fungos verifica-se que em Meio Completo Marinho (MCM) a biomassa é aproximadamente 2 vezes maior que aquela obtida em Meio Sabouraud (MS). Estes resultados parecem indicar uma correlação inversa entre crescimento e produção de metabólitos antioxidantes, que pode ser explicado pela composição do meio. Fungos cultivados em meios contendo alta concentração de glicose e/ou sacarose juntamente com extrato de malte ou de levedura exibem uma maior variedade e quantidade de metabólitos secundários (FRISVAD *et al.*, 2008). Segundo Griffin, 1994 a formação de metabólitos secundários pode ser estimulada pela limitação de nutriente na presença de excesso de fonte de carbono, que representa a condição presente no Meio Sabouraud. Mabrouk *et al.*, 2008 também observaram que a produção de bioativos pelo fungo marinho *Varicosporina ramulosa* variou de acordo com a composição do meio de cultivo, sendo que a maior produção foi alcançada em um meio contendo extrato de malte (30g/L), peptona (3g/L) e água do mar. Por outro lado, Elias *et al.*, 2005 observou que a biossíntese de metabólitos secundários produzidos por *Penicillium verrucosum* aumentou quando este microrganismo foi cultivado em um meio complexo, contendo peptídeo como fonte de nitrogênio. Resultados semelhantes também foram obtidos por Furtado *et al.*, 2002 em relação a substâncias com atividade antimicrobiana produzidas por *A. fumigatus*.

A natureza e concentração de nutrientes no meio têm muita importância para a produção de metabólitos secundários, pois a concentração de biomassa e de metabólitos mudam constantemente como resultado do metabolismo das células durante o crescimento (BARBOSA *et al.*, 2004). Desta forma, outro parâmetro

importante para a obtenção de compostos bioativos em processos fermentativos é o período de incubação, pois a produção destas substâncias geralmente ocorre durante a fase de crescimento estacionário. Neste trabalho, as substâncias com capacidade antioxidante foram produzidas durante a fase estacionária de crescimento para os fungos *Aspergillus versicolor*, *Trichophyton terrestre* e *Trichophyton tonsurans*. Este resultado está de acordo com a literatura que relata uma dissociação entre a fase de proliferação celular (trofofase) e a de produção de metabólitos secundários, denominada idiofase (BU'LOCK E POWELL, 1965). No entanto, para outros fungos estudados neste trabalho, como *Penicillium* sp, *Exophiala* sp e *Aspergillus niger*, quando cultivados em meio Sabouraud, a maior produção das substâncias com atividade antioxidante ocorreu no final da fase exponencial, o que sugere que a sua produção pode estar parcialmente associada ao crescimento.

Os resultados também mostraram que as substâncias com capacidade antioxidante podem estar presentes no meio de cultura (extrato AcOEt e BuOH) ou no micélio (extrato MeOH). Nos fungos *Trichophyton terrestre*, *Penicillium* sp, *Exophiala* sp e *Trichophyton tonsurans*, os extratos extracelulares (AcOEt e BuOH) apresentaram maior porcentagem de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> enquanto que para os fungos *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus niger*, a maior capacidade antioxidante foi obtida nos extratos intracelulares (MeOH). Resultados semelhantes foram relatados por Elias *et al.*, 2005, os quais também observaram diferenças no perfil químico entre os extratos, sendo que os extratos intracelulares apresentaram grande quantidade de metabólitos primários, enquanto os extratos extracelulares apresentaram metabólitos secundários.

