
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ÁREA: MICROBIOLOGIA APLICADA)**

MATHEUS HENRIQUE REIS DA SILVA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS à *Passiflora incarnata* E
AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada)

Março - 2017

MATHEUS HENRIQUE REIS DA SILVA

**FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS à *Passiflora incarnata* E
AVALIAÇÃO DE SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, do
Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia
Aplicada).

Orientadora: Dra. Derlene Attili de Angelis

Março - 2017

589.2 Silva, Matheus Henrique Reis da
S586f Fungos endofíticos associados à Passiflora Incarnata e
avaliação de seu potencial biotecnológico / Matheus Henrique
Reis da Silva. - Rio Claro, 2017
111 f. : il., gráfs., fots., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Derlene Attili de Angelis

1. Fungos. 2. Antioxidante. 3. Compostos fenólicos. 4.
Flavonoides. 5. Saponinas. 6. Metabólitos Secundários. I.
Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

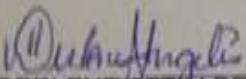
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

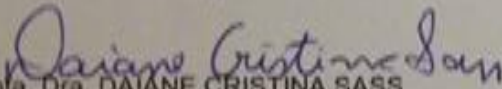
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS à *Passiflora incarnata*
POTENCIAIS PRODUTORES DE FLAVONOÍDES

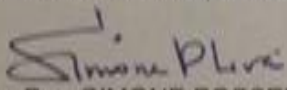
AUTOR: MATHEUS HENRIQUE REIS DA SILVA

ORIENTADORA: DERLENE ATTILI DE ANGELIS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. DERLENE ATTILI DE ANGELIS
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas / Universidade Estadual de Campinas


Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASSI
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro


Profa. Dra. SIMONE POSSELENTE DE LIRA
Universidade de São Paulo / Universidade de São Paulo

Rio Claro, 13 de março de 2017

Título alterado para: Fungos endofíticos associados à *Passiflora incarnata* e
avaliação de seu potencial biotecnológico

Dedico este trabalho a Deus, pela presença constante em minha vida, pela força e ajuda nos momentos difíceis.

Aos meus pais Angelo e Valmira, minha eterna gratidão, pelo exemplo de fé, pelo amor incondicional, pelo carinho, incentivo e orações.

À minha namorada e futura esposa Andreia, pelo amor, constante incentivo, companheirismo, paciência e pelas valiosas palavras sábias e de conforto.

AGRADECIMENTOS

Neste momento encerro mais um ciclo da minha vida, que foi marcado por muito esforço, renúncia, êxito, aprendizado e crescimento. O caminho que trilhei para chegar até aqui não fiz sozinho, mas com o auxílio de muitos e hoje sou grato a cada um, que direta ou indiretamente, cooperou para a realização deste sonho. A superação dos obstáculos e a alegria dessa conquista devo àqueles que sempre estiveram comigo, me apoiaram e acreditaram que isso seria possível:

Agradeço primeiramente a Deus, pela sua infinita graça e misericórdia, por ter permanecido ao meu lado em todos os momentos, sendo meu refúgio nas horas difíceis e fiel amigo, que tem realizado os anseios do meu coração, pois só Ele sabe todas as dificuldades que enfrentei. Sou grato pela fé inabalável que tenho em Deus, pois em muitos momentos ela me sustentou, para que os obstáculos do caminho não me fizessem desistir. A Ele seja toda honra!

Aos meus pais, Angelo e Valmira, pelo amor, companheirismo, afeto, orações, paciência, e especialmente, por todos os sacrifícios que fizeram para que eu pudesse realizar este sonho! Tudo que sou hoje devo a vocês, pois só nós sabemos o quão difícil foi chegar até aqui, mas com ajuda de Cristo, conseguimos!

Aos meus irmãos Paulo e Amanda, por torcerem por mim, apoiarem e acreditarem no meu sucesso!

À Andreia, minha namorada, por ser minha melhor amiga e confidente! Por ter permanecido ao meu lado, apesar da distância e da saudade! Agradeço por cada ligação, mensagem, palavra de incentivo e paciência. Por me apoiar nos momentos difíceis, preencher minha vida com amor e carinho, me proporcionando alegria e motivação! Sem você seria impossível! Obrigado por tudo! Te amo!

Aos meus familiares por todo apoio e incentivo, em especial minha tia Sirlene por sempre acreditar em mim e me ajudar.

À minha irmã e amiga, Aline Midori por sempre estar ao meu lado, por sua amizade, por todo apoio, compartilhamento de alegrias, tristezas e experiências de vida.

À minha orientadora, Dra. Derlene Attili de Angelis, pelo projeto de pesquisa, orientação, apoio e aprendizados adquiridos durante esses dois anos.

À Dra. Vera Lúcia Garcia por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório, me fazendo sentir em casa. Agradeço também pelo apoio e orientação com a parte química, incentivo e amizade.

À minha amiga Lusiane, por ter enriquecido meu projeto de pesquisa com suas valiosas dicas. Obrigado por todo apoio e amizade! Por compartilharmos, nestes últimos dois anos, muitos conhecimentos, alegrias, dificuldades e lições de vida. Sempre serei grato a você, ao seu esposo Daniel e ao Vitor, por tudo que vocês fizeram por mim!

Ao meu amigo Alison, pela amizade, compreensão, conselhos e orações! Sua presença me ajudou em momentos de adversidade, assim como seu testemunho de vida me fortaleceu em situações que fizeram o desânimo aparecer.

Aos amigos do laboratório da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica DQOF-CPQBA, Layany, Gabriely, Fábio e Adriana pelos bons momentos vividos. Especialmente ao químico Sinésio Boaventura, por todo o apoio, atenção e disposição em me auxiliar sempre que precisei.

Ao Dr. Adilson Sartoratto pelo auxílio na realização da CLAE-DAD e CG-EM, e alguns protocolos, e também no esclarecimento de algumas dúvidas que tive ao longo dos experimentos.

Ao meu primo Osmarzim pela amizade e por me hospedar em sua casa nas vezes em que precisei pernoitar em Campinas.

Ao Prof. Dr. Silvio Govone pela assistência com as análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Odanir Garcia Guerra, que ainda na graduação me deu a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, sendo ele a primeira pessoa a acreditar em mim como pesquisador! Gratidão é o que sinto por você, que além de orientador tornou-se um grande amigo!

Aos amigos que desde a graduação estão ao meu lado, Kátia Carla, José Paulo, Irídia e Jéssica Silvino.

Ao Instituto de Biociências e ao Centro de Estudos Ambientais (CEA) – Laboratório de Meio Ambiente da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

À Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis pelo apoio, suporte e auxílio para a realização deste trabalho.

À Divisão de Recursos Microbianos DRM-CPQBA, e seus funcionários, especialmente à técnica Milena Binatti por toda ajuda, conversas e amizade.

À empresa Centroflora, por disponibilizar as folhas de *P. incarnata*.

À direção e funcionários do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas - CPQBA.

Ao Centro de Estudo de Insetos Sociais (CEIS), na pessoa do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

À minha amiga Dra. Virgínia, pela ajuda com a parte de identificação molecular dos fungos, pelas conversas e convívio.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo, que foi muito importante para minha permanência em Rio Claro.

À FAPESP pelo financiamento deste projeto.

Ó profundidade da riqueza da sabedoria e do conhecimento de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e inescrutáveis os seus caminhos!

"Quem conheceu a mente do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro? "

"Quem primeiro lhe deu, para que Ele o recompense? "

Pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja a glória para sempre! Amém.

Romanos 11:33-36

Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar

Josué 1:9

RESUMO

Passiflora incarnata encontra-se entre as plantas medicinais mais estudadas no âmbito farmacológico, cujas propriedades medicinais são atribuídas principalmente aos seus fitoconstituintes, tais como compostos fenólicos, alcalóides e flavonoides. Já foi constatado que os fungos endofíticos, aqueles vivem no interior de plantas, compartilhando com as mesmas uma interação simbiótica. Estes endófitos estão presentes em todas as plantas e muitas vezes partilham dos mesmos metabólitos que sua hospedeira. Devido ao seu enorme potencial de exploração, os fungos endofíticos 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 para esses organismos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi isolar fungos endofíticos presentes em folhas de *P. incarnata* e avaliar seu potencial biotecnológico, quanto à presença de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. Das 120 folhas analisadas, um total de 315 fungos endofíticos foi obtido; foi possível identificar 16 táxons distintos, dentre eles *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Curvularia* spp., *Phoma* spp., *Neurospora* spp., *Trichoderma* spp e representantes dos Mucoromycotina. A maioria dos isolados não apresentou esporulação. Os 60 endófitos utilizados nos ensaios produziram ao menos um composto fitoquímico, 60% (n=36) foram positivos para saponinas, 76% (n=46) para flavonoides, 93% (n=56) para compostos fenólicos, apenas 3% (n=2) para taninos, e nenhum fungo apresentou alcalóides no filtrado. O teor de flavonoides e fenóis totais do extrato de n-Butanol, determinado espectrofotometricamente revelou que a maioria dos fungos analisados foram bons produtores destes compostos, com destaque para os isolados *Trichoderma* sp./LMA 1684 e *Aspergillus* sp. 1/LMA 1720, com 213,69 mg.g⁻¹ e 187,3 mg.g⁻¹, respectivamente, para flavonoides totais expressos em rutina, enquanto para fenóis totais os isolados LMA 1713 e LMA 1824, ambos fungos não esporulantes, apresentaram os teores 184,94 mg.g⁻¹ e 187,05 mg.g⁻¹, respectivamente. Todos os endófitos apresentaram atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH. O extrato butanólico do fungo *Aspergillus versicolor*/LMA 1705 (94%) foi maior que o padrão BHT (90,27%) e rutina (91,98%). A fração AcOEt e BuOH de cinco fungos selecionados apresentou metabólitos com atividade antioxidante, entre as amostras, a fração BuOH do fungo *Trichoderma* sp./LMA 1684 mostrou a atividade de eliminação do radical livre DPPH mais baixa (valor de IC₅₀ de 304,18 mg/mL), enquanto a fração AcOEt do fungo *Chaetomium* sp./LMA 1793 com um valor de IC₅₀ de 0,21 mg/mL exibiu uma atividade antioxidante maior que os controles positivo BHT (0,42 mg/mL), Rutina (0,25 mg/mL), e Ácido Ascórbico (0,23 mg/mL). Foi realizada CG-EM da fração acetato de etila em cinco fungos previamente selecionados e foi constatada a presença do metabólito orcinol (3,19%) em *Aspergillus versicolor*/LMA 1705, 4-metoximetilfenol (4,79%), Sorbicillina (33,59%) e ergosterol (23,08%), presentes em *Trichoderma* sp./LMA 1684 e isopropenil-1,4-dimetil-1,2,3,3a,4,5,6,7-octahidroazuleno no endófito *Fusarium* sp. 4. O estudo mostrou um grande potencial de aplicação em biotecnologia dos endofíticos de *P. incarnata*.

Palavras-chave: Antioxidante. Compostos fenólicos. Flavonoides. Saponinas. Metabólitos Secundários.

ABSTRACT

Passiflora incarnata is among the most studied medicinal plants in the pharmacological field, whose medicinal properties are attributed mainly to its phytochemicals, such as phenolic compounds, alkaloids and flavonoids. It has been found that endophytic fungi, which are those living inside plants, share a symbiotic interaction with their hosts. These endophytes are present in all plants and often share the same metabolites as the plants they live. Due to their enormous potential for exploitation, endophytic fungi are considered one of the most important resources for obtaining new therapeutic agents, since a large number of structurally new and biologically active metabolites have been reported from these microorganisms. In this context, the objective of this work was to isolate endophytic fungi present in leaves of *P. incarnata* and to evaluate their biotechnological potential, regarding the presence of phytochemicals, phenolic compounds, flavonoids and antioxidant activity. From a total of 120 leaves analyzed 315 endophytic fungi were obtained. It was possible to identify 16 distinct taxa, among them *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Curvularia* spp., *Phoma* spp., *Neurospora* spp., *Trichoderma* spp. and Mucoromycotina representatives. Many showed no sporulation at all. All 60 endophytes used in the trials produced at least one phytochemical compound, 60% (n = 36) were positive for saponin, 76% (n = 46) for flavonoids, 93% (n = 56) for phenolic compounds, only 3% (n = 2) for tannins, and no one presented alkali in the filtrate. The total flavonoid and phenol contents of the n-Butanol extract, spectrophotometrically determined, showed that most of the analyzed fungi were good producers of these compounds, especially the isolate *Trichoderma* sp./LMA 1684 and *Aspergillus* sp. 1/LMA 1720 213.69 mg.g⁻¹ and 187.3 mg.g⁻¹ respectively, for total flavonoids expressed in rutin, and for total phenols the isolate LMA sp. 6 and LMA sp. 26 with 184.94 mg.g⁻¹ and 187.05 mg.g⁻¹ respectively. All endophytes presented antioxidant activity against free radical DPPH. Butanolic extract of the fungus *Aspergillus versicolor*/LMA 1720 (94%) was higher than the BHT (90.27%) and rutin (91.98%) standard. The AcOEt and BuOH fraction of five fungi presented metabolites with antioxidant activity, among the samples, the BuOH fraction of the *Trichoderma* sp./LMA 1684. showed the lowest free radical DPPH elimination activity (IC₅₀ value of 304.18 mg/mL), while the AcOEt fraction of *Chaetomium* sp./LMA 1793 with an IC₅₀ value of 0.21 mg/mL showed better antioxidant activity than the BHT (0.42 mg/mL), rutin (0.25 mg/mL), and ascorbic acid (0.23 mg/mL). CG-MS of the ethyl acetate fraction was performed in five previously selected fungi and the presence of the orcinol (3.19%) in *Aspergillus versicolor*/LMA 1705, 4-methoxymethylphenol (4.79%), Sorbicillin (33.59%) and ergosterol (23.08%), present in *Trichoderma* sp./LMA 1684 and isopropenyl-1,4-dimethyl-1,2,3,3a, 4,5,6,7-octahydroazulene in the endophyte *Fusarium* sp. 4/LMA 1719. This study highlighted a great biotechnological application of the *P. incarnata* endophytes.

Keywords: Antioxidant. Phenolic compounds. Flavonoids. Saponins. Secondary metabolites

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ágar Aveia
Aa	Atividade antioxidante
ABS	Absorbância
Ác.	Ácido
AcOEt	Acetato de etila
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
B.O.D	Biochemical Oxygen Demand
BDA	Batata-Dextrose Ágar
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
BuOH	Butanol
Cal.	Calculado
CBS	Fungal Biodiversity Centre (The Netherlands)
CCD	Cromatografia por Camada Delgada
CEA	Centro de Estudos Ambientais
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de Massas
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos
cm	Centímetros
CPMA	Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônia
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DQOF	Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica
EAG	Expressos em ácido gálico
EO	Estresse oxidativo
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FeCl ₃	Cloreto férrico
Fen. T.	Fenóis totais
Flav.	Favonoides
FNE	Fungo não esporulante
g	grama (s)
h	Horas
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	ácido clorídrico
He	Hélio
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
ITS	Espaçador transcrito interno
L	Litro
LC-MS/MS	Liquid Chromatography– Mass Spectrometry
LMA	Laboratório de Microbiologia Ambiental
m/v	Massa/volume
MA	Ágar Malte
MeOH	Metanol
mg	Miligramas

mg.g-1	Miligramas por mililitros
min	Minutos
mM	milimolar
MM	Massa Molecular
Mo	Molibdênio
NaOCl	Hipoclorito de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanômetros
°C	Graus Celsius
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	<i>Passiflora incarnata</i>
Rf	Fator de retenção
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
S/A	Sociedade Anônima
SP	São Paulo
sp.	Espécie
spp.	Espécies
TBE	Tris - Borato EDTA
TE	Tomada de ensaio
UNESP:	Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UV	Ultravioleta
V	Volts
V	Volume
W	Tungstênio
λ	Lambda
μ	micro
μ g	microgramas
μ M	micromolar
μ L	microlitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Gênero <i>Passiflora</i>	15
2.1.1. <i>Passiflora incarnata</i>	16
2.2. Micro-organismos endofíticos	17
2.2.1. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas.....	18
2.3. Metabólitos secundários	19
2.3.1. Compostos fenólicos	20
2.3.2. Flavonoides	21
2.3.3. Antioxidantes	23
2.3.4. Saponinas	24
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Coleta do material vegetal.....	27
4.2. Isolamento dos fungos endofíticos	29
4.3. Identificação e caracterização dos isolados	30
4.3.1. Identificação e caracterização morfológica	30
4.3.2. Caracterização molecular.....	30
4.4. Bioprospecção dos isolados fúngicos.....	31
4.4.1. Preparação do extrato fúngico	31
4.4.2. Triagem das principais classes de substâncias químicas presentes nos filtrados	32
4.4.3. Teor de flavonoides totais, compostos fenólicos e atividade antioxidante	33
4.5. Caracterização preliminar do perfil químico por meio de métodos analíticos dos fungos endofíticos que apresentaram melhores resultados.....	39
4.5.1. Determinação do IC50.....	39
4.5.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	39
4.5.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos – (CLAE-DAD)	40
4.5.4. Cromatografia gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)	41
4.6. Análises químicas nas folhas de <i>P. incarnata</i>	41
4.6.1. Obtenção do extrato etanólico e determinação de flavonoides totais	42
4.6.2. Análise fitoquímica preliminar	44
4.6.3. Teor de compostos fenólicos.....	44
4.6.4. Estimativa da atividade antioxidante no extrato etanólico de <i>P. incarnata</i>	44
4.6.5. Análise cromatográfica do extrato metanólico de <i>P. incarnata</i>	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. Fungos endofíticos isolados de <i>P. incarnata</i>	45
5.2. Bioprospecção dos isolados fúngicos	47
5.3. Caracterização preliminar do perfil químico por meio de métodos analíticos dos fungos endofíticos selecionado.....	58
5.3.1 Análises cromatográficas	63
5.4. Análises químicas nas folhas de <i>P. incarnata</i>	70
6. CONCLUSÃO	79
7. PERSPECTIVAS.....	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE A	101

1. INTRODUÇÃO

Os fungos apresentam uma grande variedade de modos de vida, merecendo destaque o endofitismo. Tal associação é importante pois pode apresentar grande diversidade química e o ineditismo de moléculas e de suas atividades biológicas. Sabe-se que todas as plantas hospedam ao menos um tipo de fungo endofítico, e que os metabólitos secundários desses micro-organismos estão diretamente relacionados com a sua planta hospedeira (GONTHIER et al., 2006; KRINGS et al., 2007). Apesar disso, poucas espécies vegetais foram estudadas completamente em relação à sua biologia endofítica até o momento (BARROS, 2003; VAZ et al., 2014). Buscar a utilização destes micro-organismos como fontes destes compostos é uma estratégia interessante e relevante para o progresso da biotecnologia.

Os metabólitos secundários possuem diversas funções fisiológicas, muitas das quais comuns tanto às plantas como aos micro-organismos. Estudos anteriores no sentido de explorar a diversidade botânica para buscar novos fármacos levou à descoberta de isolados microbianos capazes de sintetizar compostos bioativos inicialmente considerados exclusivamente vegetais. Nos últimos 25 anos, a evidência de que todas as plantas são habitadas por uma comunidade microbiana, e a contínua constatação de que esta é capaz de produzir os metabólitos de sua planta hospedeira, despertou a pesquisa por endofíticos com potencial aplicação em áreas como a indústria farmacêutica, agrônômica, alimentícia e química (NICOLETTI; FIORENTINO, 2015).

Assim como muitas outras plantas medicinais, a espécie *Passiflora incarnata* L. (maracujá) não possui sua microbiota endofítica caracterizada, nem relatos na literatura sobre isolamento e bioprospecção de seus fungos. A planta é utilizada principalmente como sedativa, tranquilizante e antiespasmódica, dentre outros, sendo uma das mais estudadas no âmbito farmacológico, principalmente no que diz respeito ao uso de suas folhas (DHAWAN et al., 2001). As principais substâncias bioativas em *P. incarnata* são compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, C-glicosídeos derivados de apigenina e luteolina (vitexina, isovitexina, orientina, isoorientina) e alcaloides (MÜLLER, 2005).

Segundo Aguiar (2007) muitas empresas podem perder até 50% do teor dos metabólitos desejados durante as etapas de processamento do vegetal, principalmente na lavagem ou remoção das partes da planta. A adoção de estratégias que visem reduzir essas perdas ou descobrir novas formas de aumentar a síntese desses metabólitos na própria planta é extremamente interessante. Testar o potencial de produção desses compostos por micro-organismos endofíticos é um caminho viável e recomendado na literatura.

A busca por novos produtos para as indústrias farmacêuticas e agroquímicas é um processo contínuo. A exploração de substratos naturais constitui a estratégia de maior sucesso para a descoberta de novas moléculas de importância industrial e biotecnológica. Neste contexto, o presente trabalho objetivou conhecer a diversidade de fungos endofíticos presentes no maracujá (*P. incarnata*) mediante seu isolamento a partir das folhas, e verificar as potencialidades biotecnológicas dos isolados quanto à produção de moléculas bioativas como compostos fenólicos, flavonoides, saponinas e compostos com atividade antioxidante. Para tal, houve ainda a necessidade de rever metodologias de extração e análise, o que colaborará para fundamentar projetos futuros inseridos neste contexto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gênero *Passiflora*

O gênero *Passiflora* é o mais representativo da família Passifloraceae, com um total de 400 a 530 espécies (SCHOTSMANS; FISCHER, 2011; ULMER; MACDOUGAL, 2004; DHAWAN, 2004; JUDD et al., 2009; BERNACCI, et al., 2003). Ele é encontrado em regiões temperadas e tropicais, principalmente no continente americano, com destaque para a América do Sul, onde há mais indivíduos pertencentes ao gênero, enquanto os demais estão distribuídos em algumas localidades da Ásia e Oceania (MACDOUGAL, 1994; MCGUIRE, 1999; ULMER; MACDOUGAL, 2004; CRONQUIST, 1981).

As espécies do gênero *Passiflora* são popularmente conhecidas como maracujás, cujo nome é proveniente da língua tupi. De acordo com Zeraik et al. (2010) essa palavra significa “fruto de sorver” ou “polpa que se toma de sorvo”, enquanto Faleiro et al. (2005) sugere que é “alimento em forma de cuia”. Mas a planta também é conhecida como “flor-da-paixão, pois a morfologia de suas flores representaria os símbolos da Paixão de Cristo (HOEHNE, 1937; SOUZA; MELETTI, 1997; FALEIRO et al., 2005).

As plantas do gênero *Passiflora* possuem propriedades ansiolítica, sedativa (BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2000; AKHONDZADEH et al., 2001), antioxidante (COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; ZERAIK et al., 2010), anti-inflamatória (BENICÁ et al., 2007), antimicrobiana (MAHADY et al., 2005; MOANASUNDARI et al., 2007), cicatrizante (GONÇALVES FILHO et al., 2006; DA SILVA et al., 2006), antitussígena (DAHAWAN et al., 2003), anti-hipertensiva (ICHIMURA et al., 2006), diurética, analgésica, vermífuga e antitumoral, além de serem utilizadas no tratamento de dependência química, obesidade, controle de tremores e distúrbios nervosos (DHAWAN et al., 2004; COSTA; TUPINAMBÁ, 2005; ZERAIK et al., 2010 apud SOZO, 2014), pois agem sobre o Sistema Nervoso Central (DHAWAN et al., 2003).

Existe um grande número de espécies do gênero *Passiflora* e até o momento nenhuma dessas espécies possuem caracterização de sua microbiota endofítica nem mesmo as três espécies que apresentam interesse comercial (*P. edulis*, *P. alata* e *P. incarnata*). Conhecida como maracujá azedo, *P. edulis* é muito apreciada pela qualidade de sua polpa, sendo usada principalmente na produção de bebidas. *P. alata*, popularmente chamada de maracujá doce, também possui uma polpa muito valorizada, tem o extrato de suas folhas incluído em diversos fármacos e é utilizada para ornamentação (DOYAMA et al., 2005). Finalmente, *P.*

incarnata apresenta maior destaque na produção de vários fitoterápicos, sendo muito estudada para tal aplicação (GOSMANN et al., 2011).

2.1.1. *Passiflora incarnata*

A espécie *P. incarnata* é originária da América do Norte, nativa da região sudeste dos Estados Unidos, e adaptada a invernos rigorosos. É muito utilizada na ornamentação de jardins, devido à beleza de suas flores, e apresenta grande importância farmacêutica em razão de suas propriedades medicinais (DHAWANETAL et al., 2004; CENTROFLORA, 2011; MCGUIRE, 1998). Constitui planta trepadeira, herbácea, que se expande com o auxílio de gavinhas. Conhecida como maracujá-vermelho, silvestre ou *maypop*, como é denominada nos EUA, possui folhas simples, alternas e com bordas serrilhadas, que medem de 6 a 15 cm de comprimento. Suas flores são grandes, perfumadas, brancas na parte adaxial das pétalas e sépalas, de coloração branca, azul clara, lavanda, rosa e/ou roxa na região da corola, que possui diversos filamentos (Figura 1). Os frutos são ovais, do tipo baga, de cor verde clara e polpa branca (LORENZI, 2002; CENTROFLORA, 2011; COFFEY, 1993; MACDOUGAL, 1994; MCGUIRE, 1998; BRUCKNER; PICANÇO, 2001).

Figura 1 – Aspectos morfológicos da flor, folha e fruto de *P. incarnata*



Fonte: arquivos pessoais (2016).

No Brasil o cultivo da espécie é voltado à comercialização das folhas em razão de suas propriedades farmacológicas, como o Grupo Centroflora de Botucatu, por exemplo, que comercializa seus extratos vegetais (CAMPOS et al., 2014). A baixa produção e o sabor não muito agradável dos frutos desfavorecem o valor comercial dos mesmos (BRUCKNER; PICANÇO, 2001; MCGUIRE, 1998; REIMBERG, 2006).

Alonso (1998) afirma que nas folhas de *P. incarnata* há alcalóides, aminoácidos, carboidratos, cianoglicosídeos, compostos voláteis, fenóis e maltol, todavia os flavonoides são os mais abundantes chegando a 2,5% dos metabólitos secundários, em particular as C-glicosil-flavanas derivadas da isovitexina, iso-orientina, vicentina e leucenina (RAFFAELLI et al., 1997; LORENZI; 2002; MARCHART et al., 2003). As concentrações podem oscilar, como acontece com a isovitexina das folhas que é maior no período pré-floração e durante sua ocorrência (SCHILCHER, 1968; MENGHINI; MANCINI, 1988; ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2002).

O maracujá vermelho é usado em diversas preparações farmacêuticas, em combinação com outras drogas (TANKANOW et al., 2003). Além do efeito sedativo e ansiolítico, testes clínicos com *P. incarnata* mostraram boa resposta no tratamento preventivo dos sintomas da síndrome de abstinência de opiáceos (AKHONDZADEH, et al., 2001). Fica evidente que as diversas utilizações desta planta como fitoterápica (SPERONI; MINGHETTI, 1988; DHAWAN et al., 2004; SOUSA et al., 2008), em uma sociedade cada dia mais estressada e com inúmeros problemas de ansiedade, justificam o interesse e os estudos sobre esta espécie vegetal.

2.2. Micro-organismos endofíticos

O termo “endofítico”, originalmente introduzido por de Bary (1866), refere-se a qualquer organismo que vive no interior de tecidos vegetais vivos. Os micro-organismos endofíticos eram considerados seres microscópicos que habitavam o interior de tecidos vegetais aéreos (em pelo menos uma parte do seu ciclo vital), mas sem causar danos aparentes à planta hospedeira (CARROLL, 1986; PETRINI et al., 1991).

Uma definição mais recente de endófitos afirma que estes são micro-organismos (cultiváveis ou não) que vivem no interior de tecidos vegetais vivos, de forma a não prejudicar o hospedeiro e sem emitir estruturas externas, diferentemente de bactérias nodulantes e fungos micorrízicos (AZEVEDO; ARAÚJO, 2006). Evidências sugerem que as associações entre vegetais e endófitos podem ter evoluído a partir do surgimento das plantas superiores na Terra (REDECKER et al., 2000).

Somente a partir da década de 80 os estudos sobre a microbiota endofítica intensificaram-se, devido à necessidade de uma melhor compreensão acerca da fisiologia, genética, ecologia e interações entre vegetais e endófitos (BARROS, 2003). Conforme

mencionado por Firaková et al. (2007), todas as espécies vegetais estudadas, até a publicação de seu trabalho, haviam apresentado micro-organismos endofíticos.

A produção de metabólitos de interesse biotecnológico constitui fator relevante na escolha de uma planta como alvo de estudo, pois é possível que o endófito tenha adquirido geneticamente a capacidade de produzir biomoléculas durante sua co-evolução com o vegetal. Segundo Azevedo (1999), a capacidade que os endófitos possuem de produzir compostos bioativos originalmente produzidos pela planta, facilita a produção da substância de interesse por fermentação industrial, protegendo desta maneira, plantas de crescimento lento. Existem espécies vegetais cujas comunidades endofíticas já foram caracterizadas: *Triticum aestivum* (LARRAN et al., 2002); *Dicksonia sellwiana* (BARROS., 2003); *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* (SOUZA et al., 2004); *Bactris gasipaes* (ALMEIDA et al., 2005); *Glycine max* (KUKLINSKY-SOBRAAL et al., 2005); *Citrus limon* (DURÁN et al., 2005); *Lithachne pauciflora* (HIGGINS et al., 2014); *Oplismenus hirtellus* (HIGGINS et al., 2014); *Panicum pilosum* (HIGGINS et al., 2014); *Luma apiculata* (VAZ et al., 2014).

Bactérias do gênero *Erwinia*, ocorrem no interior da soja e produzem metabólitos que protegem a planta contra o ataque do fitopatógeno *Pseudomonas syringae* pr. *glycinea* (VLOT et al., 2009). Outro exemplo bem elucidado foi a descoberta do anticancerígeno paclitaxel (taxol), o qual inicialmente foi encontrado e extraído da espécie *Taxus brevifolia* (LEDWITCH et al., 2013), até que Stierle et al. (1993) isolaram o composto do fungo *Taxomyces andreanae*, um endofítico da planta. O mesmo ocorreu com o antitumoral podofilotoxina (EYBERGER et al., 2006), o inseticida azadiractina (KUSARI et al., 2012) e os antidepressivos hiperina e emodina (KUSARI et al., 2008).

2.2.1. Fungos endofíticos: biodiversidade e aplicações biotecnológicas

Os endófitos ainda são pouco explorados apesar de constituírem uma fonte praticamente inesgotável de produtos naturais bioativos (GUNATILAK, 2006; STANIEK; WOERDENBAG; KAYSER, 2008; KOUSARI; SPITELLER, 2010). Pesquisas voltadas ao estudo da microbiota endofítica também permitem a descoberta de gêneros e espécies ainda não descritas, que podem ser potenciais produtores de alguma molécula de interesse biotecnológico (GUNATILAKA, 2006). Segundo Strobel e Daisy (2003), alguns micro-organismos podem mimetizar a química de sua planta hospedeira, de modo que são capazes de produzir o mesmo produto natural da planta.

Metabólitos secundários já isolados de fungos endofíticos pertencem aos mais variados grupos estruturais, dos quais destacam-se: esteroides, terpenoides, xantonas, fenóis (dentre eles os flavonoides), isocumarinas, derivados perilenos, quinonas, furandionas, depsipeptídeos e citocalasinas, por exemplo (SCHULZ; BOYLE, 2005; QIU et al., 2010). Conforme Strobel e Daisy (2003), alguns desses compostos apresentaram funções biológicas antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirais, anti-helmínticas, antitumorais, antimaláricas, anti-inflamatórias, laxativas, antidiabéticas e imunossupressoras. Alguns desses metabólitos podem, inclusive, ser utilizados em processos de controle biológico e biorremediação (GUO et al., 2008).

Fungos endofíticos também podem produzir uma ampla quantidade de enzimas tais como proteases, celulasas, lipases e outras, com diversas aplicações industriais, principalmente na indústria têxtil (amilase, celulase, oxidorreduções), de detergentes (protease, lipase, celulase, oxidorreduções), de alimentos (pectinase, protease, celulase, oxidorreduções), de papel (xilanase, oxidorreduções e lipase) e de couro (protease, lipase) (NIELSEN; XENBOLL, 1998; FRIEDRICH et al., 1999).

Neste contexto, muitas espécies de plantas medicinais também são bioprospectadas para endófitos, para averiguar a capacidade desses micro-organismos em produzir um ou mais metabólitos secundários presentes no hospedeiro (KOUSARI; SPITELLER, 2011). A espécie *Hypericum perforatum* produz um composto antidepressivo chamado hipericina, que também é produzido por um de seus fungos endofíticos (BROCKMANN et al., 1950; KUSARI et al., 2008, 2012). Em *Juniperus communis* há endófitos que também sintetizam a desoxipodofilotoxina, substância utilizada na produção de medicamentos anticarcinogênicos (KUSARI et al., 2009; HARTWELL et al., 1953). Já em *Daphnopsis Americana*, um diterpenoide, com ação antimicrobiana, foi isolado de fungos endofíticos associados (SINGH et al., 2000).

2.3. Metabólitos secundários

Assim são denominados os compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos. Ao contrário dos primários, a ausência de metabólitos secundários não resulta na morte imediata do indivíduo, mas frequentemente têm um papel importante nas defesas vegetais contra a herbivoria e outras defesas inter-específicas (DEMAIN; FANG, 2000). As possibilidades geneticamente codificadas para a produção de metabólitos secundários, os estímulos da

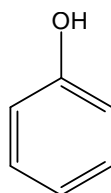
produção e as fitotoxinas especiais determinam, basicamente, as interações entre fungos e plantas hospedeiras (PUSZTAHELYI et al., 2015). Como resultado, o metabolismo secundário de plantas e fungos tem gerado pesquisa de grande impacto, inclusive para a produção de polifenóis, alcaloides, saponinas e aqueles com atividade antioxidante, os quais possuem ampla aplicação biotecnológica.

2.3.1. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (Figura 2). Essas moléculas estão amplamente distribuídas no reino vegetal e nos micro-organismos, mas às vezes podem estar presentes em uma única planta ou fungo (SOARES, 2002; PATIL et al., 2015; CARVALHO et al., 2010).

Eles exibem várias propriedades farmacológicas: tem função antialérgica, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica, cardioprotetora e vasodilatadora (MIDDLETON; KANDASWAMI, 1994; BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; SAMMAN; LYONS WALL; COOK, 1998; PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001). Além disso, são excelentes antioxidantes, pois devido as suas propriedades de oxido reductoras podem combater os radicais livres, quelar metais de transição, interromper a propagação dos radicais livres na oxidação lipídica, modificar o potencial redox do meio e reparam lesões de moléculas atacadas por radicais livres (PODSEDEK, 2007; KYUNGMI; EBELER, 2008; DEL-RÉ; JORGE, 2012).

Figura 2 - Estrutura básica dos fenóis



Fonte: arquivos pessoais (2017).

Os compostos fenólicos são classificados da seguinte maneira: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídas na natureza. Além disso, são divididos em dois grupos: flavonoides e derivados, ácidos fenólicos e cumarinas. (RIBÉREAU-GAYON, 1968; CARVALHO et al., 2010). Entre aqueles classificados como pouco distribuídos na natureza

encontram-se os fenóis simples, pirocatecol, hidroquinona e resorcinol, além de aldeídos derivados de ácido benzóico, um constituinte de óleos essenciais, como a vanilina. Apesar de serem encontrados com certa frequência, esses compostos apresentam-se em número reduzido (SOARES, 2002).

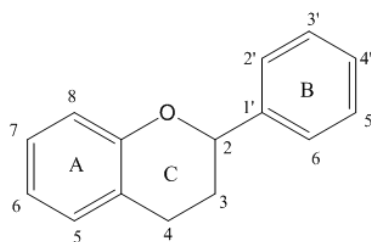
Os polímeros são representados pelos taninos e ligninas que não se apresentam em forma livre nos tecidos vegetais. Os taninos, por exemplo, são compostos fenólicos de alto peso molecular que podem ser classificados em dois grupos, de acordo com seu tipo estrutural: taninos hidrossolúveis e condensados (SANTOS; MELLO, 2010).

Os compostos fenólicos, largamente distribuídos na natureza, são os flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas (KING; YOUNG, 1999). Os flavonoides apresentam grande importância medicinal e econômica, pois exibem diversas ações sobre sistemas biológicos, como atividade antioxidante e anti-inflamatória (PELZER et al., 1998; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; GARCIA-LAFUENTE et al., 2009).

2.3.2 Flavonoides

Flavonoides são metabólitos secundários, sintetizados por plantas e alguns fungos (TAIZ; ZEIGER, 2013; QIU et al., 2010) e nos vegetais são responsáveis pela pigmentação (como vermelho e azul), pela atração de polinizadores, pela proteção contra a radiação ultravioleta, patógenos, herbívoros, entre outras funções (HARBORNE; WILLIAMS, 2000; HEIM, TAGLIAFERRO, BOBILYA, 2002; FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012). São os compostos fenólicos mais diversificados, apresentam estrutura básica formada por C6-C3-C6 (Figura 3).

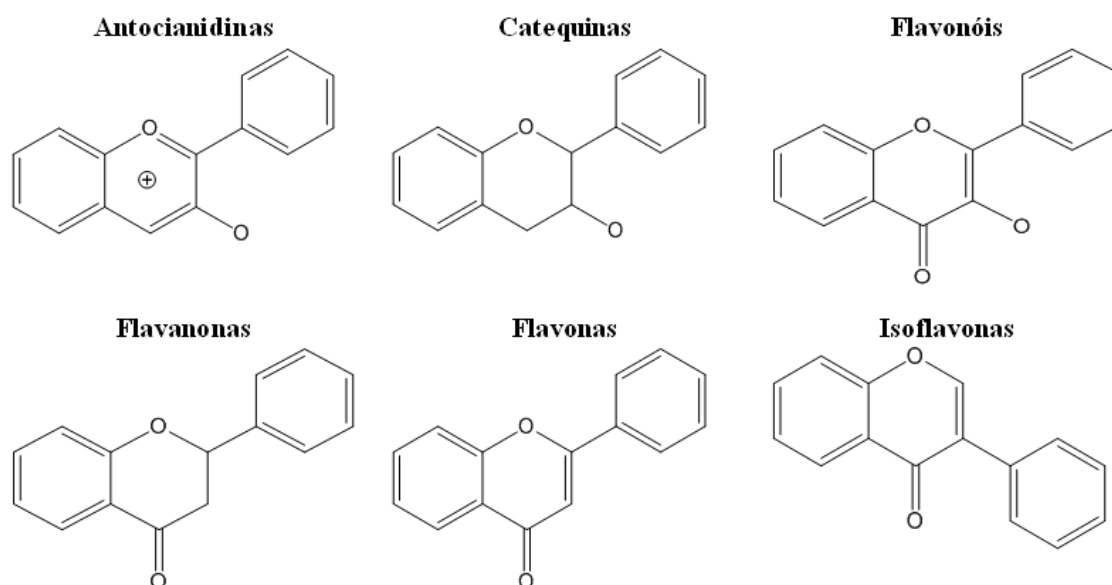
Figura 3 - Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: arquivos pessoais (2017).

Ja foram descritos mais de 8.000 tipos desse composto. E entre eles as antocianidinas, catequinas, flavonóis, flavononas, flavonas e isoflavonas constituem as principais classes deste metabólito (Figura 4) (BRAVO, 1998; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Figura 4 – Principais classes de flavonoides.



Fonte: arquivos pessoais (2017).

Essas biomoléculas apresentam propriedades farmacológicas diversas e de interesse biotecnológico como: atividade anti-inflamatória, de efeito valodilatador, ação antialérgica, antitumoral, antimicrobiana, antiviral, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica e antiplaquetária (LIN et al., 1997).

Entre suas principais funções destacam-se as propriedades antioxidantes. Segundo Nawar (1985) os flavonoides e outros derivados fenólicos agem durante o início e a propagação do processo oxidativo, atuando por sinergismo com outros antioxidantes, pois capturam e neutralizam agentes oxidantes como o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila ou radical peróxido. Apesar da eficácia de compostos fenólicos, e alguns de seus derivados na prevenção da oxidação lipídica, poucos tem seu uso autorizado em diversos setores da indústria (de alimentação, farmacêutica e cosméticos) em decorrência de sua alta toxicidade (SHAHIDI et al., 1992).

A literatura relata a biossíntese desses compostos por diversas linhagens de fungos endofíticos, com possibilidade de aplicação biotecnológica dos mesmos, uma vez que são fontes naturais dessas substâncias. Huang et al. (2010) isolou estirpes do gênero *Fusarium* sp.

capazes de produzir tectorigenina (6-metoxi-5,7,4'-tri-hidroxisoflavona) e outras isoflavonas. O flavonoide Kaempferol foi encontrado em *Mucor fragilis*, presente em rizomas de *Sinopodophyllum hexandrum* (Berberidaceae) (HUANG et al., 2014) e em *Fusarium chlamydosporum*, extraídos do caule de *Tylophora indica* (Apocynaceae) (CHATURVEDI et al., 2014). Enquanto Gao et al. (2012) constatou que o endófito *Chaetomium globosum*, isolado de *Cajanus cajan*, sintetizou apigenina (4', 5,7-tri-hidroxisoflavona).

2.3.3. Antioxidantes

Radicais livres são compostos oxidantes, que se formam naturalmente durante a ocorrência de reações metabólicas, ou devido a exposição a fatores exógenos. Eles capturam elétrons de biomoléculas para adquirir estabilidade e por isso são eletricamente instáveis. Essa instabilidade pode desencadear um efeito cascata, em razão do desequilíbrio entre mecanismos pró-oxidantes e antioxidantes, provocando o chamado estresse oxidativo (EO) que nada mais é do que o aumento na concentração desses compostos (KRISHNAMURTHY; WADHWANI, 2012; CHITRA; PILLAI, 2002; SLATER, 1984).

De acordo com a literatura, o estresse oxidativo provoca danos celulares, o que leva ao processo de envelhecimento e desenvolvimento de patologias diversas, tais como câncer, diabetes, doença de Alzheimer, acidente vascular cerebral, ataque cardíaco e aterosclerose (SIES, 1985; WORTHINGTON BIOCHEMICAL, 2009; KRISHNAMURTHY; WADHWANI, 2012).

Segundo Halliwell (2000), “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”, ou seja, são compostos capazes de atrasar ou inibir o processo oxidativo. Essas moléculas também têm demonstrado uma infinidade de atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antiparasitária, antifúngica entre outras. Elas podem ser produzidas pelo próprio organismo, ou ser ingeridas por meio da alimentação, como é o caso de algumas vitaminas (E, C e pró-vitamina-A) e compostos fenólicos (flavonoides e poliflavonoides) presentes nos alimentos, especialmente os de origem vegetal. Além de seus benefícios à saúde, os antioxidantes também são muito utilizados na indústria, pois evitam a oxidação de produtos diversos tais como fármacos, cosméticos e alimentos (PIETTA, 2000; HALLIWELL et al., 1995; FAURÉ et al., 1985; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A substituição de antioxidantes sintéticos por naturais é vantajosa, tanto pelos benefícios à saúde quanto pela sua funcionalidade. Estudos relatam que antioxidantes naturais

apresentam maior solubilidade em água e óleo, são úteis no preparo de emulsões e outras formulações, além de permitir um melhor aproveitamento de resíduos alimentares como folhas, sementes e cascas (DORKO, 1994; OLIVEIRA et al., 2009)

Os antioxidantes naturais estão presentes em plantas, tecidos animais e micro-organismos, como os fungos endofíticos. A literatura reporta a ocorrência de vários fungos endofíticos produtores de biomoléculas com ação antioxidante. Entre os endófitos já descritos com este potencial, encontram-se espécies como *Penicillium* sp., *Aspergillus candidus*, *Mortierella*, *Emericella falconensis*, *Acremonium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Antrodia camphorata*, *Chaetomium* sp. e *Cladosporium* sp. (PERRON; BRUMAGHIM, 2009; RIOS et al., 2006; HUANG et al., 2007; MOON et al., 2006; SONG; YEN, 2002; ARORA; CHANDRA, 2010). Nesse sentido, entende-se que mais pesquisas relacionadas aos compostos bioativos produzidos pelos fungos necessitam ser realizadas, para incrementar os conhecimentos relacionados a esses seres vivos, bem como permitir a descoberta e utilização de novos antioxidantes naturais.