Entre os seis fungos estudados, as espécies *Aspergillus versicolor*, *Trichophyton terrestre* e *Penicillium* sp apresentam potencial biotecnológico para a produção de substâncias antioxidantes, pois os seus extratos, mostraram um IC<sub>50</sub> de 0,9mg/mL, 0,6mg/mL e 0,6mg/mL, respectivamente, semelhante ao observado com o Trolox (IC<sub>50</sub> = 0,25mg/mL), composto antioxidante usado como referência. Portanto, os resultados obtidos enfatizam a importância de conhecer a diversidade metabólica dos fungos brasileiros de origem marinha e também determinar as condições ótimas de cultivo e de extração para uma máxima produção de substâncias antioxidantes, visando a sua produção em larga escala para uma possível aplicação em formulações cosméticas. A aplicação tópica de antioxidantes

representa uma alternativa para a proteção da pele contra o estresse oxidativo causado por diferentes fatores, como a exposição solar. As radiações UVA e UVB são responsáveis por um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), o que causa alterações no equilíbrio redox celular e, conseqüentemente, a homeostasia cutânea (GUARATINI et al., 2007). Assim, os fungos selecionados neste trabalho como produtores de substâncias antioxidantes podem representar uma fonte promissora de novos fármacos para o restabelecimento do equilíbrio redox da pele, podendo ser usadas no tratamento e/ou prevenção do envelhecimento cutâneo.

## 6. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos nesse trabalho podemos concluir que:

- A análise taxonômica permitiu conhecer a biodiversidade das espécies de fungos presentes no litoral paulista em relação à produção de substâncias com atividade antioxidante.
- O tempo de extração pode influenciar na obtenção de substâncias bioativas, sendo que a extração prolongada propiciou maior atividade antioxidante dos extratos estudados.
- A evaporação dos solventes em rotaevaporador, usando um temperatura de 50-55°C reduz a atividade antioxidante de todos os extratos (AcOEt, BuOH e MeOH), independentemente do fungo ou da fase de crescimento.
- A análise de CLAE mostrou que há diferenças no perfil químico dos extratos do meio de cultivo e do micélio e também que este perfil é modificado com a temperatura utilizada para evaporação dos solventes orgânicos.
- A composição do meio de cultivo influenciou a produção de substâncias com capacidade antioxidante, sendo que os fungos *A. versicolor*, *A. niger*, *T. terrestre*, *T. tonsurans* e *Penicillium* apresentaram melhor atividade antioxidante em Meio Sabouraud, enquanto o fungo *Exophiala* sp em Meio Completo Marinho.
- O período de incubação influenciou na produção de metabólitos bioativos, uma vez que os fungos *A. versicolor*, *T. terrestre* e *T. tonsurans* mostraram melhor capacidade antioxidante em fase estacionária e os fungos *Penicillium*, *Exophiala* e *A. niger* em fase exponencial.
- A extração de substâncias com atividade antioxidante pode variar em função do tipo de solvente utilizado.

- Há diferenças entre os extratos do Meio de Cultura (AcOEt, BuOH) e do Micélio (MeOH), pois os fungos *T. terrestre*, *Penicillium*, *Exophiala* e *T. tonsurans* obtiveram maior inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> com os extratos do meio de cultivo (AcOEt e BuOH) e, os fungos *A. niger* e *A. versicolor* obtiveram maior inibição com o extrato do micélio (MeOH).
  
- Os fungos *A. versicolor*, *T. terrestre* e *Penicillium* apresentaram alta atividade antioxidante em função dos baixos valores de IC<sub>50</sub>: 0,9mg/mL, 0,6mg/mL e 0,6mg/mL, respectivamente, comparado ao TROLOX que mostra IC<sub>50</sub>=0,25mg/mL, portanto, podem ser considerados como fontes promissoras de novos fármacos para o restabelecimento do equilíbrio redox da pele, podendo ser usado no tratamento e/ou prevenção do envelhecimento cutâneo.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-LATEFF, A.; FISCH, K. M.; WRIGHT, A. D.; KÖNIG, G. M. A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum* sp. **Planta Medica**, v. 69, p. 831-834, 2003.

ABDEL-LATTEF, A.; KÖNIG, G. M.; FISCH, K. M.; HÖLLER, U.; JONES, P. G.; WRIGHT, A. D. New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicilous marine fungus *Acremonium* sp. **Journal Natural Product**, v. 65, p. 1605-1611, 2002.