2.3.4. Saponinas

Saponinas são glicosídeos, que possuem em sua estrutura uma aglicona esteroidal ou triterpenóide, ligada a uma ou mais cadeias de açúcar. Quando são agitadas em água formam espuma, e por esse motivo recebem tal denominação (do latim *sapo* = sabão). Elas são moléculas amplamente distribuídas no Reino Vegetal, ocorrendo em cerca de 100 famílias botânicas, onde atuam, principalmente, como agentes antipatogênicos (OLESZEK, 2000; KALINOWSKA et al., 2005; GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAG; BALSEVICH; MAZZA, 2007; OLESZEK; HAMED, 2010).

Oleszek e Hamed (2010) citam diversas propriedades e aplicações das saponinas, pois atuam como agentes tensoativos, espumantes, emulsificantes e solubilizantes. Além disso, esses compostos também exibem propriedades biológicas, relacionadas com atividades anticancerígenas, antioxidantes, redutoras de colesterol, hepatoprotetoras, antivirais, antifúngicas e antibacterianas, o que desperta o interesse de vários setores da indústria (alimentícia farmacêutica e cosmética).

Para melhor atender a demandas da população humana, os tensoativos naturais foram substituídos por produtos sintéticos, entretanto, eles apresentam um tempo de degradação muito lento, e podem ter efeitos nocivos sobre a saúde, de modo que é crescente o interesse pela síntese e uso de agentes tensoativos naturais, que causem menos danos ao meio

ambiente. Todavia, o fornecimento desses compostos a partir de plantas é limitado, pois nem todas apresentam um potente efeito surfactante, e muitas vezes a oferta dos mesmos é menor em relação às necessidades de mercado (OLESZEK; HAMED, 2010).

Além dos vegetais alguns fungos endofíticos são capazes de sintetizar estes compostos bioativos derivados das plantas, o que pode aumentar a disponibilidade dessas substâncias para a indústria, especialmente a farmacêutica. Há registros da biossíntese de saponinas por *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Cladosporium* sp., e *Fusarium* sp. (DHANKHAR et al. 2012; GOVINDAPPA et al., 2011; SADANANDA et al., 2011; KARUNAI; BALAGENGATHARATHILAGAM, 2014; LUO, et al., 2013), o que representa um importante avanço na possibilidade de aplicação industrial desses compostos, e consequente substituição de produtos artificiais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar fungos endofíticos associados às folhas de *Passiflora incarnata* e avaliar seu potencial biotecnológico.

3.2 Objetivos específicos

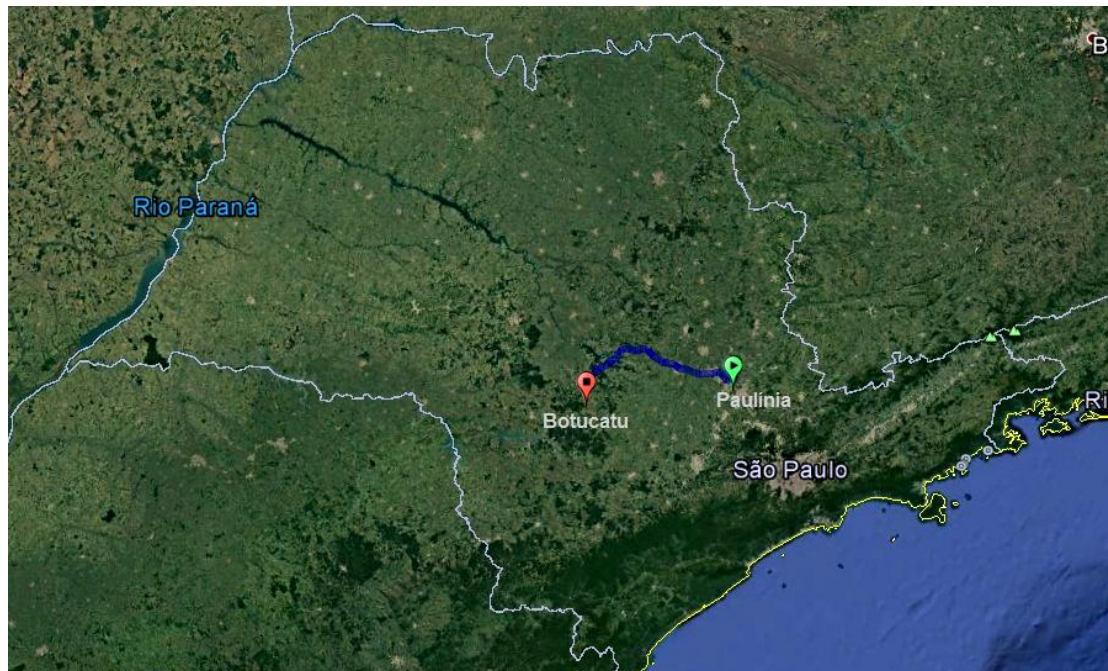
- Analisar as principais classes de metabólitos químicos presentes nos filtrados fúngicos;
- Quantificar espectrofotometricamente o teor de flavonoides dos isolados fúngicos;
- Quantificar os compostos fenólicos totais presentes nos filtrados fúngicos;
- Analisar a atividade antioxidante dos extratos produzidos pelos endófitos;
- Realizar uma caracterização preliminar do perfil químico por meio de métodos analíticos dos extratos dos fungos endofíticos que apresentaram melhores resultados;
- Quantificar os compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos etanólicos de folhas de *P. incarnata*;
- Identificar os isolados de maior potencial e depositá-los na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria, CBMAI, UNICAMP.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta do material vegetal

Indivíduos de *P. incarnata* foram amostrados nos municípios de Paulínia e Botucatu, SP (Figura 5). A primeira coleta foi realizada em 06 de dezembro de 2015, no campo experimental da Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas - CPMA, localizado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas - CPQBA/Unicamp, em Paulínia-SP (área 1, Figura 6). A segunda coleta ocorreu no dia 21 de janeiro de 2016, em 3 áreas de cultivo pertencentes ao Grupo Centroflora S/A, em Botucatu –SP (áreas 2-4, Figura 7). Em cada área foram amostradas seis plantas (Tabela 1) e de cada uma destas foram retiradas dez folhas, totalizando de sessenta amostras por área, no total foram amostrados 24 espécimes de *P. incarnata*. As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos individualizados, etiquetados e mantidos sob refrigeração até o processamento no Laboratório de Microbiologia Ambiental – LMA (UNESP - Rio Claro).

Figura 5 – Localização dos municípios de Paulínia e Botucatu, dentro do estado de São Paulo, onde foram realizadas as coletas.



Fonte: Google Earth (2016).

Figura 6 – Vista aérea do campo experimental da CPMA/CPQBA (Unicamp), Paulínia-SP.



Fonte: Google Earth (2016).

Tabela 1 – Dados referentes às plantas de *P. incarnata* coletadas.

Código	Data de coleta	Município	Coordenadas geográficas	
A1-1 ^a	06/12/2015	Paulínia - SP	22°47'53.37"S	47°06'42.25"W
A1-2 ^a	06/12/2015	Paulínia - SP	22°47'53.37"S	47°06'42.22"W
A1-3 ^a	06/12/2015	Paulínia - SP	22°47'53.22"S	47°06'42.16"W
A1-4 ^a	06/12/2015	Paulínia - SP	22°47'53.27"S	47°06'42.19"W
A1-5 ^a	06/12/2015	Paulínia - SP	22°47'53.16"S	47°06'42.10"W
A1-6 ^a	06/12/2015	Paulínia - SP	22°47'53.09"S	47°06'42.06"W
A2-1b	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'18.40"S	48°34'04.20"W
A2-2b	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'18.46"S	48°34'04.69"W
A2-3b	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'18.63"S	48°34'04.97"W
A2-4b	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'18.27"S	48°34'07.53"W
A2-5b	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'16.72"S	48°34'06.54"W
A2-6b	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'15.50"S	48°34'08.64"W
A3-1c	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'14.64"S	48°34'06.31"W
A3-2c	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'15.50"S	48°34'09.01"W
A3-3c	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'14.29"S	48°34'09.68"W
A3-4c	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'14.85"S	48°34'09.92"W
A3-5c	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'16.16"S	48°34'09.40"W
A3-6c	21/01/2016	Botucatu - SP	22°56'13.15"S	48°34'10.45"W
A4-1d	21/01/2016	Botucatu - SP	22°55'47.60"S	48°33'53.90"W
A4-2d	21/01/2016	Botucatu - SP	22°55'49.03"S	48°33'53.04"W
A4-3d	21/01/2016	Botucatu - SP	22°55'49.31"S	48°33'52.48"W
A4-4d	21/01/2016	Botucatu - SP	22°55'50.94"S	48°33'53.04"W
A4-5d	21/01/2016	Botucatu - SP	22°55'52.45"S	48°33'53.41"W
A4-6d	21/01/2016	Botucatu - SP	22°55'53.15"S	48°33'54.60"W

Fonte: Elaborado pelo autor (2016).

A1: campo experimental CPMA, Paulínia – SP;

A2, A2 e A3: áreas de cultivo utilizadas pelo Grupo Centroflora, no município de Botucatu;

Os números e as letras em minúsculo referem-se aos diferentes indivíduos coletados em cada área.

Figura 7 – Vista aérea da zona de cultivo do Grupo Centroflora, Botucatu - SP.



Fonte: Google Earth (2016).

4.2. Isolamento dos fungos endofíticos

Foram selecionadas cinco folhas, das 10 coletadas inicialmente, aparentemente saudáveis, lavadas em água corrente para remoção de impurezas e, em seguida, colocadas sobre papel toalha para a retirada do excesso de água (SOUZA et al., 2004). Posteriormente, as folhas foram submetidas ao processo de desinfecção superficial, por meio de imersão durante um minuto em água destilada esterilizada, um minuto em etanol 70%, 3 minutos em NaOCl (3%), 30 segundos em etanol 70%, e por último 3 lavagens em água destilada esterilizada. Como controle do processo de desinfecção, alíquotas de água da última lavagem foram semeadas sobre Ágar Malte 2% (MA 2%, Acumedia) e Batata-Dextrose Ágar (BDA, Acumedia), cujas placas foram incubadas a 28°C para avaliação da eficiência do processo (ARAÚJO et al., 2010; SCHULZ; BOYLE, 2005).

Após desinfecção, fragmentos de 0,5 cm de diâmetro foram cortados de cada folha e cinco a cinco foram inoculados em meio ágar Batata dextrose (BDA), Ágar Malte 2% (MA 2%) e Ágar Aveia (AA), contendo sulfato de estreptomicina (20 µg/mL). As amostras foram plaqueadas em quintuplicata, totalizando 25 fragmentos por meio de cultivo, à temperatura de 28°C durante 20 dias. As placas foram observadas diariamente e uma vez detectado o crescimento de hifas, estas foram transferidas para outras placas contendo BDA e incubadas nas mesmas condições, visando a purificação dos isolados. As culturas de fungos purificadas foram preservadas pelas técnicas de Castellani e criopreservação a -20°C, em glicerol 20%.

4.3. Identificação e caracterização dos isolados

4.3.1. Identificação e caracterização morfológica

Os isolados obtidos foram inicialmente agrupados em tipos morfológicos com base em observações macro e microscópicas, com auxílio de estereomicroscópio e microscopia óptica mediante montagem úmida com lactofenol. Foram analisadas superfície e borda das colônias, coloração, septações das hifas, estruturas de reprodução e de resistência, dentre outras. A caracterização dos isolados foi realizada por meio do uso de chaves e manuais de identificação, de acordo com o grupo taxonômico do fungo (ELLIS, 1976; DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1993; WATANABE, 2002).

Quando necessário, foi utilizado o método de Riddell (ou técnica de microcultivo), onde um pequeno bloco de ágar inoculado é colocado no centro de uma lâmina esterilizada, e coberto com uma lamínula estéril. Este conjunto foi mantido no interior de uma câmara úmida, constituída de uma placa de Petri com um pedaço de algodão umedecido em água destilada esterilizada, sobre dois palitos de madeira esterilizados (modificado de CROUS et al., 2009).

4.3.2. Caracterização molecular

4.3.2.1. Extração do DNA genômico

O DNA genômico dos isolados foi extraído com lise física das células, utilizando-se microesferas de vidros (425-600 µm de diâmetro, Sigma) e CTAB (modificado de MOELLER et al., 1992; GERARDO et al., 2004).

4.3.2.2. Amplificação da região ITS

Foi feita a amplificação da região ITS dos fungos utilizando-se a metodologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e o DNA genômico extraído como molde. Os primers utilizados para a reação foram ITS-1 e ITS-4 (WHITE et al., 1990). A amplificação foi conduzida em termociclador programado para uma desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação 95°C por 30s; anelamento a 62°C por 1min; extensão a 72 °C por 2 min e extensão final a 72°C por 5 min. Os produtos da PCR foram

detectados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris - Borato EDTA) 1X (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 2001), junto com o corante de corrida (Loading Dye) acrescido de GelRed na proporção 1:1 (amostra/solução corante). Em seguida foi realizada a corrida eletroforética a 36 V durante 30 minutos. Após esta etapa o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotografado. Os amplicons foram purificados em coluna (GFX PCR DNA e Gel Band Purification Kit, GE Healthcare).

4.3.2.3. Sequenciamento dos produtos da PCR

A reação de sequenciamento foi realizada com os primers ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). O programa empregado foi: 95 °C/1min, seguido de 28 ciclos a 95 °C/15s, 50 °C/45s, 60 °C/4min. Após a reação, todas as amostras seguiram para nova purificação, adaptada do manual de instruções do kit “DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit”, GE Healthcare® e aplicadas em sequenciador automático ABI 3130. As sequências forward e reverse, foram geradas e compiladas em contigs com ajuda do programa BioEdit, versão 7.0.5.3 (HALL 1999). Os contigs foram comparados às sequências depositadas no Genbank, banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e na base de dados do CBS – Fungal Biodiversity Centre (The Netherlands).

4.4. Bioprospecção dos isolados fúngicos

Todos os testes químicos realizados neste trabalho foram efetuados no laboratório da Divisão de Química Orgânica e Farmacêutica (DQOF), localizado no CPQBA-UNICAMP, Paulínia/SP, sob a supervisão da Dra. Vera Lucia Garcia e do Dr. Adilson Sartoratto.

4.4.1. Preparação do extrato fúngico

No sentido de otimizar os ensaios, houve uma seleção inicial dos fungos endofíticos que seriam bioprospectados neste trabalho, com base na pigmentação micelial e/ou produção de exsudatos no meio de cultivo. De acordo com a literatura consultada, os flavonoides possuem uma grande variedade de cores que partem do amarelo pálido a amarelo, mas também vermelho-alaranjado, vermelho vivo, roxo e azul; algumas poucas classes de flavonoides são incolores ou brancas (BROUILLARD; DANGLES, 1993; LÓPEZ et al., 2000). Assim, 60 isolados fúngicos foram selecionados para a triagem das principais classes

de compostos químicos, determinação de flavonoides totais, fenóis totais e atividade antioxidante. Todos os fungos prospectados apresentaram coloração branca, amarela, vermelha, laranja e roxa/lilás no micélio ou no meio de cultivo.

Os isolados foram cultivados por sete dias em placas com meio BDA, e após este período, 4-5 discos de 0,5 cm de ágar com micélio foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL para fermentação, utilizando-se 100 mL de caldo batata-dextrose (SOUZA et al., 2004; KHIRALLA et al., 2015). Os frascos foram incubados a 28 °C, a 120 rpm por 15 dias. Decorrido este tempo, o fermentado foi centrifugado a 7.500 rpm durante 10 min e filtrado a vácuo. O micélio e o filtrado foram armazenados a 4 °C em frascos âmbar para posteriormente serem utilizados nos ensaios químicos.

4.4.2. Triagem das principais classes de substâncias químicas presentes nos filtrados

A determinação das classes de compostos químicos foi realizada segundo o procedimento indicado por Matos (1997) com modificações, onde foram adicionados 4 mL de filtrado fúngico em seis tubos de ensaio.

4.4.2.1. Teste para alcaloide

No primeiro tubo contendo filtrado fúngico foram adicionadas três gotas do reagente de Mayer e no segundo três gotas do reagente de Dragendorff. Foram considerados como positivos aqueles que apresentaram formação de precipitado floculoso, indicando a presença de alcalóides no filtrado.

4.4.2.2. Teste para constituintes fenólicos

Em um dos tubos foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl_3 (cloreto férrico). A solução foi agitada e as possíveis alterações de cor ou formação de precipitado escuro foram observadas, após esse processo as amostras foram comparadas com o teste em branco constituído apenas por água e FeCl_3 . A coloração variável entre o azul e o vermelho indicou a presença de fenóis, quando o teste “branco” foi negativo. Precipitado escuro de tonalidade azul indicou a presença de taninos hidrolisáveis e verde de taninos condensados.

4.4.2.3. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides

O volume contido em um dos tubos de ensaio foi acidulado com solução de HCl 0,1N até pH 3, utilizando-se papel indicador universal. Os outros dois tubos de ensaio foram alcalinizados com solução de NaOH 0,1 N, o primeiro até pH 8,5 e o outro até pH 11.

Qualquer alteração na coloração do material, em função da mudança de pH indicou a presença de vários constituintes, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Padrão de variação de cores para os testes com variação de pH

Constituintes	Cor em meio		
	Ácido	Alcalino (pH 8,5)	Alcalino (pH 11)
Antocianinas e Antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavona, Flavonóis e Xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e Auronas	Vermelha	-	Vermelha-púrpura
Flavonoides	-	-	Vermelha-laranja

Fonte: Matos (1997).

4.4.2.4. Teste para saponinas

O último filtrado recebeu 2 mL de água destilada. O tubo foi agitado por aproximadamente dois minutos, e em seguida foi observada a formação de espuma: quando persistente e abundante (colarinho) o teste foi considerado positivo para a presença de saponinas (heterosídeos saponínicos).

4.4.3. Teor de flavonoides totais, compostos fenólicos e atividade antioxidante

4.4.3.1. Estimativa do teor de flavonoides totais

Para a quantificação de flavonoides totais foram inicialmente testados dois métodos baseados na espectrofotometria de absorção no visível (UV-Vis). Para tal foram utilizados os seguintes isolados: *Micélio estéril* sp. 12 (LMA 1650), *Fusarium* sp. 1 (LMA 1681) e *Trichoderma* sp. (LMA 1684).

(a) Método adaptado da Farmacopéia Européia (2008): os filtrados e os micélios foram liofilizados (-40 °C), e 0,1 g do liofilizado foi submetido à extração sob refluxo em banho-Maria por 30 minutos, com 20 mL de metanol 60% (V/V). O extrato foi resfriado em temperatura ambiente e o sobrenadante filtrado a vácuo. Adicionou-se ao resíduo 20 mL do mesmo solvente, que foi submetido ao refluxo por 10 minutos. As soluções extrativas resultantes foram colocadas em um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado com metanol 60% (V/V), solução mãe. Isoladamente, duas alíquotas de 2,5 mL da solução mãe foram transferidas para balões de fundo redondo de 20 mL. O primeiro balão foi colocado no rotaevaporador à 60 °C até sua total secura. Em seguida o resíduo foi ressuspensionado com adição, separadamente, de 2,5 mL de ácido fórmico, 2,5 mL de solução de ácido acético e metanol e 2,5 mL de ácido acético. Posteriormente, a solução foi transferida para um balão de 10 mL e o volume completado com ácido acético.

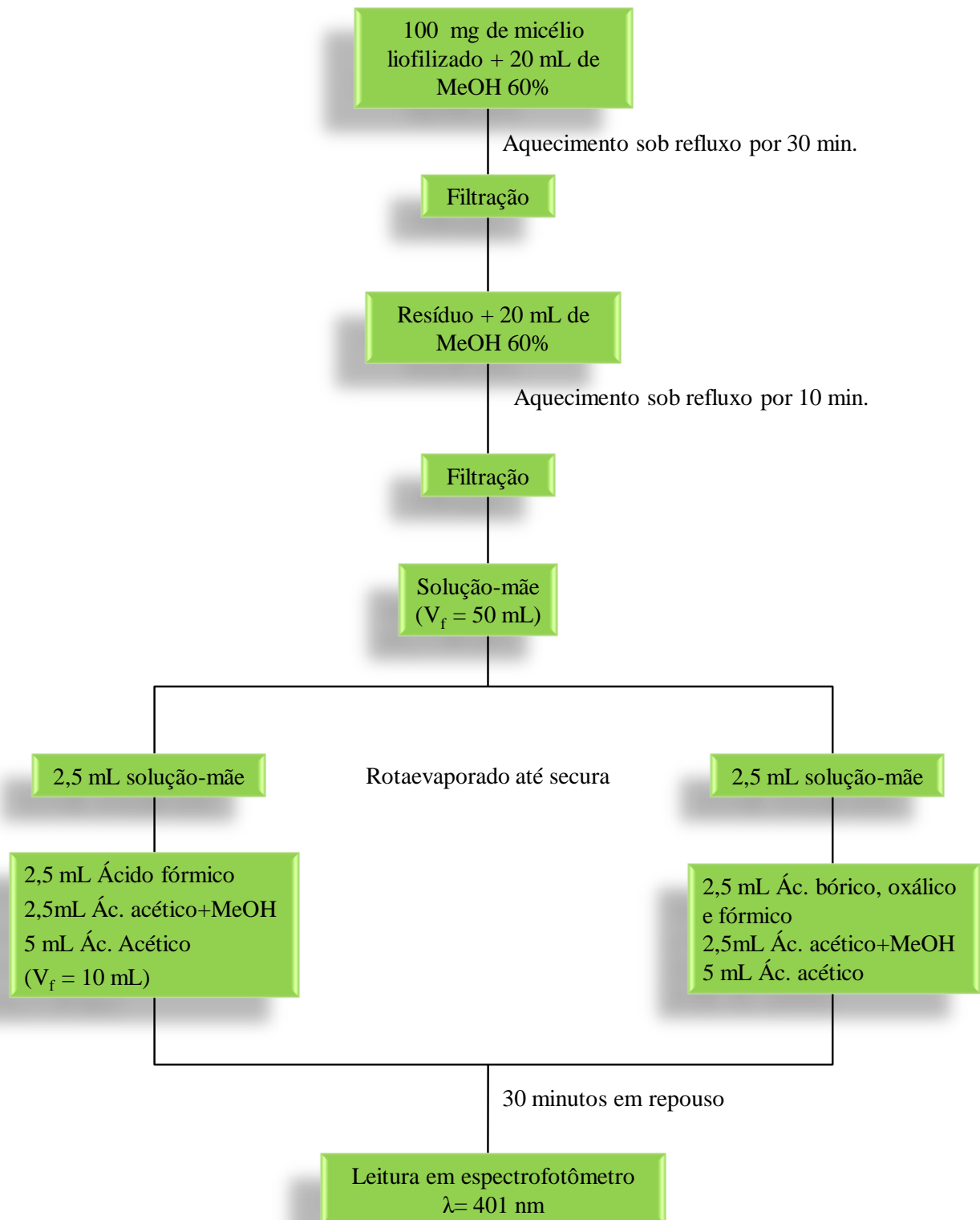
Uma solução teste foi preparada, utilizando-se o mesmo procedimento descrito acima para a solução de compensação, com diferenças apenas nas soluções adicionadas para ressuspender o resíduo. Neste caso, foi utilizado 2,5 mL de uma solução constituída por ácido bórico (0,25%), ácido oxálico (0,20%), diluídos em ácido fórmico, cujo volume foi completado com ácido acético anidro (solução a ser examinada). Após 30 minutos, uma leitura a 401 nm foi realizada, utilizando a solução de compensação como branco. O procedimento está representado no fluxograma (Figura 8).