ALVES, L. O.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Efeito antioxidante de extratos e frações de *Shinus molle*. In: ENCONTRO DE QUÍMICA DA REGIÃO SUL, 11., 2003, Pelotas. **Anais...Pelotas: SBQ/SUL**, 2003.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do CEPPA**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.

AUGUSTO, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. São Paulo: Oficina de Textos, 2006. 115 p.

BARBOSA, L. C. A.; COSTA, A. V.; VELOSO, D. P.; LOPES, J. L. C.; HERNANDEZ-TERRONESD, M. G.; KING-DIAZ, B.; LOTINA-HENNSEN, B. Phyto-growth-inhibitory lactones derivatives of glaucolide B. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p. 803-810, 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 101-107, 1998.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In: PACKER, L. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1999. v. 299, p. 15-27.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, v. 65, n. 18/19, p. 1865-1874, Oct. 1999.

BERGER, P.; LEITNER, N. K. V.; DORÉ, M.; LEGUBE, B. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. **Water Research**, v. 33, p. 433-441, 1999.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINCEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 20, p. 1-48, 2003.

- BOOTH, T. Strategies for study of fungi in marine and marine influenced ecosystems. **Journal of Microbiology**, v. 10, p. 123-138, 1979.
- BOUSSAADA, O.; CHRILAA, J.; NABLI, R.; AMMAR, S.; SAIDANA, D.; MAHJOUR, M. A.; CHRAEIJ, I.; HELAL, A. N.; MIGHRI, Z. Antimicrobial and antioxidant activities of methanol extracts of *Evax pygmaea* (Asteraceae) growing wild in Tunisia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 12-89-1296, 2008.
- BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 573-606, 2000.
- BU'LOCK, J. D.; POWELL, A. J. Secondary metabolism: an explanation in terms of induced enzyme mechanisms. **Biomedical and Life Sciences**, v. 21, p. 55-56, 2005.
- CHARLIE, M. J.; WATKINSON, G. W. **The Fungi**. 2nd ed. Gooday: Academic Press, 2001. 588p.
- CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P. Free radicals associated with DNA damage. **Experimental Gerontology**, v. 36, p. 1459-1471, 2001.
- CONNER, E. M.; GRISHAM, M. B. Inflammation, free radicals and antioxidants. **Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 274-277, 1996.
- CORRÊA, A. G.; ZUIN, E. V.G. Química verde: fundamentos e aplicações. **EDUFSCar**, v. 1, p. 171, 2009.
- COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFANIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.
- DEMAIN, A. L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, p. 455-463, 1999.
- DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 26-31, 2000.
- DE VITA, A. M. **Isolamento, atividade biológica e análise do perfil químico de fungos coletados no litoral do estado de São Paulo**. 2003. 179 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- ELIAS, B. C.; SAID, S.; ALBUQUERQUE, S.; PUPO, M. T. The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. **Microbiological Research**, v. 161, n. 3, p. 273-280, 2005.
- FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SCIO, E. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 428-433, 2009.
- FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 19, p. 1-48, 2002.

- FENICAL, W. New pharmaceuticals from marine organisms. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 339-341, 1997.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FRIDOVICH, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease. Free radical and tissue injury. **Laboratory Investigation**, v. 47, n. 5, p. 421-428, Nov. 1982.
- FRISVAD, J. C.; ANDRESEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, p. 231-240, 2008.
- FURTADO, N. A. J. C.; FONSECA, M. J. V.; BASTOS, J. K. The potential of an *Aspergillus fumigatus* brazilian strain to produce antimicrobial secondary metabolites. **Journal of Microbiology**, v. 36, p. 357-362, 2005.
- FURTADO, N. A. J. C.; SAID, S.; ITO, I. Y.; BASTOS, J. K. The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. **Microbiological Research**, v. 157, p. 207-211, 2002.
- GADEN, E. L. Fermentation process kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 1, p. 413-418, 2000.
- GÓMEZ, B. L.; NOSANCHUK, J. D.; DIEZ, S.; YOUNGCHIM, S.; AISEN, P.; CANO, L. E.; RESTREPO, A.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Detection of melanin-like pigments in the dimorphic fungal pathogen *paracoccidioides brasiliensis* *in vitro* and during infection. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5760-5767, 2001.
- GONÇALVES, R. C. R.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 6, p. 1129-1131, Nov. 2005.
- GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2nd ed. New York: Wiley-Liss, 1994. 458p.
- GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30, p. 206-213, 2007.
- HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 10, p. 1341-1348, 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 246, p. 501-514, 1986.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: PACKER, L.; GLAZER, A. N. (Ed.). **Methods in enzymology**. Nova York: Academic Press, 1999. v. 186, p. 1-85. Part B.

- HERRERO, M. et al. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 417-423, 2005.
- HOLLER, U.; WRIGHT, A. D.; MATTHEE, G. F.; KONIG, G. M.; DRAEGER, S.; AUST, H. J. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. **Mycological Research**, v. 104, p. 1354-1365, 2000.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p.1841-1856, 2005.
- HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2489-2491, 1987.
- IVEKOVIĆ, D.; MILARDOVIĆ, S.; ROBOZ, M.; GRABARIĆ, S. Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. **Analyst**, v. 130, p. 708-714, 2005.
- JACOB, R. A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v.15, p.755-766, 1995.
- KARAMAN, M. A.; DUKIC, N. M. M.; MATAVULY, M. N. Lignicolous fungi from northern Serbia as natural sources of antioxidants. **Central European Journal of Biology**, v. 4, n. 3, p. 387-396, 2009.
- KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, p.151- 170, 2002.
- KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. **Marine mycology-the higher fungi**. New York: Academic Press, 1979. 690 p.
- KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, G. A.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.
- LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v.71, p. 214-222, 2005.
- LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1390-1393, 1997.
- MABROUK, A. M.; KHEIRALLA, Z. H.; HAMED, E. R.; YOUSSEF, A. A.; EL ATY, A. A. Production of some biologically active secondary metabolites from marine-derived fungus *Varicosporina ramulosa*. **Journal of Microbiology**, v. 4, p. 14-24, 2008.
- MELLO FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemistry Journal**, v. 218, p. 273-275, Dec. 1983.

- NUNES, E.; OLIVEIRA, S. C.; MORAES, R. M. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. **Open Journal Systems**, v. 1, p. 1-32, 2007.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p.1231-1237, 1999.
- RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. de. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, Dec. 2005.
- RILEY, P. A. Melanin. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 29, n. 11, p. 1235-1239, 1997.
- SHCHERBA, V. V.; BABITSKAYA, V. G.; KURCHENKO, V. P.; KONNIKOVA, N. V. I.; KUKULYANSKAYA, T. A. Antioxidant properties of fungal melanin pigments antioxidant properties of fungal melanin pigments. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 491-495, Sept. 2000.
- SIES, H. **Oxidative stress**. Londron: Academic Press, 1985. 507 p.
- SOLOMONS, T. W. G. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: LTC, 1996. v. 1, 698 p.
- SUN, C.; SHAN, X. D.; GAO, X. D.; TAN, R. X. Protection of PC12 cells from hydrogen peroxide-induced injury by EPS2, an exopolysaccharide from a marine filamentous fungus *Keissleriella* sp. YS4108. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 137-144, 2005.
- SUN, C.; WEN-WANG, J.; FANG, L.; GAO, X. D.; TAN, R. X. Free radical scavenging and antioxidant activities of EPS2, an exopolysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Keissleriella* sp. YS 4108. **Life Sciences**, v. 75, p. 1063-1073, 2004.
- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; ZEVALLOS, L. C.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Foods Composition and Analysis**, v. 19, p. 669-675, 2006.
- TOMAINO, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 549-554, 2005.
- TOMEI, R. R.; SALVADOR, M. J. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS GRADUAÇÃO, 7., 2007, São José dos Campos. **Anais...** São José dos Campos: [s.n.], 2007. p. 1963-1967.
- VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO JUNIOR, A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Nutrição Clínica**, v. 31, p. 31-44, 1998.