O cálculo do teor de flavonoides totais foi realizado segundo a expressão:

$$\text{Flav.To.Cal.Vitexina} = (A \times 0.8) / \text{TE}$$

Sendo: A = Absorbância à 401 nm TE = Tomada de ensaio (g) = 0,1 g

Figura 8 - Método adaptado da Farmacopéia Européia (2008) e utilizado na quantificação de flavonoides totais de fungos endofíticos.

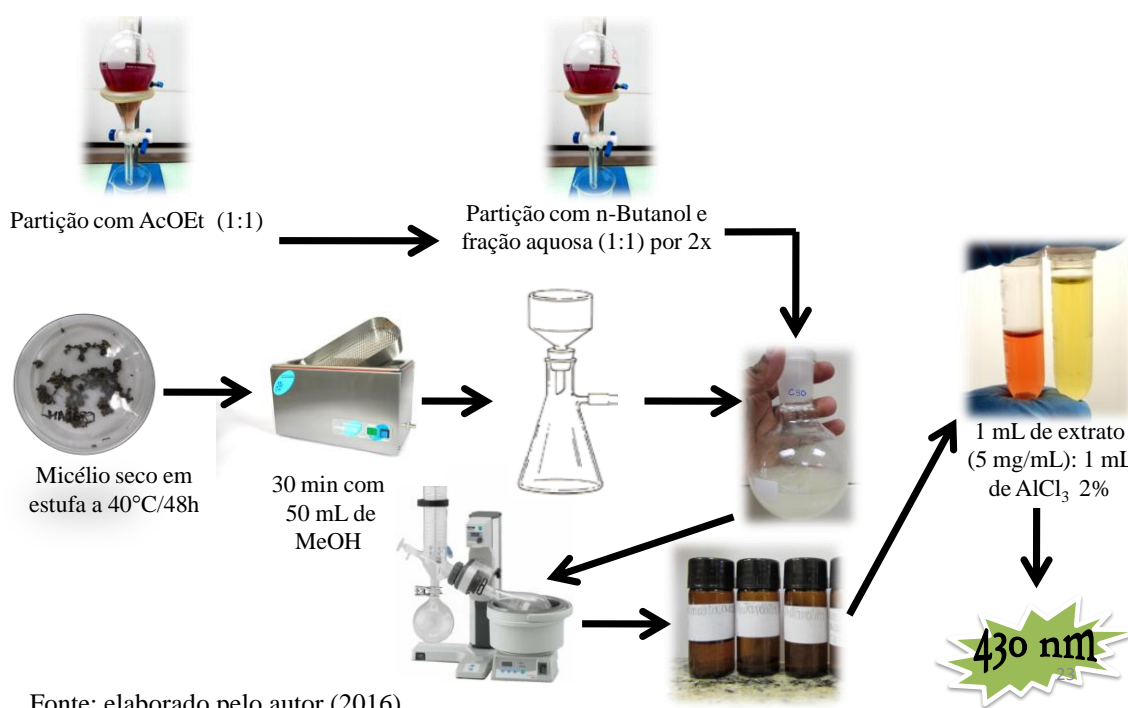


Fonte: elaborado pelo autor (2016).

(b) O segundo método testado foi adaptado da Farmacopéia Francesa, ZHAO et al. (2014) e CUI et al. (2015): inicialmente foi realizada a extração do fermentado, com o uso do método de partição líquido-líquido. Um volume igual de solvente orgânico foi adicionado ao filtrado (1:1). Primeiro foi feita a extração do filtrado com acetato de etila (AcOEt), originando a fração de acetato e a fração aquosa (meio), em seguida a fração aquosa (filtrado) foi extraída com n-Butanol (BuOH) por duas vezes, fornecendo a fração butanólica e aquosa. O micélio foi seco em estufa a 40 °C por 48h, em seguida 1 g do micélio foi colocado no ultrassom por 30 min, em 50 mL de metanol (MeOH) e posteriormente filtrado. Os diferentes extratos (AcOEt; BuOH e MeOH) foram transferidos para balões de fundo redondo e secos à vácuo em rotaevaporador, fornecendo as frações secas que foram dissolvidas em 5 mL de metanol e armazenadas a 4°C (LIU et al., 2007). Um total de 1mL (5 mg.g-1) de cada fração obtida foi misturada com 1 mL de solução metanólica de Cloreto de Alumínio a 2%. Após incubação por 30 min, a absorbância da reação foi mensurada a 430 nm. Foi construída uma curva analítica contendo 5, 10, 20, 40, 60 e 80 µg/mL de rutina (padrão Sigma®). Todas as análises foram realizadas em triplicata. O procedimento está representado no esquema da Figura 9.

Ao final, constatou-se que o método mais adequado para o estudo foi o segundo, e em posse dos resultados, optamos por utilizar, a partir de então, apenas o filtrado e o n-Butanol como solvente.

Figura 9 – Esquema representativo da obtenção dos extratos para determinação do teor de flavonoides totais

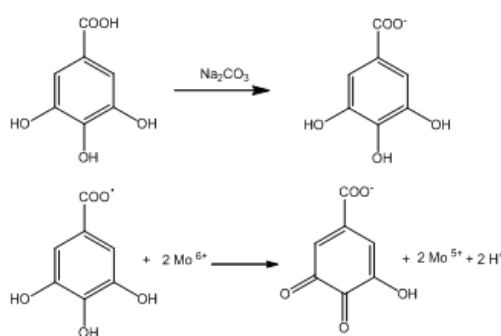


4.4.3.2 Estimativa do teor de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando-se ácido gálico como padrão de referência. O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos, formada a partir de heteropoli-ácidos fosfomolibdicos e fosfotúngsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). A Figura 10 mostra a desprotonação dos compostos fenólicos (no exemplo, o padrão ácido gálico) em meio básico, gerando os ânions fenolatos.

Uma alíquota de 0,5 mL (5 mg.g⁻¹) de cada amostra foi transferida para um tubo com tampa de rosca, onde foi adicionado 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada 1:10. As misturas permaneceram em repouso por 8 min e receberam a adição de 2 mL de carbonato de sódio a 4%. Os tubos foram deixados em repouso por 2 h ao abrigo da luz e, na sequência, foi realizada a leitura da absorbância a 765 nm. Metanol foi utilizado como branco, uma curva analítica contendo 100, 80, 60, 40, 20, 10 µg/mL de ácido gálico foi construída e os resultados expressos em mg EAG (equivalente em ácido gálico) (SINGLETON et al., 1965; MINUSSI et al., 2003). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 10 – Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu.



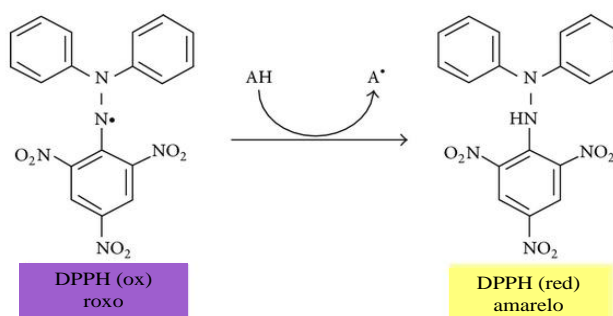
Fonte: Oliveira et al. (2009).

4.4.3.3 Estimativa da atividade antioxidante

Um dos métodos mais usados para determinar a atividade antioxidante, consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura que absorve a 517 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie

radicalar, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (Figura 11) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995)

Figura 11 – Redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (coloração roxa) à difenil-picril-hidrazina (coloração amarela).



Fonte: Teixeira et al. (2013).

A mistura de reação foi constituída por 100 μL da amostra (várias concentrações) e 2,9 mL de solução metanólica de DPPH (100 μM). Essa solução foi incubada no escuro por 30 min. A diminuição da absorbância foi mensurada à 517 nm. Uma mistura de 100 μL de metanol e 2,9 mL de solução de DPPH serviu como controle negativo. As substâncias de referência BHT (Butil-hidroxi-tolueno), Ácido ascórbico e Rutina, foram avaliadas nas mesmas concentrações (250 – 5000 $\mu\text{L}/\text{mL}$). A atividade sequestradora do radical, considerando a absorbância do controle negativo como 100%, foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$Aa = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$$

Onde:

Aa: atividade antioxidante (%).

ABS_{controle} : absorbância do controle negativo a 517 nm.

ABS_{amostra} : absorbância da amostra a 517 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5. Caracterização preliminar do perfil químico por meio de métodos analíticos dos fungos endofíticos que apresentaram melhores resultados

A partir dos resultados obtidos, foram selecionados cinco fungos que apresentaram os melhores percentuais de atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.

Os fungos selecionados foram: *Aspergillus versicolor* (LMA 1705), *Chaetomium* sp. (LMA 1793), *Fusarium* sp. 4 (LMA 1719), *Fusarium* sp. 5 (LMA 1721) e *Trichoderma* sp. (LMA 1684).

Os fungos citados acima foram reativados em BDA e posteriormente seguiu-se o método descrito para preparação do extrato fúngico como descrito no item 4.4.1, a fim de obtermos um maior rendimento do extrato bruto após secagem em rotaevaporador, foi fermentado 500 mL de meio líquido batata-dextrose em frascos Erlenmeyer de 1L.

Após a fermentação e filtração, o filtrado foi particionado duas vezes com AcOEt seguido de BuOH (1:1), posteriormente as frações AcOEt e BuOH foram rotaevaporadas até secura total. Em seguida foram novamente realizados os testes para flavonoides totais, compostos fenólicos e atividade antioxidante, como descrito no item 4.4.3, a fim de comparar estes compostos nos dois solventes orgânicos.

Para verificar se havia diferença estatística entre os resultados obtidos nas duas frações, foi aplicado de teste de Kruskal-Wallis.

4.5.1. Determinação do IC_{50}

A partir dos dados obtidos para atividade antioxidante, foi determinado o IC_{50} dos fungos selecionados e também das amostras de folhas de *P. incarnata*. De acordo com a literatura, os valores de IC_{50} que correspondem a concentração inibitória de 50% do radical livre DPPH•+, são utilizados para comparar a atividade antioxidante, e cujo menor valor de IC_{50} corresponde a maior atividade antioxidante. Para o cálculo do IC_{50} os gráficos da capacidade antioxidantes dos extratos fúngicos foram ajustados por regressão não-linear, utilizando-se o software Origin 8.

4.5.2. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os extratos acetato de etila e butanólico foram analisados por CCD, utilizando-se cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®) como fase estacionária. Os extratos fúngicos acetato de etila e butanol foram solubilizados em metanol na concentração de 10 mg.g⁻¹. Alíquotas dos extratos (20 µL) e da solução padrão (10 µL) foram adicionadas sobre a placa com o auxílio de micropipetas volumétricas, na forma de bandas. Foram utilizados dois sistemas de eluentes, com polaridades diferentes, como fase móvel.

O primeiro sistema de eluentes utilizado possuía fase móvel polar, constituída de acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26). A rotina foi utilizada como padrão. A placa foi desenvolvida à temperatura ambiente, seca em estufa à temperatura de 105 °C, e em seguida pulverizada com difenilborato de aminoetanol a 1% (m/v), seguido de uma solução de macrogol a 5% (m/v). Posteriormente, foi examinada sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) para visualização das bandas. Estes reveladores permitiram a observação de compostos fenólicos e flavonoides, que apresentam coloração azul, verde, laranja ou amarela (WAGNER; BLADT, 1996).

O segundo sistema de eluentes possuía fase móvel apolar, constituída por hexano e acetato de etila (70:30). A detecção dos compostos foi feita por observação sob luz UV a 254 e 366 nm e por revelação com solução de anisaldeído (ácido acético: ácido sulfúrico: anisaldeído 50,0:1,0:0,5 v/v) seguida de aquecimento a 105°C por 10 min, este revelador evidencia substâncias pertencentes a classe dos terpenos (WAGNER; BLADT, 1996).

4.5.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (DAD) - (CLAE-DAD)

O equipamento CLAE utilizado para as análises dos teores de flavonoides, apresentou as seguintes características: bomba quaternária com controlador de fluxo gradiente (modelo Waters ® 2695), detector de arranjo de diodos UV-Vis (modelo 2996).

O método utilizado foi adaptado de Costa et al. (2016). Em relação às condições analíticas, a temperatura foi de 30° C. A coluna utilizada foi XTerra MS C18 (150 x 2,1 mm, 5 µm), com gradiente composto por fase móvel “A” : 0,5% de ácido fórmico em água e fase móvel “B”, metanol; com programação de gradiente em função do tempo, informado na tabela 3.

Tabela 3- Gradiente utilizado para análise por CLAE onde “A” é composto por ácido fórmico a 0,5% em água e “B”, metanol.

Tempo (min)	Vazão (ml/min)	A (%)	B (%)
0	0,4	80	20
10	0,4	80	20
40	0,4	40	60
50	0,4	80	20
60	0,4	80	20

Com detecção em 340 nm e monitoramento da variação da absorvância no detector de arranjo de diodos (DAD) de 190-400 nm. Foram utilizados os padrões Sigma de orientina, iso-orientina, vitexina, isovitexina, luteolina e kaempferol. Os padrões foram preparados em metanol, em concentrações entre 66 a 129 $\mu\text{g/mL}$. O volume injetado dos padrões e das amostras foi de 10 μL .

4.5.4. Cromatografia gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas em um Cromatógrafo a gás Agilent, modelo 6890 N e detector de espectrometria de massas Agilent 5975, coluna HP5 – MS (J & W Scientific). As condições cromatográficas empregadas foram: Temperaturas: Injetor 280°C; detector 300°C; coluna 150°C /2 min, 5 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 240°C, 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 300°C por 34 min. O volume de injeção foi de 1,0 μL com vazão de gás de arraste (He) de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A identificação dos metabólitos foi realizada pela comparação dos espectros de massas disponíveis no banco de dados da biblioteca NIST (NIST 05).

4.6. Análises químicas nas folhas de *P. incarnata*

Para as análises químicas das folhas de *P. incarnata*, optou-se por utilizar as amostras das cinco plantas de onde os fungos endofíticos com melhores teores de flavonoides, fenóis e percentuais de atividade antioxidante haviam sido isolados. A Tabela 4 mostra a relação do espécime com seu respectivo fungo isolado. As folhas foram submetidas à secagem em estufa de ar circulante a 40 $^{\circ}\text{C}$ por sete dias, trituradas em moinho de facas e armazenadas à temperatura ambiente até a preparação dos extratos. Esclarece-se que logo após a realização das coletas foi feita a secagem e a moagem de uma amostra da parte aérea de cada área estudada.

Tabela 4- Relação do espécime com seu respectivo fungo isolado.

Área de coleta da planta	Espécime	Amostra	Fungo endofítico
A2	3b	PI-A	<i>Chaetomium</i> sp. (LMA 1793)
A2	4b	PI-B	<i>Aspergillus versicolor</i> (LMA 1705)
A2	5b	PI-C	<i>Fusarium</i> sp. 5 (LMA 1721)
A3	1c	PI-D	<i>Fusarium</i> sp. 4 (LMA 1719)
A3	4c	PI-E	<i>Trichoderma</i> sp. (LMA 1684)

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

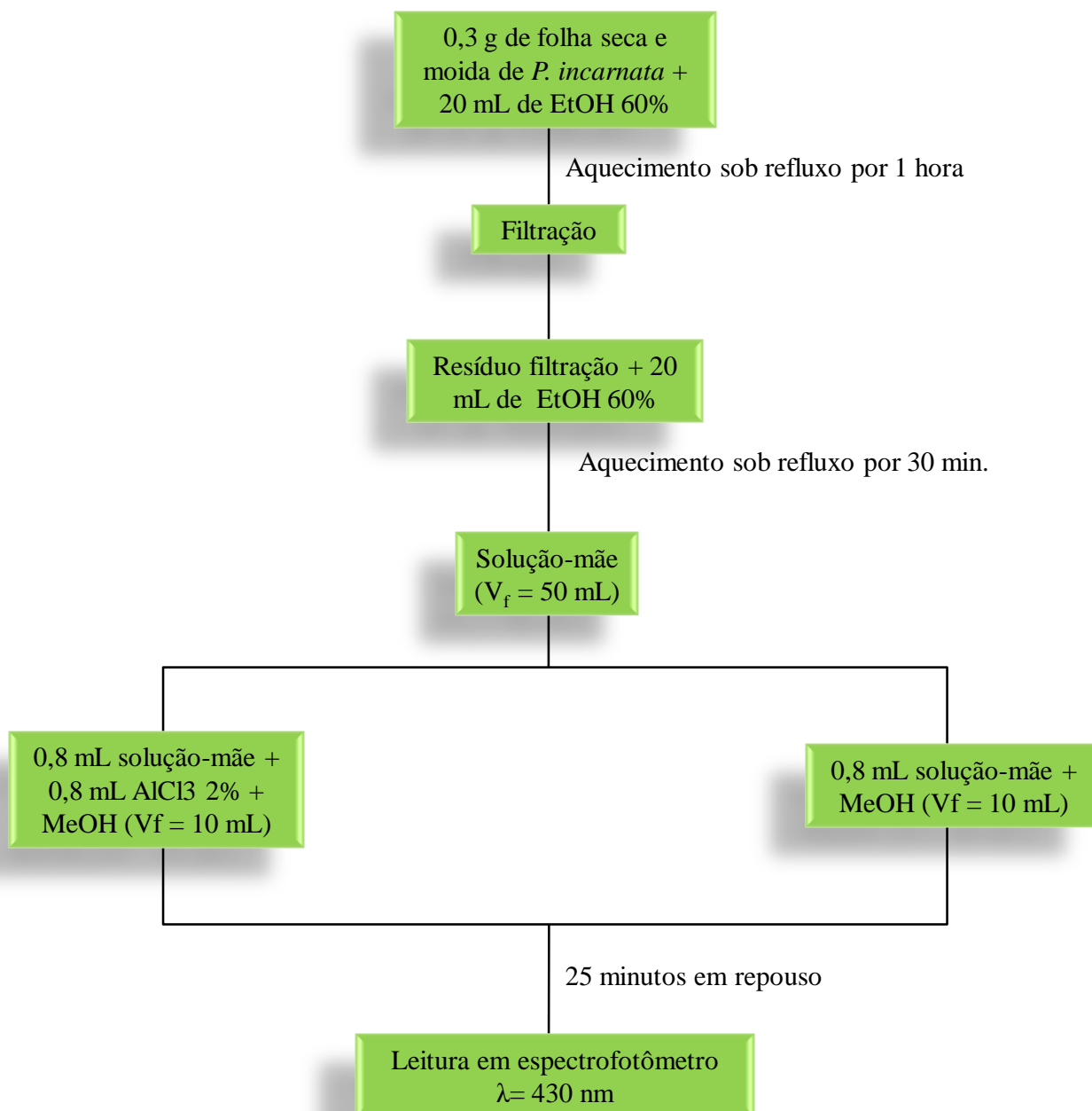
4.6.1. Obtenção do extrato etanólico e determinação de flavonoides totais

O método utilizado para determinação de flavonoides foi adaptado da Farmacopéia Francesa (2001). Pesou-se 0,3 g de material vegetal moído, de cada espécime, que foi submetido à extração sob refluxo em banho-Maria por 1 hora, com 20 mL de etanol a 60% (v/v). O sobrenadante foi filtrado em papel filtro e o extrato sofreu resfriamento em temperatura ambiente. Foram adicionados 20 mL de solvente ao resíduo da extração, que permaneceu sob refluxo durante 1 hora. Os extratos resultantes foram colocados em um balão volumétrico de 50 mL, cujo volume foi completado com etanol 60% (v/v), solução mãe.

Isoladamente, duas alíquotas com 0,8 mL de solução mãe foram colocadas em balões volumétricos de 10 mL cada. No primeiro balão o volume foi completado com metanol (solução de compensação). No segundo balão 0,8 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3) 2% (m/v) foram adicionados, e o volume final foi completado com metanol (solução a ser examinada). Decorridos 25 minutos, após a adição da solução de AlCl_3 2% (m/v) à amostra, a medida de absorbância a 430 nm (λ máximo da rutina) foi realizada, contra a solução de compensação. O procedimento está representado no fluxograma (Figura 12).