VITAMARQUES, A. M.; LIRA, S. P.; BERLINCK, R. G. S. ; SELEGHIM, M. H. R.; SPONCHIADO, S. R. P.; TAUKE-TORNISIELO, S. M.; BARATA, M.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; CAVALCANTI, B. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; SOUZA, A. O.; GALETTI, F. C. S.; SILVA, C. L.; SILVA, M.; PIMENTA, E. F.; THIEMANN, O. H.; PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Química Nova**, v. 31, p. 1099-1103, 2008.

VON GADOW, A.; JOURBERT, E.; HANSMANN, C. F. Effect of extraction time and additional heating on the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 13-70-1374, 1997.

WISEMAN, H.; KAUR, H.; HALLIWELL, B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. **Cancer Letters**, v. 93, p. 113-120, 1995.

WOODRUFF, H. B. Natural products from microorganisms. **Science**, v. 208, p. 1225-1229, 1980.

YANG, X. B.; GAO, X. D.; HAN, F.; TAN, R. X. Sulfation of a polysaccharide produced by a marine filamentous fungus *Phoma herbarum* YS4108 alters its antioxidant properties *in vitro*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1725, p. 120-127, 2005.

## APÊNDICE

**Tabela 6:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato BuOH, na concentração de 2,5 mg/mL, obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 12 dias, quanto ao tempo de extração prolongado ou rápido.

### ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0010935	1	0,001094	4,57	0,10	7,71
Dentro dos grupos	0,000958	4	0,00024			
<b>Total</b>	<b>0,0020515</b>	<b>5</b>				

**Tabela 10:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato AcOEt, na concentração de 2,5 mg/mL, obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 12 dias, quanto ao tempo de extração prolongado ou rápido.

### ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000748167	1	0,000748167	3,91	0,12	7,71
Dentro dos grupos	0,000765333	4	0,000191333			
<b>Total</b>	<b>0,0015135</b>	<b>5</b>				

**Tabela 11:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato MeOH, na concentração de 2,5 mg/mL obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 12 dias, quanto ao tempo de extração prolongado ou rápido.

### ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,001908167	1	0,001908167	7,24	0,01	7,71
Dentro dos grupos	0,000442667	4	0,000110667			
<b>Total</b>	<b>0,002350833</b>	<b>5</b>				

**Tabela 12:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato AcOEt, na concentração de 2,5 mg/mL obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 16 dias, quanto ao tempo de extração prolongado ou rápido.

### ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,004374	1	0,004374	95,43	0,00	7,71
Dentro dos grupos	0,000183333	4	4,58333E-05			
<b>Total</b>	<b>0,004557333</b>	<b>5</b>				

**Tabela 13:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato BuOH, na concentração de 2,5 mg/mL obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 16 dias, quanto ao tempo de extração prolongado ou rápido.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0036015	1	0,0036015	163,70	0,00	7,71
Dentro dos grupos	8,8E-05	4	2,2E-05			
<b>Total</b>	<b>0,0036895</b>	<b>5</b>				

**Tabela 14:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato MeOH, na concentração de 2,5 mg/mL obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 16 dias, quanto ao tempo de extração prolongado ou rápido.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,001504	1	0,00150417	2,5	7,312E-06	7,71
Dentro dos grupos	6,67E-06	4	1,6667E-06			
<b>Total</b>	<b>0,001511</b>	<b>5</b>				