Para a quantificação dos flavonoides totais de *P. incarnata* foi construída uma curva analítica contendo 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 e 160 $\mu\text{g/mL}$ de rutina (padrão Sigma®). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Figura 12 - Método adaptado da Farmacopéia Francesa (2001) e utilizado na quantificação de flavonoides totais de folha de *P. incarnata*.



Fonte: Adaptado de Pozzi (2007).

Para verificar se havia diferença estatística no teor de flavonoides entre as cinco plantas analisadas foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

4.6.2. Análise fitoquímica preliminar

O extrato etanólico de *P. incarnata* foi submetido à triagem fitoquímica preliminar para detecção das principais classes de metabólitos secundários. Esta etapa foi realizada por meio de reações químicas que resultaram no desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, característico para cada classe de substâncias, utilizando-se os métodos propostos por Matos (1997), descritos no item 4.4.2. Vale ressaltar que para estes testes foram utilizados o extrato etanólico nos tubos de ensaio.

4.6.3. Teor de compostos fenólicos

Inicialmente, 20 mL do extrato etanólico foram concentrados em evaporador rotativo, e logo em seguida solubilizados em 5 mL de metanol, onde foram diluídos em uma concentração de 5 mg.g⁻¹. Após esta etapa, o teor de compostos fenólicos foi mensurado de acordo com o método descrito no subitem 4.4.3.2.

Para verificar se havia diferença estatística no teor de compostos fenólicos entre as cinco plantas analisadas foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

4.6.4. Estimativa da atividade antioxidante no extrato etanólico de *P. incarnata*

Utilizando o extrato metanólico obtido no item acima, este foi diluído em várias concentrações (100 µg/mL – 5000 µg/mL), após a diluição as amostras foram analisadas seguindo o método descrito no subitem 4.4.3.3.

4.6.5. Análise cromatográfica do extrato metanólico de *P. incarnata*

Foi utilizado CCD com sistema de eluentes de fase móvel polar (como descrito no item 4.5.2), com a finalidade de observar os flavonoides presentes no extrato etanólico e CLAE-DAD (como descrito no item 4.5.3) com o intuito de quantificar e identificar os flavonoides presentes no extrato etanólico.

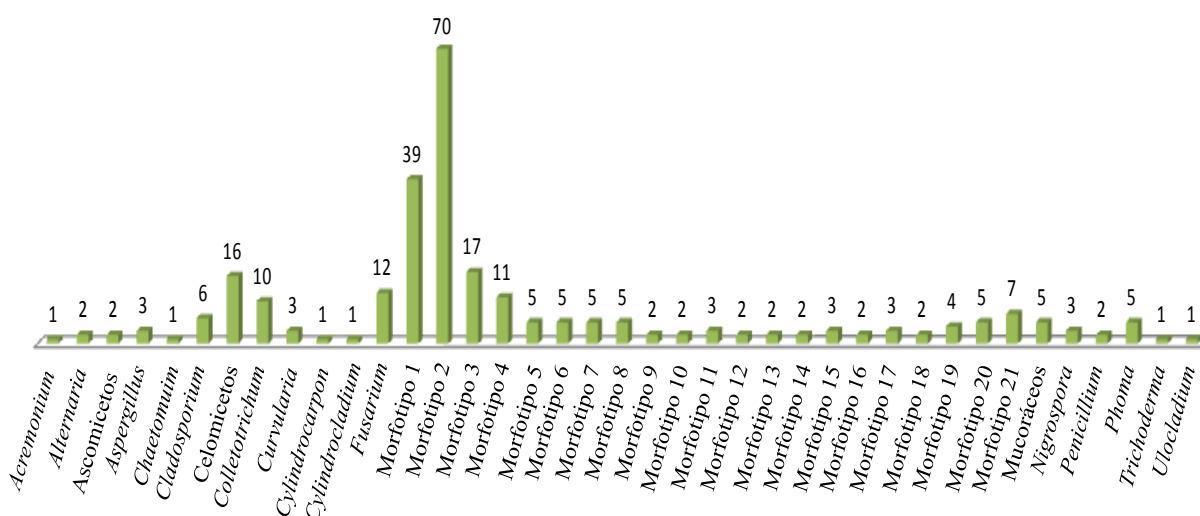
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Fungos endofíticos isolados de *P. incarnata*

No total foram avaliadas 120 folhas (5 por indivíduo), das quais obteve-se um total de 315 fungos: 43 isolados de plantas coletadas na CPMA (Paulínia/SP) e 272 daquelas coletadas na área de cultivo utilizada pela empresa Centroflora (Botucatu/SP). O processo de desinfecção dos micro-organismos epifíticos foi efetivo, pois não houve nenhum crescimento microbiano nas placas inoculadas com a água da última lavagem das folhas.

Quanto aos meios de cultivo utilizados para o isolamento, o BDA recuperou um maior número de isolados (n= 113) que os meios MA2% (n= 109) e Agar Aveia (n=93). Após a purificação das culturas e triagem morfológica macro e microscópica, dos 315 isolados, 13% (n = 42) apresentaram um único exemplar, o restando dos endófitos foram agrupados em 33 morfotipos, nos quais foram identificados 12 taxons. A maior diversidade de morfotipos e isolados únicos, foi proveniente do meio ágar batata dextrose. Não foi possível identificar morfológicamente 21 dos morfotipos observados, pois os representantes destes grupos não esporularam no meio de cultura. Uma vez que a classificação convencional de fungos depende da observação de suas estruturas reprodutivas, a falta de esporulação impossibilitou a identificação dos mesmos. Os táxons, os morfotipos e a ocorrência de cada isolado estão representados na Figura 13.

Figura 13 – Táxons/morfotipos dos fungos endofíticos isolados de *P. incarnata*



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

A maioria dos fungos não apresentou estruturas reprodutivas mesmo após o repique em ágar aveia e ágar água, que tiveram por finalidade estimular a esporulação dos isolados. A

alta ocorrência de formas vegetativas (estéreis) durante o isolamento de micro-organismos endofíticos, dificultando a identificação morfológica dos isolados, tem sido relatada na literatura por outros estudos (PROMPUTTHA et al., 2005; PIMENTEL; FIGURA; AUER, 2010; PAUL, 2014). Neste trabalho nos deparamos com a mesma dificuldade, ou seja, os fungos que apresentaram micélio não esporulante predominaram, e por isso foram agrupados em morfoespécies com base em suas aparências macroscópicas.

Márquez, Bills e Zabalgogezcoa (2007) conseguiram recuperar da gramínea *Dactylis glomerata* aproximadamente 1400 fungos, desse total apenas 18% (n=252) dos isolados obtidos produziram esporos em meio BDA durante o período de 6 a 8 semanas após o isolamento. Os restantes dos isolados produziram micélio estéril. Quando os isolados estéreis foram novamente plaqueados em meios adicionais, como ágar água com pedaços de folhas de *D. glomerata*, mais isolados conseguiram produzir esporos permitindo a identificação morfológica. No total, 53% (n=742) dos endófitos isolados puderam ser identificados por caracteres morfológicos. Devido sua especificidade e requisição de nutrientes específicos os fungos endofíticos não apresentam estruturas reprodutivas com facilidade. Esses dados corroboram com os obtidos em nosso estudo onde 75% (n=238) dos fungos isolados não produziram esporos nos meios de cultivo artificial.

Em um levantamento de fungos endofíticos de *Pinus tabulaeformis*, Wang et al. (2005) constataram que 11% dos isolados eram fungos não esporulantes, embora várias técnicas tenham sido empregadas para promover a esporulação. Estes micélios vegetativos foram agrupados em 74 morfotipos com base nas características macroscópicas (pigmentação, elevação do micélio, forma de crescimento) apresentadas pelas culturas fungicas.

Uma identificação molecular preliminar utilizando os primers ITS contribuiu para a identificação de mais alguns isolados distribuídos em quatro táxons, Ascomycota (LMA 1709), *Colletotrichum* (LMA 1687, LMA 1690, LMA 1691, LMA 1724 e LMA 1725), *Diaporthe* (LMA 1730) e *Fusarium* (LMA 1718, LMA 1719, LMA 1721 e LMA 1722)

Não há trabalhos anteriores que reportem o isolamento de fungos endofíticos no gênero *Passiflora*. O presente estudo é pioneiro tanto no tocante ao levantamento como na bioprospecção de linhagens fúngicas isoladas de *P. incarnata*. Contudo, há outras investigações sobre endofíticos a partir de plantas medicinais e de interesse econômico. Em seu trabalho com plantas medicinais (*Plectranthus barbatus*, *Vernonia condensata*, *Bauhinia forficata*, e outras onze espécies) Mussi-Dias et al. (2012) obtiveram 20 isolados fúngicos, encontrando os gêneros *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Nigrospora*, *Glomerella*, *Fusarium*, *Pestalotia* e *Trichoderma*.

Alguns táxons podem ser encontrados como endofíticos em diferentes espécies vegetais, principalmente aqueles reconhecidamente cosmopolitas com alta capacidade de dispersão e facilidade de crescimento em meio de cultura artificial. Huang et al. (2008), isolaram 1160 fungos endofíticos residentes em 29 plantas medicinais de sete famílias (Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Polygonaceae, Lamiaceae, Rubiaceae e Solanaceae), utilizando apenas taxonomia clássica para identificar seus isolados. Os táxons mais encontrados em seu estudo foram *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Phomopsis*, Xylariales e fungos não esporulantes, e assim como em nosso estudo, este último grupo teve a maior frequência de isolados (27,16%). Shankar et al. (2014) estudaram sete diferentes plantas medicinais obtendo um total de 3611 fungos, dos quais as formas não esporulantes predominaram com 10% de ocorrência, seguidas dos gêneros *Chaetomium*, *Aspergillus*, *Aerobasidium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Cladosporium*.

Os táxons cosmopolitas *Aspergillus*, *Acremonium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Colletotrichum* e *Penicillium* encontrados em nosso estudo, já foram reportados como endófitos em outras plantas (BOTELLA; DIEZ, 2011; U'REN et al., 2012; SHANKAR et al., 2014). *Colletotrichum* e *Fusarium* são gêneros frequentemente relatados como endófito e patógenos de diversas plantas, desempenhando papel de grande importância econômica (CANNON et al., 2013).

Tayung, Sarkar e Baruah (2012) obtiveram 69 fungos endofíticos de *Ipomoea carnea* e utilizando técnicas morfológicas de clasificação conseguiram identificar dez taxons diferentes, que pertenciam ao grupo dos Mucoromycotina (1,45%), Coelomycetes (10,14%) e Hiphomycetes (62,32%), 7,25% dos isolados não foram agrupados, pois estes fungos não apresentaram esporos. As espécies de *Curvularia*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Colletotrichum* e fungos não esporulantes foram isoladas como endófitos dominantes. Das espécies isoladas, 15 (21,74%) entre elas *Curvularia* sp. e *Fusarium* sp., apresentaram atividade antimicrobiana, inibindo pelo menos um dos micro-organismos utilizados nos testes, constituídos por bactérias patogênicas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Shigella dysenteriae*) e fungos (*Trichophyton rubrum*, *Aspergillus Fumigatus*, *Trichophyton* sp.).

5.2 Bioprospecção dos isolados fúngicos

A análise fitoquímica foi realizada em todos os 60 fungos endofíticos previamente selecionados com base em sua coloração, como descrito no item 4.4.1. Os compostos

fitoquímicos presentes nos fungos endofíticos podem ser potenciais fontes de aplicação biotecnológica e industrial, principalmente na indústria farmacêutica, pois a presença desses compostos pode contribuir para o desenvolvimento futuro de síntese de novas drogas (CASTILLO et al., 2007; SEGISMUNDO et al., 2008). A análise fitoquímica é realizada principalmente em espécies vegetais, no entanto na literatura há relatos dessas análises em fungos endofitos (TAN; ZOU, 2001; HUANG et al., 2007; ROSARIO NICOLETTI; FIORENTINO, 2015)

As plantas medicinais habitualmente abrigam endófitos que apresentam metabolitos secundários e atividades medicinais semelhantes às de sua planta hospedeira (STROBEL e DAISY, 2003). *P. incarnata* uma planta medicinal amplamente utilizada em praticamente todas as regiões ao redor do mundo, além disso, esta planta possui diversas classes de compostos, tais como flavonoides, fenólicos e alcalóides, sendo que estes compostos são os que mais contribuem para suas propriedades medicinais (SPERONI; MINGHETTI, 1988; MARCHART et al., 2003; DHAWAN et al., 2004).

Os endofíticos isolados das folhas de *P. incarnata* selecionados para as análises químicas foram submetidos a um processo fermentativo. Parte do filtrado fúngico obtido da fermentação foi utilizado na triagem dos flavonoides, fenóis, taninos e saponinas. Os resultados mostraram uma importante diversidade dos principais metabólitos presentes nos filtrados, Tabela 5.

Tabela 5 - Análise das principais classes de metabólitos presentes nos filtrados fúngicos .
(continua)

Código	Isolado	Classes de metabólitos			
		Flavonoides	Fenóis	Taninos	Saponinas
LMA 1710	<i>Acremonium</i> sp.	+	+	-	+
LMA 1709	Ascomycota sp.	-	+	-	-
LMA 1720	<i>Aspergillus</i> sp. 1	+	+	-	-
LMA 1798	<i>Aspergillus</i> sp. 2	-	+	-	+
LMA 1705	<i>Aspergillus versicolor</i>	+	+	-	+
LMA 1793	<i>Chaetomium</i> sp.	+	+	-	+
LMA 1686	Coelomycetes sp. 1	+	+	-	+
LMA 1694	Coelomycetes sp. 2	-	-	-	+
LMA 1704	Coelomycetes sp. 3	+	+	-	-
LMA 1688	Coelomycetes sp. 4	+	-	-	-
LMA 1689	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	+	+	-	+
LMA 1690	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	-	+	-	-
LMA 1687	<i>Colletotrichum</i> sp. 3	-	+	-	-
LMA 1724	<i>Colletotrichum</i> sp. 4	+	+	-	+
LMA 1725	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	+	+	-	-
LMA 1691	<i>Colletotrichum</i> sp. 6	-	+	-	+
LMA 1596	<i>Cylindrocladium</i> sp.	+	+	-	-

Tabela 5 - Análise das principais classes de metabólitos presentes nos filtrados fúngicos .
(continuação)

Código	Isolado	Classes de metabólitos			
		Flavonoides	Fenóis	Taninos	Saponinas
LMA 1681	<i>Fusarium</i> sp. 1	+	+	-	+
LMA 1706	<i>Fusarium</i> sp. 2	+	+	-	+
LMA 1718	<i>Fusarium</i> sp. 3	+	+	-	+
LMA 1719	<i>Fusarium</i> sp. 4	+	+	-	+
LMA 1721	<i>Fusarium</i> sp. 5	+	+	-	+
LMA 1722	<i>Fusarium</i> sp. 6	+	+	-	-
LMA 1828	<i>Fusarium</i> sp. 7	-	+	-	+
LMA 1672	<i>Fusarium</i> sp. 8	+	+	-	+
LMA 1630	FNE sp. 1	+	+	-	-
LMA 1707	FNE sp. 2	+	+	-	+
LMA 1708	FNE sp. 3	+	+	-	-
LMA 1677	FNE sp. 4	-	+	+	+
LMA 1712	FNE sp. 5	+	+	-	+
LMA 1713	FNE sp. 6	+	+	-	+
LMA 1723	FNE sp. 7	+	+	-	-
LMA 1674	FNE sp. 8	+	+	-	-
LMA 1609	FNE sp. 9	+	+	-	-
LMA 1726	FNE sp. 10	+	+	-	+
LMA 1728	FNE sp. 11	+	+	-	-
LMA 1650	FNE sp. 12	+	+	-	-
LMA 1610	FNE sp. 13	+	+	-	+
LMA 1654	FNE sp. 14	+	+	-	+
LMA 1666	FNE sp. 15	+	-	-	+
LMA 1814	FNE sp. 16	+	+	+	-
LMA 1616	FNE sp. 17	+	+	-	+
LMA 1692	FNE sp. 18	+	+	-	-
LMA 1693	FNE sp. 19	-	+	-	+
LMA 1703	FNE sp. 20	-	+	-	-
LMA 1792	FNE sp. 21	-	-	-	+
LMA 1794	FNE sp. 22	+	+	-	+
LMA 1795	FNE sp. 23	-	+	-	+
LMA 1796	FNE sp. 24	+	+	-	+
LMA 1797	FNE sp. 25	+	+	-	+
LMA 1824	FNE sp. 26	+	+	+	+
LMA 1825	FNE sp. 27	-	+	-	-
LMA 1826	FNE sp. 28	+	+	-	-
LMA 1827	FNE sp. 29	-	+	-	-
LMA 1602	FNE sp. 30	+	+	-	-
LMA 1604	FNE sp. 31	+	+	-	+
LMA 1605	FNE sp. 32	-	+	-	+
LMA 1702	<i>Mucor</i> sp.	+	+	-	+
LMA 1684	<i>Trichoderma</i> sp.	+	+	-	+
Controle*	-	-	-	-	-

Fonte: elaborado pelo autor (2016)

FNE: fungo não esporulante;

(+) Resultado positivo e (-) Resultado negativo;

* Caldo Batata Dextrose sem inóculo, mantido nas mesmas condições de fermentação dos endófitos.

A literatura relata a presença de várias classes de compostos antes considerados exclusivamente de origem vegetal, também em fungos endofíticos, tais como, alcaloides (REHMAN et al., 2009; LIU et al., 2010), polifenóis (LAI et al., 2010), taninos (SELVI; BALAGENGATHARATHILAGAM, 2014; LADOH-YEMEDA et al., 2015), flavonoides (CHENG et al., 2013; HUANG et al., 2008), saponinas (KANNA; KANNABIRAN, 2008), esteróis (KALYONCU et al., 2009) e terpenos (SAXENA; MESHRAM; KAPOOR, 2015).

Na determinação do perfil fitoquímico (Tabela 5), foi constatada a presença de flavonoides em 46 dos 60 filtrados fúngicos analisados, pelo aparecimento de coloração vermelha, laranja ou amarela. As cores obtidas nos ensaios podem variar conforme o núcleo, o número e a disposição dos substituintes hidroxilados (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010). A presença de alcalóides não foi observada em nenhuma amostra, isso não indica que os fungos endofíticos de *P. incarnata* não apresentem este metabólito, no entanto, por meio do método de análise utilizado neste trabalho, não foi possível identificar este composto.

Os compostos fenólicos foram encontrados na maioria das amostras, exceto nos isolados LMA 1694 e LMA 1688 (dois celomicetos), e LMA 1792 e LMA 1666 (ambos os fungos não esporulantes). Ladoh-Yemeda et al. (2015) realizaram uma triagem fitoquímica em 11 fungos endofíticos isolados do caule de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae), os autores constataram a presença de compostos fenólicos nos 11 endófitos analisados. Devi, Prabakaran e Wahab (2012) estudando o fungo *Penicillium* sp. isolado das folhas de *Centella asiatica* (Apiaceae) relataram a presença de compostos fenólicos e outros metabólitos neste endófito. Selvi e Balagengatharathilagam (2014) constataram a presença de compostos fenólicos nos 11 fungos endofíticos analisados. Esses dados corroboram com os obtidos em nosso estudo, indicando que os compostos fenólicos estão bem distribuídos nos fungos endofíticos.

A presença de taninos nas amostras foi considerada baixa dentre os isolados, pois foi encontrado apenas nos filtrados de três fungos não esporulantes (LMA 1677; LMA 1814 e LMA 1824). Os taninos (comumente referidos na forma de ácido tânico) são polifenóis solúveis em água que estão presentes em muitos alimentos de origem vegetal e em fungos endofíticos (MORE; JADHAV; RAUT, 2015). Devido às suas características (complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e complexação com macromoléculas), possuem várias aplicações farmacológicas, tais como, ação adstringente, atividade cicatrizante, hemostática, anti-séptica e antioxidante (CHUNG et al., 2008).

Utilizando o mesmo método para constatação de taninos, Ladoh-Yemeda et al. (2015) relataram a presença desse metabólito nos fungos *Aspergillus* sp. 4, *Aspergillus* sp. 6,

Fusarium sp., *Penicillium* sp. 3 e *Trichoderma*. Por meio de triagem fitoquímica Sadananda et al. (2011) constataram a presença de taninos em seis fungos endofíticos de um total de 14 fungos avaliados. Selvi e Balagengatharathilagam (2014) estudando compostos fitoquímicos presentes em fungos isolados de dez plantas medicinais indianas relataram a presença desta biomolécula em três endófitos de um total de 12 fungos. Os dados obtidos na literatura e os nossos dados nos mostram que os taninos são mais raros de serem encontrados em fungos endofíticos comparados com outras classes de compostos, indicando que a presença deste composto pode ser característico de alguns grupos de fungos.

Foi constatada a presença de saponina na maioria das amostras analisadas, mas com grande variação da quantidade de espuma permanente formada entre os positivos. Corroborando com os dados obtidos em nosso estudo em relação a presença de saponinas em fungos endofíticos, Sadananda et al. (2011) utilizando o mesmo método fitoquímico empregado por nós para análise deste metabólito, constataram a presença deste composto em *Trichoderma* sp., *Colletotrichum gloesporioides*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, todos endofíticos isolados da planta *Tabebuia argentea*.

Wu, Yang e You (2012), isolaram e caracterizaram 19 fungos endofíticos de *Aralia elata*, sendo que a maioria foi capaz de produzir saponinas. Os melhores resultados de saponinas triterpênicas foram para os fungos *Penicillium* sp., *Dictyochaeta* sp., *Camarosporium leucadendri*, *Cladosporium* sp., *Schizophyllum commune*, *Peniophora* sp. A maior concentração de saponinas foi encontrada no endófito *Penicillium* sp., 2,049 mg.g⁻¹, além disso foi constatada a presença de ginsenosídeo Rb2 nas linhagens endofíticas *Penicillium* sp., *Dictyochaeta* sp. e *Camarosporium* sp, este composto foi inicialmente descrito nas raízes das plantas do gênero *Panax*, conhecido popularmente como ginseng.

De acordo com Luo et al. (2013) a capacidade de estirpes endofíticas de *Fusarium* sp., *F. oxysporum* e *Nodulisporium* sp. de *Panax notoginseng* em transformar ginsenosídeos em compostos análogos adicionais, demonstra que os fungos endofíticos contribuem diretamente para o padrão particular destes compostos que ocorrem nos tecidos das plantas.

Vários estudos têm mostrado que o perfil químico dos extratos pode variar em função do método usado para sua obtenção (ANDREO; JORGE, 2006). Assim, torna-se necessário determinar o método de extração mais adequado para o tipo de compostos a ser estudado.

Neste trabalho inicialmente utilizamos dois métodos para a determinação de flavonoides totais, com a finalidade de obter o melhor método a fim de otimizar o processo de bioprospecção dos isolados fúngicos quanto à produção deste composto.

O primeiro método testou uma adaptação da Farmacopéia Européia (2008), mas os resultados foram considerados insatisfatórios, uma vez que de três fungos testados apenas em um (*Trichoderma* sp./LMA 1684) foi possível calcular o teor de flavonoides no filtrado e no micélio (0,18% e 0,0258% de teor de flavonoides expressos em vitexina, respectivamente). Além disso, esta metodologia utiliza o metanol como solvente extrator devido à sua polaridade, já que os flavonoides em sua maioria são solúveis em água e alcoóis diluídos (CARVALHO et al. 2010). Contudo, o metanol é miscível em água e então foi necessário liofilizar as amostras. Como o processo de liofilização leva aproximadamente três dias, isso tornaria a conclusão das análises muito lenta podendo acarretar um atraso importante neste estudo. Por esses motivos, este método foi descartado.

O método de análise de flavonoides descrito na Farmacopéia Européia propõe o uso do reagente oxalato-bórico na formação do complexo flavônicos no lugar de cloreto de alumínio para a formação do complexo a ser analisado por espectrofotometria. De acordo com Hostettmann et al. (1984), a complexação dos flavonoides com o ácido bórico ocorre somente nos flavonoides que possuem hidroxilas 3' e 4' (catecol) livres, não ocorrendo em outras posições. Esta informação também foi considerada na escolha do método analítico.

Estudos têm demonstrado que fungos excretam seus metabólitos secundários para o meio de cultura, por esse motivo, inicialmente realizamos testes com o micélio seco em estufa a 40°C e com os filtrados, para o segundo método testado, a fim de comparar os teores de flavonoides e compostos fenólicos utilizando três solventes orgânicos. Para o micélio utilizamos apenas metanol como solvente, já para o filtrado acetato de etila e n-Butanol. Os resultados do teor de flavonoides e fenóis totais dos três fungos bioprospectados nesses solventes estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Comparação dos resultados obtidos por meio dos solventes acetato de etila, metanol e n-Butanol, para averiguar o teor de flavonoides e fenóis nestes diferentes solventes.

Fungo	Extrato metanólico		Fração butanólica		Fração Acetato de Etila	
	Flav.T* (mg.g ⁻¹)	Fen.T** (mg.g ⁻¹)	Flav.T (mg.g ⁻¹)	Fen.T (mg.g ⁻¹)	Flav.T (mg.g ⁻¹)	Fen.T (mg.g ⁻¹)
<i>Fusarium</i> sp. 1	16,67	67,46	18,59	118,06	6,73	60,7
FNE sp. 12	10,77	95,9	26,87	113,26	9,9	30,8
<i>Trichoderma</i> sp.	69,12	124,85	213,65	100,3	70,79	85,73

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

FNE: fungo não esporulante;

*Flavonoides totais equivalentes a Rutina (mg.g⁻¹ de extrato);

**Fénois totais (Equivalente a Ácido Gálico mg.g⁻¹ de extrato).

O segundo método foi escolhido para ser utilizado nos 60 endófitos selecionados, a escolha deste método foi pela melhor resolução dos resultados, já que todos apresentaram quantidades de flavonoides. Além disso, este método não apresentou problemas de ordem prática como o método adaptado da Farmacopéia Européia. Diferente do primeiro método, esta técnica utiliza o cloreto de alumínio como agente complexante dos flavonoides, além disso, é uma técnica amplamente utilizada para a quantificação de flavonoides em plantas e fungos endofíticos (PETRY et al., 2001; FERNANDES et al., 2012; HUANG et al., 2008; ZHAO et al., 2014; CUI et al., 2015; PATIL et al., 2015).

O solvente escolhido para a extração de flavonoides foi o n-Butanol, pois os fungos preliminarmente analisados mostraram melhores resultados para este solvente. Grande parte dos trabalhos publicados utiliza acetato de etila como solvente para analisar metabólitos secundários em fungos, contudo tal solvente não é o mais indicado para extrair flavonoides devido à suas propriedades químicas. Na natureza os flavonoides podem ser encontrados em duas formas: agliconas que aparecem sob a forma de cristais amarelos e a forma conjugada com açúcares que é conhecida como heterosídeo. Os heterosídeos que compreendem a maioria dos flavonoides são solúveis em água e em alcoóis, mas insolúveis nos solventes habituais, enquanto que as respectivas agliconas são normalmente solúveis em solventes orgânicos apolares ou de média polaridade (BRAVO, 1998; CARVALHO et al., 2010). Este fato explicaria a presença de flavonoides e fenóis nas frações butanólicas e acetato de etila.

Todos os isolados apresentaram algum teor de flavonoide e compostos fenólicos, sendo que várias linhagens endofíticas apresentaram boa atividade antioxidante, os resultados obtidos para estes compostos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Quantificação do teor de flavonoides totais, fenóis totais e percentuais de atividade antioxidante, dos extratos butanólicos obtidos dos 60 endófitos bioprospectados.

(continua)

Código	Isolado	Massa dos extratos (mg)	Flavonoides Totais (mg.g⁻¹ de extrato)*	Polifenóis Totais (EAG mg.g⁻¹ de extrato)**	Percentual do sequestro do radical livre DPPH (%)***
LMA 1710	<i>Acremonium</i> sp.	40,4	33,17 ± 0,179	145,42 ± 1,029	54,9 ± 0,089
LMA 1709	Ascomycota sp.	147,5	1,31 ± 0,311	57,73 ± 0,648	57,9 ± 0,045
LMA 1720	<i>Aspergillus</i> sp. 1	42,5	187,3 ± 0,285	106,75 ± 0,186	31,4 ± 0,085
LMA 1798	<i>Aspergillus</i> sp. 2	2,1	44,93 ± 0,435	138,40 ± 0,496	24,7 ± 0,212
LMA 1705	<i>A. versicolor</i>	80,4	14,35 ± 1,495	135,72 ± 0,630	94,0 ± 0,025
LMA 1793	<i>Chaetomium</i> sp.	76,3	162,22 ± 0,375	167,80 ± 0,586	94,6 ± 0,101
LMA 1686	Coelomycetes sp. 1	45,3	14,53 ± 0,174	108,79 ± 0,961	7,7 ± 0,659
LMA 1694	Coelomycetes sp. 2	369,2	0,69 ± 0,315	2,65 ± 0,460	3,2 ± 0,025
LMA 1704	Coelomycetes sp. 3	31,9	21,46 ± 0,085	179,25 ± 1,761	15,8 ± 0,521
LMA 1688	Coelomycetes sp. 4	56,2	17,80 ± 0,620	101,58 ± 2,488	34,2 ± 0,002

Tabela 7 - Quantificação do teor de flavonoides totais, fenóis totais e percentuais de atividade antioxidante, dos extratos butanólicos obtidos dos 60 endófitos bioprospectados.

(continuação)

Código	Isolado	Massa dos extratos (mg)	Flavonoides Totais (mg.g ⁻¹ de extrato)*	Polifenóis Totais (EAG mg.g ⁻¹ de extrato)**	Percentual do sequestro do radical livre DPPH (%)***
LMA 1689	<i>Colletotrichum</i> sp. 1	32,0	16,06 ± 0,267	90,59 ± 1,060	8,9 ± 0,058
LMA 1690	<i>Colletotrichum</i> sp. 2	38,0	12,58 ± 0,725	104,12 ± 1,046	15,6 ± 0,578
LMA 1687	<i>Colletotrichum</i> sp. 3	40,5	12,68 ± 0,047	65,65 ± 3,190	3,0 ± 0,002
LMA 1724	<i>Colletotrichum</i> sp. 4	48,4	11,30 ± 1,388	94,44 ± 0,673	39,3 ± 0,007
LMA 1725	<i>Colletotrichum</i> sp. 5	70,6	8,91 ± 1,069	88,77 ± 1,030	62,6 ± 0,088
LMA 1691	<i>Colletotrichum</i> sp. 6	155,8	4,48 ± 1,193	24,26 ± 0,807	41,6 ± 0,025
LMA 1596	<i>Cylindrocladium</i> sp.	80,6	47,43 ± 0,639	138,49 ± 2,547	25,4 ± 0,852
LMA 1730	<i>Diaporthe</i> sp.	46,6	6,69 ± 0,205	92,74 ± 1,215	13,1 ± 0,002
LMA 1681	<i>Fusarium</i> sp. 1	47,4	18,59 ± 1,022	118,06 ± 1,622	26,9 ± 0,725
LMA 1706	<i>Fusarium</i> sp. 2	66,4	15,58 ± 2,616	73,95 ± 1,323	17,6 ± 0,200
LMA 1718	<i>Fusarium</i> sp. 3	35,9	16,28 ± 0,591	93,03 ± 1,176	11,9 ± 0,240
LMA 1719	<i>Fusarium</i> sp. 4	81,3	85,43 ± 2,801	114,94 ± 1,088	73,7 ± 0,841
LMA 1721	<i>Fusarium</i> sp. 5	38,7	72,71 ± 0,979	129,97 ± 0,493	84,0 ± 0,058
LMA 1722	<i>Fusarium</i> sp. 6	62,6	9,51 ± 0,979	50,88 ± 0,963	27,7 ± 0,050
LMA 1828	<i>Fusarium</i> sp. 7	42,6	33,18 ± 0,307	96,95 ± 1,003	22,9 ± 1,402
LMA 1672	<i>Fusarium</i> sp. 8	69,5	25,09 ± 0,873	60,17 ± 1,746	7,3 ± 0,635
LMA 1630	FNE sp. 1	52,6	18,32 ± 0,491	104,14 ± 0,353	8,2 ± 0,012
LMA 1707	FNE sp. 2	73,2	34,93 ± 6,786	97,16 ± 0,995	50,1 ± 0,054
LMA 1708	FNE sp. 3	42,1	28,60 ± 0,671	149,68 ± 2,086	37,8 ± 0,098
LMA 1677	FNE sp. 4	8,9	45,7 ± 0,596	93,2 ± 0,991	26,9 ± 0,047
LMA 1712	FNE sp. 5	45,5	8,66 ± 1,153	129,68 ± 0,341	53,4 ± 0,054
LMA 1713	FNE sp. 6	29,4	9,29 ± 0,344	184,94 ± 0,373	14,3 ± 0,088
LMA 1723	FNE sp. 7	66,4	8,46 ± 0,506	6,65 ± 0,797	28,0 ± 0,008
LMA 1674	FNE sp. 8	135,0	69,76 ± 4,123	88,07 ± 1,033	23,1 ± 0,639
LMA 1609	FNE sp. 9	83,7	25,69 ± 0,369	152,91 ± 0,555	45,5 ± 0,601
LMA 1726	FNE sp. 10	25,3	21,48 ± 1,832	119,73 ± 0,083	21,5 ± 0,241
LMA 1728	FNE sp. 11	47,3	23,97 ± 0,761	101,49 ± 1,111	40,0 ± 0,077
LMA 1650	FNE sp. 12	46,4	26,87 ± 0,220	113,26 ± 1,860	6,4 ± 0,353
LMA 1610	FNE sp. 13	81,8	13,56 ± 1,211	84,34 ± 1,997	12,4 ± 0,878
LMA 1654	FNE sp. 14	47,0	12,16 ± 0,941	72,17 ± 1,731	4,0 ± 0,048
LMA 1666	FNE sp. 15	108,8	28,38 ± 0,033	61,76 ± 1,472	4,3 ± 0,610
LMA 1814	FNE sp. 16	27,0	10,04 ± 0,859	54,68 ± 0,513	1,1 ± 0,067
LMA 1616	FNE sp. 17	33,9	27,65 ± 0,450	136,31 ± 0,698	14,89 ± 1,312
LMA 1692	FNE sp. 18	158,7	4,93 ± 0,208	29,40 ± 0,200	31,8 ± 0,456
LMA 1693	FNE sp. 19	90,0	4,17 ± 0,886	72,94 ± 0,460	24,5 ± 0,342
LMA 1703	FNE sp. 20	51,5	10,03 ± 0,330	122,97 ± 1,187	23,9 ± 0,540
LMA 1792	FNE sp. 21	123,1	8,81 ± 0,675	26,4 ± 0,634	16,4 ± 3,961
LMA 1794	FNE sp. 22	81,3	14,75 ± 0,759	65,8 ± 1,896	17,7 ± 0,423
LMA 1795	FNE sp. 23	84,1	9,40 ± 0,897	39,4 ± 0,105	8,7 ± 0,639
LMA 1796	FNE sp. 24	7,1	16,20 ± 0,404	113,2 ± 2,675	13,8 ± 0,698
LMA 1797	FNE sp. 25	18,5	45,40 ± 0,569	74,3 ± 0,936	10,5 ± 0,411
LMA 1824	FNE sp. 26	32,9	42,59 ± 0,458	187,05 ± 0,302	23,2 ± 6,147
LMA 1825	FNE sp. 27	5,8	64,63 ± 0,743	137,55 ± 0,433	25,3 ± 7,015
LMA 1826	FNE sp. 28	66,6	12,36 ± 0,556	149,43 ± 0,758	26,8 ± 0,753

Tabela 7 - Quantificação do teor de flavonoides totais, fenóis totais e percentuais de atividade antioxidante, dos extratos butanólicos obtidos dos 60 endófitos bioprospectados.

(conclusão)

Código	Isolado	Massa dos extratos (mg)	Flavonoides Totais (mg.g ⁻¹ de extrato)*	Polifenóis Totais (EAG mg.g ⁻¹ de extrato)**	Percentual do sequestro do radical livre DPPH (%)***
LMA 1827	FNE sp. 29	15,5	39,76 ± 1,122	133,17 ± 3,012	17,3 ± 1,373
LMA 1602	FNE sp. 30	928,2	8,83 ± 0,632	74,26 ± 2,351	17,7 ± 0,410
LMA 1604	FNE sp. 31	28,2	26,35 ± 0,962	116,96 ± 1,327	12,2 ± 0,584
LMA 1605	FNE sp. 32	132,8	4,95 ± 0,322	53,97 ± 0,989	5,0 ± 1,952
LMA 1702	<i>Mucor</i> sp.	55,4	11,60 ± 0,616	124,07 ± 0,676	34,8 ± 1,254
LMA 1684	<i>Trichoderma</i> sp.	242,5	213,65 ± 0,618	100,30 ± 2,967	62,1 ± 0,580
Controle****	—	148,4	2,87 ± 0,026	14,26 ± 6,078	0,3 ± 0,012
Rutina	—	—	—	—	91,9 ± 1,233
Ác. Asc.	—	—	—	—	95,5 ± 0,987
BHT	—	—	—	—	90,2 ± 1,005

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

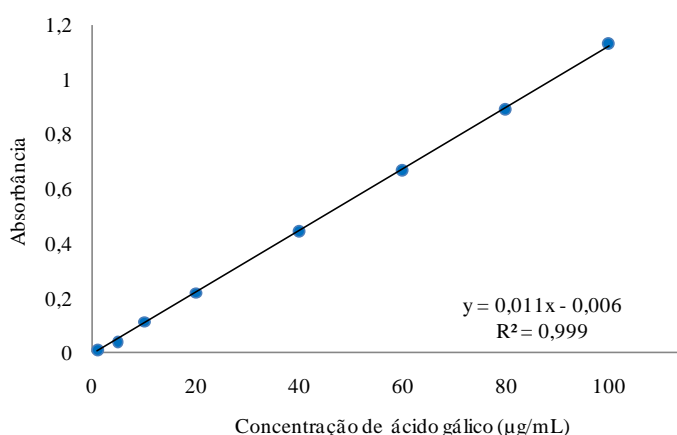
FNE: fungo não esporulante;

Dados expressos como média (n=3) ± desvio padrão;

*Flavonoides totais equivalentes a Rutina (mg/g de extrato); **Fénois totais (Equivalente a Ácido Gálico mg/g de

O teor de fenóis em extrato butanólico foi avaliado pelo reagente de Folin-Ciocalteu, o qual tem sido extensamente usado na determinação de fenóis em extratos fúngicos (LIU et al., 2007; ZHAO et al., 2014; YADAV et al., 2014; PATIL et al., 2015). Por intermédio da reação entre o ácido gálico e o reagente citado acima, foi construída a curva analítica por meio da análise de regressão linear simples, que apresentou equação da reta $y = 0,011x - 0,006$ com coeficiente de correlação R^2 igual a 0,999, como mostra a Figura 14.

Figura 14 - Curva analítica expressa em µg/mL obtida para o ácido gálico ($\lambda = 765\text{nm}$).



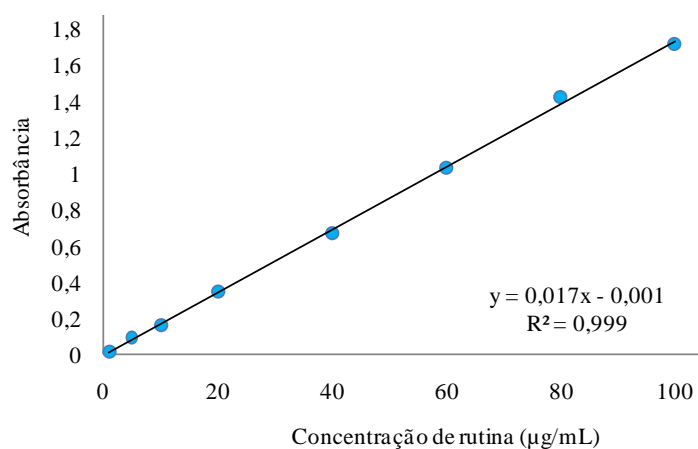
Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Dois isolados do grupo dos celomicetos apresentaram grandes quantidades de fenóis totais: LMA 1686 (108,79 mg.g⁻¹) e LMA 1704 (179,25 mg.g⁻¹ EAG), mas com percentual de atividade antioxidante relativamente baixa (7,7 e 15,8 %, respectivamente). A atividade

antioxidante de muitos fungos endofíticos é atribuída aos seus compostos fenólicos, no entanto nos fungos citados acima, mesmo apresentando considerável teor de fenóis não foi constatada uma boa eliminação do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila.). Um dos possíveis motivos para este ocorrido é que a maioria dos compostos fenólicos ocorre principalmente na forma conjugada, ligada a unidades de açúcar, mas também a outros compostos, tais como ácidos orgânicos, amins e lípidos. Estas conjugações reduzem a sua capacidade de funcionar como bons antioxidantes, porque a estabilização de ressonância dos radicais livres depende da disponibilidade de grupos hidroxila livres nos anéis fenólicos (DULFA; VODNARB; SOCACIUB, 2016).

Para os flavonoides também foi feita a curva analítica por meio da análise de regressão linear simples, com equação da reta $y = 0,017x + 0,001$ com coeficiente de correlação R^2 igual a 0,999 (Figura 15). Neste caso a equação da reta foi estabelecida por meio da reação entre a complexação da rutina com o alumínio resultando em intensificação da fluorescência apresentada pelo composto flavonoídico, que neste caso foi amarela (POPOVA et al., 2004).

Figura 15 - Curva analítica expressa em $\mu\text{g/mL}$ obtida para a rutina ($\lambda = 430\text{nm}$).



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Em relação ao teor de compostos fenólicos das 60 linhagens fúngicas, 55 apresentaram teores superiores a 30 mg.g^{-1} , desses podemos destacar os fungos *Acremonium* sp./LMA 1710 ($145,42 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG), *A. versicolor*/LMA 1705 ($135,72 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG), *Chaetomium* sp./LMA 1793 ($167,8 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG) e *Cylindrocladium* sp./LMA 1596 ($138,49 \text{ mg.g}^{-1}$ EAG). Os extratos butanólicos dos fungos *Aspergillus* sp. 1/LMA 1720 ($187,3 \text{ mg.g}^{-1}$), *Chaetomium* sp./LMA 1793 ($162,22 \text{ mg.g}^{-1}$), *Fusarium* sp. 4/LMA 1719 ($85,43 \text{ mg.g}^{-1}$), *Fusarium* sp. 5/LMA 1721 ($72,71 \text{ mg.g}^{-1}$) e *Trichoderma* sp./LMA 1684 ($213,65 \text{ mg.g}^{-1}$) foram os endófitos que apresentaram os maiores teores de flavonoides totais.

Os resultados obtidos em nosso estudo são animadores, em relação aos teores de flavonoides totais, polifenóis e atividade antioxidante dos extratos butanólicos dos endofíticos, pois tais resultados foram significativamente superiores quando comparados com alguns resultados descritos na literatura. Qiu et al. (2010) determinaram o teor de flavonoides e polifenóis de duas linhagens de *Aspergillus* isoladas de *Ginkgo biloba*, o conteúdo de polifenóis para linhagens ST22 foi de 0,1413 mg.g⁻¹ e 0,01162 mg.g⁻¹ para flavonoides, já na linhagem SX10 foi de 0,1450 e 0,01256 mg.g⁻¹ de teor de fenóis totais e flavonoides respectivamente.

Analisando o teor de fenóis e flavonoides de *Xylaria* sp. Liu et al. (2007) obtiveram 54,51 mg.g⁻¹ EAG e 86,76 mg.g⁻¹ ER, respectivamente, e atividade antioxidante de 66,29%, esses dados são referentes aos extratos metanólicos, os extratos butanólicos dos fungos analisados em nosso estudo mostraram resultados mais promissores.