**Tabela 15:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato AcOEt, na concentração de 1,25mg/mL, obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 12 dias, quanto à temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,309628167	1	0,309628	1858	1,738E-12	7,71
Dentro dos grupos	6,66667E-07	4	1,67E-07			
<b>Total</b>	<b>0,309628833</b>	<b>5</b>				

**Tabela 16:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato BuOH, na concentração de 1,25mg/mL, obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 12 dias, quanto à temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,059004167	1	0,059004	3161	5,992E-07	7,71
Dentro dos grupos	7,46667E-05	4	1,87E-05			
<b>Total</b>	<b>0,059078833</b>	<b>5</b>				

**Tabela 17:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato MeOH, na concentração de 1,25mg/mL, obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 12 dias, quanto à temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,200568167	1	0,200568	12280	3,977E-08	7,71
Dentro dos grupos	6,53333E-05	4	1,63E-05			
<b>Total</b>	<b>0,2006335</b>	<b>5</b>				

**Tabela 18:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato AcOEt, na concentração de 0,625mg/mL, obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 16 dias, quanto à temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,158112667	1	0,158113	12482	3,849E-08	7,71
Dentro dos grupos	5,06667E-05	4	1,27E-05			
<b>Total</b>	<b>0,158163333</b>	<b>5</b>				

**Tabela 19:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato BuOH, na concentração de 0,625mg/mL, obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 16 dias, quanto à temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,344640667	1	0,344641	3215	5,789E-07	7,71
Dentro dos grupos	0,000428667	4	0,000107			
<b>Total</b>	<b>0,345069333</b>	<b>5</b>				

**Tabela 20:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,052%, do extrato MeOH, na concentração de 0,625mg/mL, obtido do fungo *T. terrestre* cultivado em MS por 16 dias, quanto à temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,020650667	1	0,020651	292	6,869E-05	7,71
Dentro dos grupos	0,000282667	4	7,07E-05			
<b>Total</b>	<b>0,020933333</b>	<b>5</b>				

**Tabela 21:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato AcOEt, na concentração de 2,5 mg/mL, obtido do fungo *A. niger* cultivado em MS por 7 dias, quanto ao tempo de extração prolongado ou rápido

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,001666667	1	0,001666667	15,24	0,02	7,71
Dentro dos grupos	0,000437333	4	0,00010933			
<b>Total</b>	<b>0,002104</b>	<b>5</b>				

**Tabela 22:** Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 0,05%, do extrato BuOH, na concentração de 2,5 mg/mL, obtido do fungo *A. niger* cultivado em MS por 7 dias, quanto ao tempo de extração prolongado ou rápido.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000192667	1	0,00019267	2,20	0,21	7,71
Dentro dos grupos	0,000350667	4	8,7667E-05			
<b>Total</b>	<b>0,000543333</b>	<b>5</b>				

**Tabela 23:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato MeOH, na concentração de 1,25 mg/mL, obtido do fungo *A. niger* cultivado em MS por 10 dias, quanto ao tempo de extração prolongado ou rápido.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,004760167	1	0,00476017	220	0	7,71
Dentro dos grupos	8,66667E-05	4	2,1667E-05			
<b>Total</b>	<b>0,004846833</b>	<b>5</b>				

**Tabela 24:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato BuOH, na concentração de 2,5 mg/mL, obtido do fungo *A. niger* cultivado em MS por 10 dias, quanto ao tempo de extração prolongado ou rápido.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,001232667	1	0,00123267	38	0	7,71
Dentro dos grupos	0,000128667	4	3,2167E-05			
<b>Total</b>	<b>0,001361333</b>	<b>5</b>				

**Tabela 25:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato MeOH, na concentração de 1,25mg/mL, obtido do fungo *A. niger* cultivado em MS por 7 dias, quanto à temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,0438615	1	0,0438615	1604	2,3204E-06	7,71
Dentro dos grupos	0,000109333	4	2,73333E-05			
<b>Total</b>	<b>0,043970833</b>	<b>5</b>				