Os dados obtidos neste trabalho revelam que o extrato butanólico da maioria dos fungos apresentou conteúdos maiores de polifenóis totais e flavonoides do que muitas plantas medicinais comumente utilizadas pelas suas propriedades antioxidantes. Proestos et al. (2006) relatou uma taxa de fenóis totais de 2,9 a 28,2 mg.g⁻¹ em plantas aromáticas da Grécia. Chabariberi et al. (2009) estudando espécies de *Maytenus* spp. e *Passiflora* spp. obtiveram de 11,25 a 56,16 mg.g⁻¹, respectivamente de teor de flavonoides totais presentes nas folhas dessas espécies.

A ação antioxidante de extratos fúngicos ainda não está bem esclarecida. Contudo, estudos mostram que muitas espécies de fungos endofíticos podem sequestrar radicais livres (JASZEK et al., 2013; SUGIHARTO, 2016). A atividade antioxidante medida por meio do radical estável DPPH, mostra a capacidade de moléculas pertencentes aos extratos fúngicos em sequestrar estes radicais do meio existente. É uma metodologia simples, rápida, e eficiente na avaliação de extratos obtidos a partir de solventes com diferentes polaridades. Os testes realizados para analisar a atividade antioxidante do extrato butanólico obtido dos endofíticos de *P. incarnata* e comparado aos padrões de rutina, ácido ascórbico e BHT estão na Tabela 4.

O extrato butanólico do fungo *Aspergillus versicolor*, mostrou atividade antioxidante superior aos padrões rutina (91,98%) e BHT (90,27 %) conseguindo eliminar 94% do radical livre DPPH. Patil et al. (2015) estudando o fungo endofítico *Aspergillus flavus* L7 de *Aegle marmelos* (Rutaceae) relataram que essa linhagem foi capaz de reduzir a concentração de DPPH em 64,53%, nossos dados para o gênero *Aspergillus* foram melhores.

Corroborando com nossos resultados Yadav et al. (2014) estudando 21 fungos endofíticos isolados de *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae) encontraram o maior percentual

de atividade antioxidante nos fungos *Chaetomium* sp e *Aspergillus* sp. com valores superiores a 80% para ambos os fungos. Isso nos revela que os fungos endofíticos pertencentes a estes dois gêneros são bons produtores de compostos com atividade antioxidante.

No presente estudo, os extratos butanólicos de todos os fungos apresentaram algum percentual de atividade antioxidante indicando a possibilidade de explorar estes fungos como fonte de agente antioxidante. Diferentes compostos fúngicos com atividade antioxidante foram isolados de vários fungos endofíticos de diferentes plantas (OLIVEIRA, et al., 2009). Os antioxidantes protegem as células dos danos causados pelos radicais livres. Reações mediadas por radicais livres estão associadas a várias doenças que incluem doença de Alzheimer, diabetes, distúrbios cardiovasculares e câncer (DORKO, 1994).

Fungos endofíticos são uma “fábrica” de novos metabólitos secundários, incluindo compostos antibióticos, antioxidantes, anticancerígenos e imunossupressores (STROBEL et al., 2002). Song et al. (2013) isolaram da raiz de *Trachelospermum jasminoides* o fungo *Cephalosporium* sp., o qual produz o (graphislactona A) que possui forte atividade antioxidante. Dois antioxidantes, pestacina e isopestacina são produzidos por *Pestalotiopsis microspora*, um fungo que habita no interior da planta *Terminalia morobensis* nativa de Papua Nova Guiné (HARPER et al., 2003). Outro composto antioxidante fenilpropanoide amida foi isolado do fungo endofítico *Penicillium brasilianum* que residem em *Melia azedarach* (FILL et al., 2010). Os resultados deste estudo demonstram que fungos endofíticos podem servir como uma fonte potencial de antioxidantes naturais. Este é o primeiro relato sobre a atividade antioxidante de fungos endofíticos isolados de *P. incarnata*. Este estudo fornecerá uma base para trabalhos mais abrangente sobre compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos de *P. incarnata*.

5.3 Caracterização preliminar do perfil químico por meio de métodos analíticos dos fungos endofíticos selecionados

Com o intuito de se obter uma maior massa dos extratos, para a realização dos ensaios cromatográficos, os fungos foram fermentados novamente em maior volume de caldo batata dextrose (500 mL). Os fluidos das culturas foram submetidos à partição líquido-líquido com AcOEt e BuOH, e os extratos, após evaporação do solvente extrator, foram pesados. Os resultados obtidos nas duas frações estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Massa em mg dos extratos obtidos dos fungos endofíticos após evaporação do solvente extrator.

Código	Isolado	Massa (mg) fração	Massa (mg) fração
		BuOH	AcOEt
LMA 1705	<i>A. versicolor</i>	2.342,12	83,1
LMA 1793	<i>Chaetomium</i> sp.	1.561,1	72,31
LMA 1719	<i>Fusarium</i> sp. 4	65,3	32,4
LMA 1721	<i>Fusarium</i> sp. 5	67,5	35,3
LMA 1684	<i>Trichoderma</i> sp.	252,5	153,3

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

A fração butanólica apresentou maior rendimento quando comparada com a fração acetato de etila. Dentre os cinco selecionados, os que apresentaram maior massa de extrato na fração BuOH foram os isolados *A. versicolor*/LMA 1705 (2.342,12 mg) e *Chaetomium* sp./LMA 1793 (1.561,1 mg). Para a fração AcOEt os melhores resultados foram para os fungos *Trichoderma* sp. (153,3 mg) e *A. Versicolor* (83,1 mg). A otimização dos processos fermentativos é um importante para a obtenção de maior rendimento de metabólitos secundários, e deve ser considerada em futuras produções de extratos.

Os isolados selecionados foram re-submetidos aos testes de teor de flavonoides totais, fenóis totais e atividade antioxidante, com o intuito de comparar os resultados obtidos nas duas frações. Os resultados para o teor de flavonoides e fenóis totais estão expressos na Tabela 9. Os teores de fenóis e flavonoides totais das frações foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) mg.g^{-1} de extrato e equivalente de rutina em mg.g^{-1} de extratos, respectivamente.

Quantificação do teor de flavonoides totais e fenóis totais das frações acetato de etila e butanólica, obtidos dos cinco fungos selecionados.

Isolado	Compostos fenólicos*		Flavonoides**	
	Fração AcOEt	Fração BuOH	Fração AcOEt	Fração BuOH
<i>A. versicolor</i>	161,29 \pm 0,134	141,72 \pm 0,341	71,05 \pm 0,456	76,44 \pm 0,314
<i>Chaetomium</i> sp.	164,52 \pm 0,556	155,77 \pm 0,346	128,57 \pm 1,165	161,94 \pm 0,452
<i>Fusarium</i> sp. 4	208,43 \pm 0,876	140,46 \pm 0,942	139,84 \pm 0,986	204,59 \pm 0,331
<i>Fusarium</i> sp. 5	146,98 \pm 0,976	143,22 \pm 0,854	124,77 \pm 1,004	122,80 \pm 1,352
<i>Trichoderma</i> sp.	103,62 \pm 0,324	140,07 \pm 0,652	105,07 \pm 0,984	162,81 \pm 2,213

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Dados expressos como média (n=3) \pm desvio padrão

*Flavonoides totais equivalentes a Rutina (mg.g^{-1} de extrato);

**Fénois totais (Equivalente a Ácido Gálico mg.g^{-1} de extrato).

Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis para averiguação de possíveis diferenças estatísticas entre as frações acetato de etila e butanólica para o teor de flavonoides e fenóis

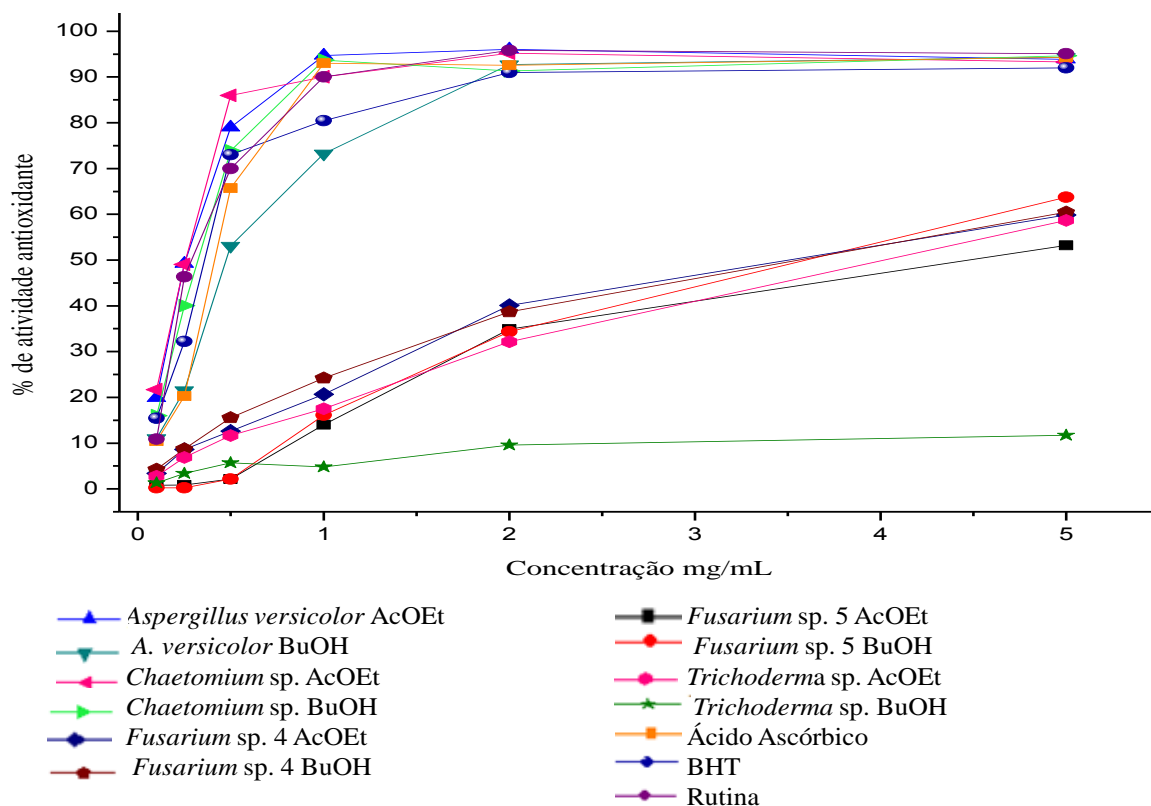
totais dos cinco fungos analisados. O valor de probabilidade p encontrado para todos os fungos nas duas classes de compostos (fenóis e flavonoides totais) foi menor que 0.05. Assim, concluímos que estatisticamente há diferenças entre a fração acetato de etila e butanólica, para todos os casos.

Os fungos *Aspergillus versicolor*/LMA 1705, *Chaetomium* sp./LMA 1793, *Fusarium* sp. 4/LMA 1719 e *Trichoderma* sp./LMA 1684 apresentaram valores maiores para os flavonoides totais na fração butanólica, indicando que o solvente extrator n-Butanol é um bom solvente para estes metabólitos. Já para os compostos fenólicos, todas as amostras (exceto o fungo *Trichoderma* sp.) apresentaram valores maiores na fração acetato de etila. O fungo *Fusarium* sp. 4/LMA 1719 apresentou os maiores teores de fenóis e flavonoides totais 208,43 mg.g⁻¹ (fração AcOEt) e 204,59 mg.g⁻¹ (fração BuOH) respectivamente. Tung et al. (2007) isolaram onze compostos fenólicos da fração AcOEt da casca de *Acacia confusa*. Kasote et al. (2011) relataram a presença de polifenóis com atividade antioxidante na fração BuOH da farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.). Assim, os compostos fenólicos podem estar presentes na fração AcOEt e BuOH, respectivamente.

Zhao et al. (2014) estudando um fungo endofítico isolado da raiz de feijão guandu (*Cajanus cajan* L.) utilizou três solventes (n-Hexano, n-Butanol e Acetato de Etila) de diferentes polaridades, a fim de determinar o teor de fenóis totais e flavonoides nas três frações. Os melhores resultados foram obtidos na fração acetato de etila 578,12 mg.g⁻¹ e 356,89 mg.g⁻¹ respectivamente, seguido da fração butanólica 322,65 mg.g⁻¹ e 201,27 mg.g⁻¹ respectivamente. Em resumo, os conteúdos de fenóis das diferentes frações tiveram a mesma ordem dos flavonoides: fração acetato de etila > fração n-Butanol > fração n-Hexano > fração água. Neste trabalho, por meio da LC-MS/MS, os autores encontraram a luteolina, um tipo de flavonoide, com base em vias de fragmentação. A análise de LC-MS/MS mostrou que a fração acetato de etila do fungo endofítico partilhava o mesmo tempo de retenção do padrão luteolina.

Os fungos selecionados foram submetidos novamente à análise da atividade antioxidante, com a finalidade de comparar as frações acetato de etila e butanólica, além disso, constatar a reprodutibilidade do método utilizado. O método aplicado foi o mesmo utilizado anteriormente, o DPPH, que tem sido amplamente utilizado para avaliar o efeito de eliminação de radicais livres de várias substâncias antioxidantes (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013). Os resultados mostraram que as duas frações dos cinco fungos analisados apresentaram compostos com atividade antioxidante (Figura 16).

Figura 16 – Atividade antioxidante das frações AcOEt e BuOH dos fungos endofíticos associados à *P. incarnata*.



Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Na literatura vários autores já relataram a presença de compostos com atividade antioxidante nos fungos *Chaetomium* sp, *Aspegillus* sp., *Fusarium* sp. e *Trichoderma* sp. Awad et al. (2014) concluíram em seu estudo que os extratos de éter de petróleo e acetato de etila da cultura líquida de *Chaetomium globosum* demonstraram atividade antioxidante, antimicrobiana e significativo efeito citotóxico na linha celular de carcinoma hepático humano. O extrato de éter de petróleo e acetato de etila apresentou 92 e 93,9 % de atividade antioxidante respectivamente. Do mesmo modo, nossos resultados foram satisfatórios para o endófito *Chaetomium* sp., que exibiu valores de atividade antioxidante, na fração acetato de etila e butanólica, iguais a 93,6 e 94,7%, respectivamente. A partir do extrato de acetato de etila da cultura líquida de *C. globosum*, Awad et al. (2014) também conseguiram isolar os compostos prenisatina, crisofanol, crisazina, chaetoviridina A e chaetoviridina B, biomoléculas com atividades antioxidante e antimicrobiana significativas sobre *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Rhizoctonia solani*.

Arora e Chandra (2011) estudaram a atividade antioxidante do fungo *Aspergillus fumigatus*, utilizando diferentes solventes orgânicos, e observaram que o acetato de etila foi melhor solvente extrator dos componentes responsáveis pelo potencial antioxidante, seguido por clorofórmio e butanol. A fração de éter de petróleo não mostrou qualquer atividade. A fração acetato de etila apresentou 74,6% de atividade antioxidante. A fração clorofórmio mostrou 67,4% de efeito de eliminação para DPPH, enquanto a fração butanólica apresentou um potencial redutor de 50% de poder antioxidante frente ao radical DPPH. Os resultados obtidos em nosso estudo são bons se comparados com os alcançados por Arora e Chandra (2011), pois o endófito *Aspergillus versicolor* apresentou ótimo percentual de atividade antioxidante na fração acetato de etila e butanólica, 96,4% e 94,8%, respectivamente, enquanto o resultado da fração AcOEt foi melhor em relação ao ácido ascórbico (95,8 %), utilizado como controle positivo.

Entre as amostras, a fração BuOH do fungo *Trichoderma* sp. exibiu a atividade de eliminação do radical livre DPPH mais baixa (valor de IC₅₀ de 304,18 mg/mL), enquanto a fração AcOEt do fungo *Chaetomium* sp., com um valor de IC₅₀ de 0,21 mg/mL, revelou uma atividade antioxidante superior, em comparação aos controles positivo BHT (0,42 mg/mL), Rutina (0,25 mg/mL) e Ácido Ascórbico (0,23 mg/mL) (Tabela 9).

Os fungos *Aspergillus versicolor* e *Chaetomium* sp. apresentaram IC₅₀ significativamente maiores que os fungos *Fusarium* sp. 4, *Fusarium* sp. 5 e *Trichoderma* sp. nos dois solventes extratores utilizados neste estudo.

Tabela 9- IC₅₀ de captura do radical livre DPPH das frações acetato de etila e butanólica, obtidos dos cinco fungos selecionados.

Isolados/Padrões	Valor do IC ₅₀ (mg/mL)	
	Fração AcOEt	Fração BuOH
<i>Aspergillus versicolor</i>	0,23 ± 0,235	0,49 ± 0,214
<i>Chaetomium</i> sp.	0,21 ± 0,324	0,28 ± 0,567
<i>Fusarium</i> sp. 4	3,28 ± 0,487	3,22 ± 0,986
<i>Fusarium</i> sp. 5	4,10 ± 0,134	3,28 ± 1,314
<i>Trichoderma</i> sp.	3,77 ± 0,023	304,18 ± 0,313
Ácido ascórbico	0,23 ± 0,095	
BHT	0,42 ± 0,101	
Rutina	0,25 ± 0,301	

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

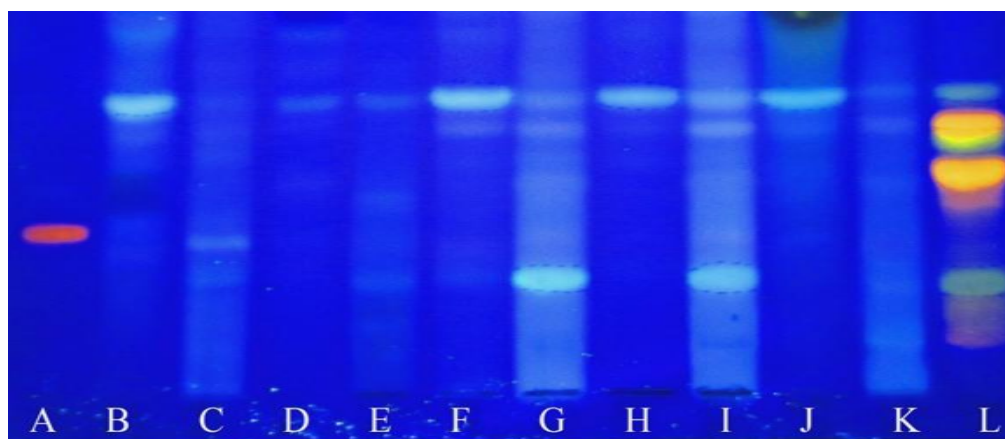
Kanagasabapathy et al. (2011), verificaram em seu estudo que a fração butanólica do fungo *Pleurotus sajor-caju* apresentou melhores resultados comparado com a fração acetato

de etila. Esses dados nos mostram que os compostos antioxidantes podem ser encontrados nas duas frações, pois em nossos estudos ambas apresentaram atividade antioxidante.

5.3.1 Análises cromatográficas

As análises de CCD utilizando fase móvel polar, constituída de acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26) das frações AcOEt e BuOH dos cinco fungos analisados revelaram perfis variados de bandas para os compostos fenólicos (Figura 17)

Figura 17 – Cromatoplaça observada em UV₃₆₆ utilizando fase móvel polar (acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água) e reveladores difenilborato de aminoetanol a 1% (p/v) e macrogol a 5% (p/v).



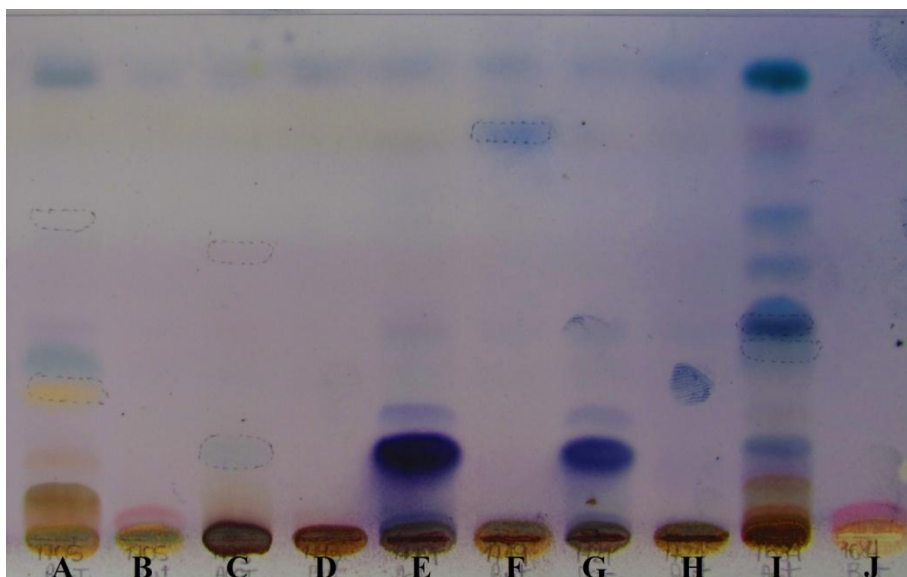
Fonte: arquivos pessoais (2016).

A: Padrão Rutina; B: *Aspergillus versicolor* AcOEt ; C: *A. versicolor* BuOH; D: *Chaetomium* sp. AcOEt; E: *Chaetomium* sp. BuOH; F: *Fusarium* sp. 4 AcOEt; G: *Fusarium* sp. 4 BuOH; H: *Fusarium* sp. 5 AcOEt; I: *Fusarium* sp. 5 BuOH; J: *Trichoderma* sp. AcOEt; K: *Trichoderma* sp. BuOH; L: extrato etanólico de *P. incarnata*.

A fração BuOH dos fungos *Fusarium* sp. 4 e *Fusarium* sp. 5 apresentou bandas com mesmo tempo de retenção da amostra de *P. incarnata*, no entanto a coloração observada não foi igual à da amostra de folha. Todos os fungos apresentaram bandas (exceto *A. versicolor* BuOH) de diferentes intensidades, com o mesmo Rf 0,7; a amostra de *P. incarnata* também apresentou esse composto.

Com relação a análise por CCD utilizando fase móvel de menor polaridade e revelador para compostos da classe dos terpenos, a Figura 18 apresenta o resultado obtido para os diferentes amostras avaliadas, onde é possível observar padrões de coloração característicos para a classe dos terpenos das amostras de fungos analisados, ou seja azul, roxo, entre outros.