**Tabela 26:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato AcOEt, na concentração de 1,25 mg/mL, obtido do fungo *A. niger* cultivado em MS por 7 dias, quanto à temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,007920667	1	0,007920667	91	0,00066385	7,71
Dentro dos grupos	0,000345333	4	8,63333E-05			
<b>Total</b>	<b>0,008266</b>	<b>5</b>				

**Tabela 27:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato BuOH, na concentração de 1,25 mg/mL, obtido do fungo *A. niger* cultivado em MS por 7 dias, quanto à temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,016432667	1	0,016432667	601	1,6418E-05	7,71
Dentro dos grupos	0,000109333	4	2,73333E-05			
<b>Total</b>	<b>0,016542</b>	<b>5</b>				

**Tabela 28:** Análise de Variância (ANOVA), com um nível de significância de 0,05%, do extrato BuOH, na concentração de 0,625 mg/mL, obtido do fungo *A. niger* cultivado em MS por 10 dias, quanto à temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,034352667	1	0,034352667	310	6,0953E-05	7,71
Dentro dos grupos	0,000442667	4	0,000110667			
<b>Total</b>	<b>0,034795333</b>	<b>5</b>				

**Tabela 29:** Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 0,05%, do extrato AcOEt, na concentração de 0,625 mg/mL, obtido do fungo *A. niger* cultivado em MS por 10 dias, quanto a temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,005046	1	0,005046	48	0,00228688	7,71
Dentro dos grupos	0,000421333	4	0,000105333			
<b>Total</b>	<b>0,005467333</b>	<b>5</b>				

**Tabela 30:** Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 0,05%, do extrato MeOH, na concentração de 0,625 mg/mL, obtido do fungo *A. niger* cultivado em MS por 10 dia, quanto a temperatura de evaporação dos solventes: capela ou rotaevaporador.

## ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,013632667	1	0,013632667	217	0,00012299	7,71
Dentro dos grupos	0,000250667	4	6,26667E-05			
<b>Total</b>	<b>0,013883333</b>	<b>5</b>				

**Tabela 31:** Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 0,05%, entre os extratos MeOH 7 dias e BuOH 10 dias, na concentração de 5,0mg/mL, obtido do cultivo do fungo *A. niger* em MS.

## ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,0418335	1	0,0418335	464,82	0,00	7,71
Dentro dos grupos	0,00036	4	9E-05			
<b>Total</b>	<b>0,0421935</b>	<b>5</b>				

**Tabela 32:** Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 0,05%, entre o extrato BuOH com 3 e 5 dias, na concentração de 5,0mg/mL, obtido do cultivo do fungo *Exophiala* sp em MS.

## ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,023814	1	0,023814	760	1,03E-05	7,71
Dentro dos grupos	0,000125	4	3,13E-05			
<b>Total</b>	<b>0,023939</b>	<b>5</b>				

**Tabela 33:** Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 0,05%, entre o extrato AcOEt com 2 e 5 dias, na concentração de 5,0mg/mL, obtido do cultivo do fungo *T. tonsurans* sp em MS.

<b>ANOVA</b>						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,038882	1	0,038882	15552,6	2,48E-08	7,71
Dentro dos grupos	1E-05	4	2,5E-06			
<b>Total</b>	<b>0,038892</b>	<b>5</b>				

**Tabela 34:** Análise de Variância (ANOVA), com nível de significância de 0,05%, entre os extratos AcOEt 4 dias e MeOH 7 dias, na concentração de 5,0mg/mL, obtido do cultivo do fungo *T. tonsurans* sp em MCM.

<b>ANOVA</b>						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,666E-05	1	1,6667E-05	1,22	0,3314159	7,71
Dentro dos grupos	5,466E-05	4	1,3667E-05			
<b>Total</b>	<b>7,133E-05</b>	<b>5</b>				