Figura 18 – Cromatoplaça utilizando fase móvel apolar (Hexano:acetato de etila) revelada com o reagente anisaldeído- H_2SO_4



Fonte: arquivos pessoais (2016)

A: *Aspergillus versicolor* AcOEt ; B: *A. versicolor* BuOH; C: *Chaetomium* sp. AcOEt; D: *Chaetomium* sp. BuOH; E: *Fusarium* sp. 4 AcOEt; F: *Fusarium* sp. 4 BuOH; G: *Fusarium* sp. 5 AcOEt; H: *Fusarium* sp. 5 BuOH; I: *Trichoderma* sp. AcOEt; J: *Trichoderma* sp. BuOH.

Após revelar a placa com reagente anisaldeído, foi possível observar que as frações butanólicas não apresentaram afinidade com a fase móvel de menor polaridade, diferente da fração acetato de etila que apresentou certa afinidade. Todas as amostras obtidas com butanol apresentaram manchas no ponto de aplicação. É importante ressaltar que a fração acetato de etila do fungo *Trichoderma* sp./LMA 1684 (I) foi a que apresentou maior quantidade de bandas após revelação, e a coloração que as bandas apresentaram é característica de terpenoides. As duas amostras de *Fusarium* sp (E e G) obtidas em acetato de etila apresentaram os mesmos compostos por CCD.

Neste trabalho nós utilizamos o método de CLAE-DAD nas frações AcOEt e BuOH dos cinco fungos selecionados, afim de constatar a presença de flavonoides nas frações acetato de etila e butanólica. Foram utilizados os padrões orientina, iso-orientina, vitexina, iso-vitexina, luteonina e kaempferol, pois estes flavonoides já foram descritos na espécie *P. incarnata* (DHAWAN et al., 2004; MIRODDI et al., 2013).

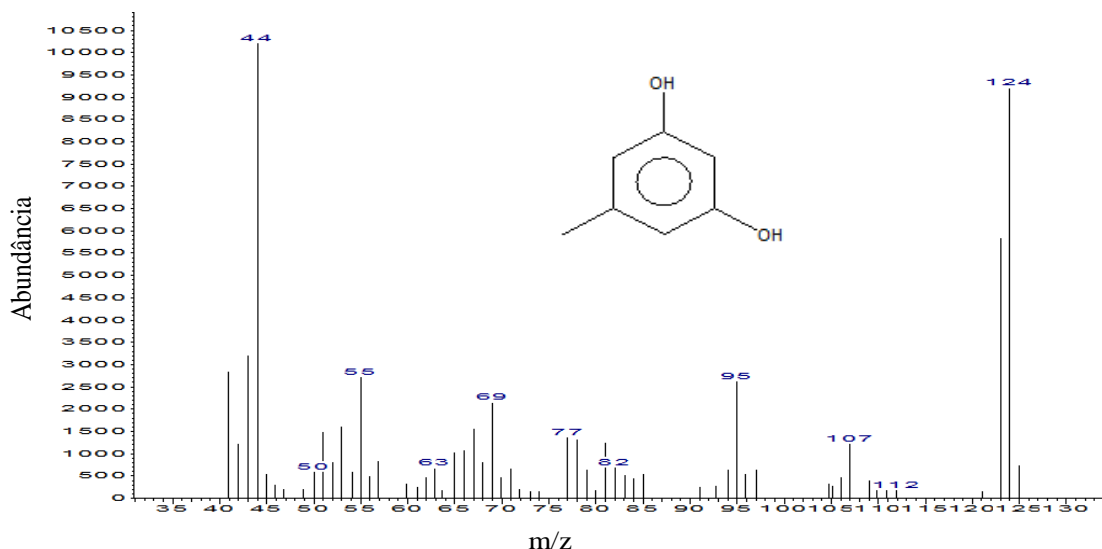
Nenhuma fração (acetato de etila e butanólica) dos fungos analisados apresentou pico no mesmo tempo de retenção dos padrões. Isso nos mostra que os possíveis flavonoides presentes nas frações acetato de etila e butanólica não são os mesmos encontrados nas folhas da planta hospedeira. Os cromatogramas dos padrões encontram-se no próximo item desta discussão.

Os extratos obtidos no processo de extração líquido-líquido, utilizando acetato de etila e butanol, dos cinco fungos selecionados (Tabela 8) foram submetidos à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Os cromatogramas referentes a cada fungo analisado encontram-se no Apêndice. Os metabólitos voláteis detectados nos extratos fúngicos que foram possíveis de serem identificados em comparação com os compostos disponíveis na biblioteca NIST- 05 foram: orcinol (3,19%) presente na fração acetato de etila do fungo *Aspergillus versicolor*/LMA 1705, 4-metoximetilfenol (4,79%), sorbicilina (33,59%) e ergosterol (23,08 %), presentes na fração acetato de etila do fungo *Trichoderma* sp/LMA 1684. Já no fungo *Fusarium* sp. 4/LMA 1719 foi constatada a presença do o composto Isopropenil-1,4-dimetil-1,2,3,3a,4,5,6,7-octahidroazuleno, também na fração acetato de etila.

Os compostos produzidos por fungos endofíticos constituem um grupo diverso no que diz respeito a estruturas e funções, podendo ser tanto compostos com baixa massa molecular (pironas, compostos aromáticos e seus derivados, terpenos, aminoácidos, lactonas, compostos bicíclicos e tricíclicos, entre outros), quanto de alta massa molecular (proteínas, glicoproteínas e polissacarídeos) (LIEBERMANN et al., 2000; LARSEN et al., 2003).

Orcinol (Figura 19), um composto fenólico presente na fração acetato de etila da linhagem endofítica *Aspergillus versicolor*/LMA 1705, é considerado por alguns autores como um policetídeo (STAUNTON; WEISSMAN, 2001; JORGENSEN et al., 2014). Policetídeos são metabólitos secundários produzidos por alguns organismos como fungos e bactérias, conhecidos há muito tempo como uma das classes mais importantes de metabólitos fúngicos (COX, 2007; O'HAGAN, 1991). Os policetídeos fúngicos vão dos compostos aromáticos monocíclicos mais simples, tais como o ácido orselínico e orcinol, as aromáticos policíclicos como a citrinina (COX; SIMPSON, 2009; STAUNTON; WEISSMAN, 2001). Além de exibir uma gama impressionante de diversidade funcional e estrutural, eles possuem uma riqueza de atividades farmacológicas importantes, tais como, antibacterianas, anticancerígenas, antifúngicas, antiparasitárias e imunossupressoras (STAUNTON; WEISSMAN, 2001).

Figura 19 - Espectro de massas do orcinol, obtido a partir do cromatograma da fração acetato de etila do endofítico *Aspergillus versicolor*/LMA 1705.



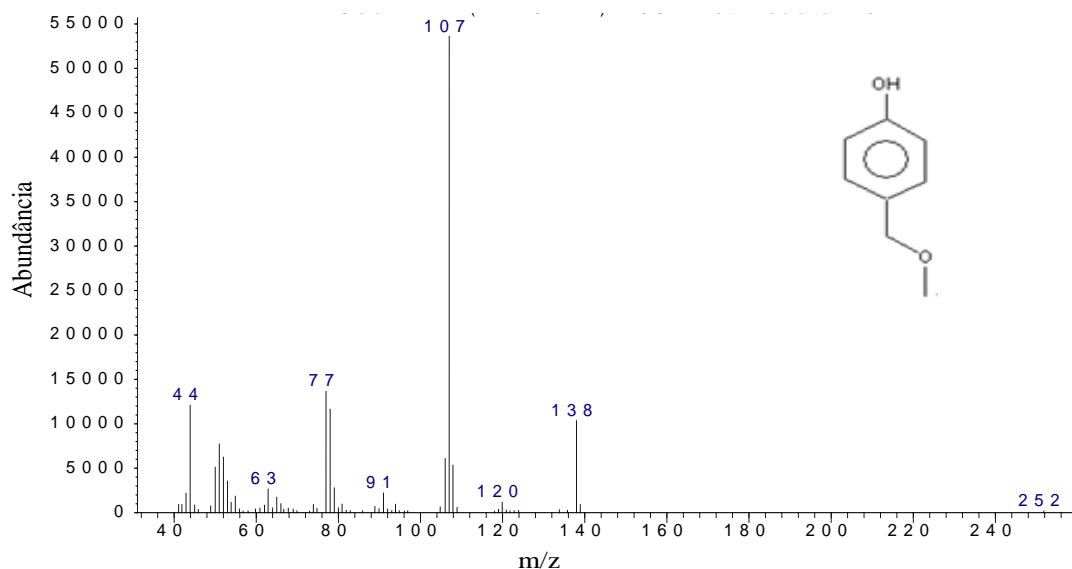
Fonte: arquivos pessoais (2017).

O Orcinol é um composto fenólico que foi isolado inicialmente de líquens (associações simbióticas entre fungo e alga) (MOSBACH, 1964). Este composto pode ser sintetizado por descarboxilação do ácido orselínico em *Umbilicaria papulosa* e *Gliocladium roseum* (PETTERSSON, 1965; MOSBACH; EHRENSVÄRD, 1966). O ácido orselínico é um metabólito encontrado principalmente em líquens como monômero de depsídeos e depsidonas (HONDA; VILEGAS, 1999). Esta molécula e/ou derivados também já foram encontrados nas espécies *Aspergillus nidulans* (SANCHEZ et al., 2010), *Chaetomium globosum* (XU et al., 2014), *Penicillium fennelliae* (EIJK, 1969), *P. madriti* (GAUCHER; SHEPHERD, 1968), *Chaetomium globosporum*, *P. purpurogenum* e *P. commune*, com destaque para suas atividades antivirais, dentre outras (XU et al., 2014; BASHYAL et al., 2005; WANG et al., 2011; GAO et al., 2011).

Os dados encontrados assemelham-se aos obtidos por Wu et al. (2016), os quais confirmaram a presença de orcinol na espécie *A. versicolor*. Além de estruturarem e isolarem esse composto fenólico, os pesquisadores constataram que essa biomolécula possui atividade antioxidante. Deste modo, pressupõe-se que a atividade antioxidante apresentada na fração acetato de etila da linhagem endofítica *A. versicolor*/LMA 1705 possa ser atribuída ao orcinol.

Os compostos voláteis podem aparecer como produtos intermediários e finais de diversas vias metabólicas (HUNG et al., 2013; SIDDIQUEE et al., 2012). Possivelmente o 4-metoximetilfenol (Figura 20) pode ser um composto intermediário utilizado pelo fungo *Trichoderma* sp.

Figura 20 - Espectro de massas do 4-metoximetilfenol, obtido a partir do cromatograma da fração acetato de etila do endofítico *Trichoderma* sp./LMA 1684.

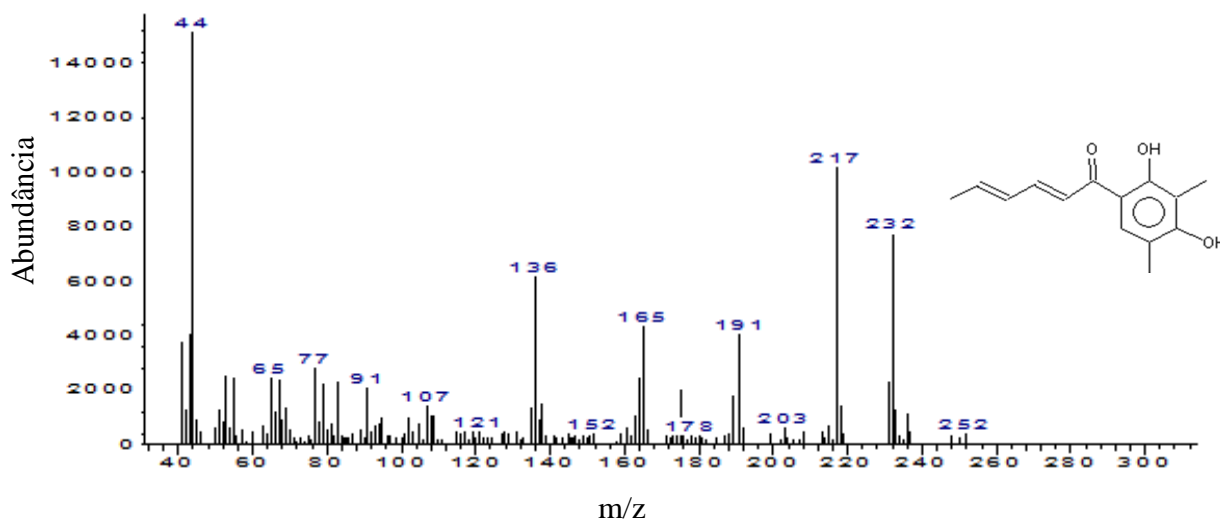


Fonte: arquivos pessoais (2017).

Fraaije et al. (1998) em seu estudo demonstraram que o metabólito 4-metoximetilfenol representa um indutor "natural" utilizado pela enzima vanilil álcool oxidase do fungo *P. simplicissimum*, que catalisa o primeiro passo na degradação deste éter metílico fenólico.

Outro composto identificado do fungo *Trichoderma* sp. foi o composto fenólico sorbicilina (Figura 21). A sorbicilina foi relatada inicialmente como sendo um contaminante no processo de produção da penicilina, por Cram e Tishler (1948), onde a mesma foi isolada e elucidada juntamente com outros compostos de *Penicillium notatum*. O reisolamento da sorbicilina ocorreu em 1953 por Arima e colaboradores, também no fungo *P. notatum*. Em 1981, Trifonov e colaboradores relataram a presença de sorbicilina em *Verticillium intertextum* e caracterizaram vários outros compostos que estavam estruturalmente relacionados à sorbicilina. Ao longo dos anos, membros dessa família de metabólitos produtores de pigmento amarelo, têm sido isolados de diferentes fungos em diversos ambientes, inclusive aqueles que habitam o interior de plantas (HARNED; VOLP, 2011; SALO et al., 2016). É importante ressaltar que este é primeiro relato desse composto como produto de *Trichoderma* sp. associado a *P. incarnata*.

Figura 21 - Espectro de massas da Sorbicilina, obtido a partir do cromatograma da fração acetato de etila do endofítico *Trichoderma* sp.LMA 1684.



Fonte: arquivos pessoais (2017).

De acordo com Salo et al. (2016), os sorbicilinoídes, que são derivados da sorbicilina, constituem uma classe de compostos que possuem várias atividades biológicas, entre elas atividade antioxidante, antiviral, antiinflamatória e antimicrobiana.

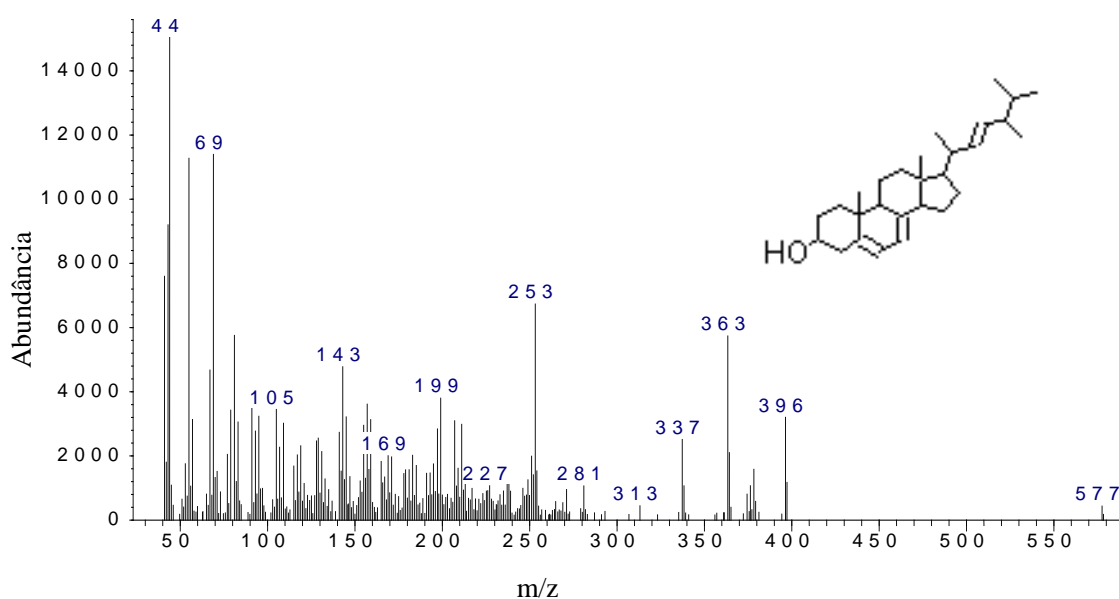
Ma et al. (2011) estudando o fungo *Trichoderma* sp. isolado de terras salinas no litoral da Baía de Bohai, na Província de Shandong - China, isolaram dois compostos análogos à sorbicilina. Os efeitos citotóxicos dos compostos isolados foram preliminarmente avaliados contra células leucêmicas (P388 e HL-60). Os valores de IC_{50} dos compostos 1 e 2 contra as células P388 e HL-60 foram 72,8 e 44,5 e 52,5 e 81,2 mM, respectivamente, foi utilizado fluorouracilo como controle positivo (IC_{50} 3,8 e 18,6 mM contra células P388 e HL-60, respectivamente). Os resultados mostraram que esses compostos eram ligeiramente ativos contra as duas linhagens celulares. Além disso, os compostos 1 e 2 mostraram certa atividade antioxidante contra o radical livre DPPH com valores de IC_{50} de 175 e 142 mM, respectivamente, foi utilizado o ácido ascórbico como controle positivo, IC_{50} 21 mM. Possivelmente, podemos atribuir à sorbicilina a atividade antioxidante do fungo *Trichoderma* sp. isolado em nosso estudo.

Em sua pesquisa com fungos endofíticos associados à *Paeonia delavayi* Wu et al. (2011) isolou um endófito de *Trichoderma* de onde foram extraídos metabólitos como o ácido tricodérico, o 2 β -hidroxitricohoacorenol, o ciclonerodiol, o óxido de ciclonerodiol e a sorbicilina. Todas estas biomoléculas apresentaram atividade inibitória frente a *E. coli* e *Staphylococcus albus* e graus variáveis de atividade contra *Shigella sonnei* e fungos fitopatogênicos como *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum*, *F. moniliforme* e *Pyricularia*

oryzae. Além disso, estes compostos apresentaram atividade inibitória contra o patógeno humano *Exophiala dermatitidis*. Os dados obtidos por Wu et al. (2011), corroboram com os nossos resultados, uma vez que foi constatada a presença de sorbicilina em isolados de *Trichoderma*. Consideramos, no entanto, que há necessidade de maiores estudos com a finalidade de estruturar a molécula por meio de métodos apropriados, isolá-la e confirmar sua atividade biológica.

Ergosterol (Figura 22), outro metabolito identificado na fração acetato de etila do fungo *Trichoderma* sp. é o principal esterol produzido por fungos. Este terpenoide MM = 396 ocorre como um componente de membranas de células fúngicas, por isso é suscetível de correlacionar com o crescimento de hifas e biomassa. Considera-se um bom candidato como um metabolito fúngico, para medir o crescimento de fungos em alimentos (Weete, 1974).

Figura 22 - Espectro de massas do ergosterol, obtido a partir do cromatograma da fração acetato de etila do endofítico *Trichoderma* sp./LMA 1684.



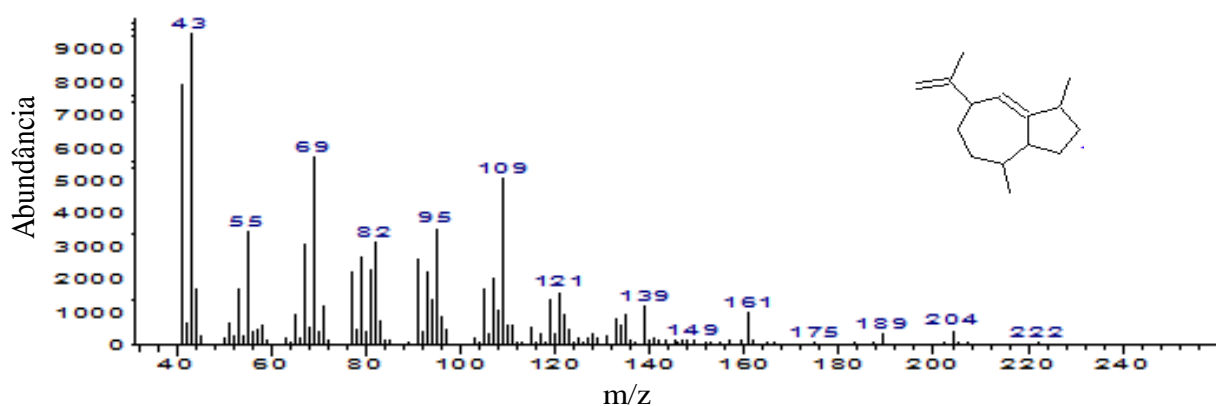
Fonte: arquivos pessoais (2017).

O composto isopropenil-1,4-dimetil-1,2,3,3a,4,5,6,7-octahidroazuleno (Figura 23) identificado na fração acetato de etila do fungo *Fusarium* sp. 4 é um sesquiterpeno derivado do azuleno. O azuleno é um isômero do naftaleno, que possui intensa cor azul, este composto foi descoberto inicialmente nas espécies de planta *Achillea millefolium* e *Artemisia arborescens*. O azuleno é o composto responsável pela coloração azul dos fungos basidiomicetos *Terana caerulea* e *Lactarius índigo*. Entre as atividades dessa biomolécula pode ser destacada a atividade anti-inflamatória, cicatrizante, anti-alérgica, além de ser um

excelente descongestionante, normalizador e calmante tópico (HAGGAG et al., 1975; BRIGGS et al., 1976; STICHER, 1977; HARMON et al., 1980).

Corroborando com os nossos resultados, Zhang et al. (2011) encontraram dois compostos voláteis derivados do azuleno no extrato bruto do fungo endofítico *Fusarium tricinctum* isolado da planta *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. Os compostos identificados por meio de CG-EM relatados por Zhang et al. (2011), são o azuleno [1S-(1 α .,7 α .,8 α \beta.)] 1,2,3,5,6,7,8,8a-Octahidro-1,4-dimetil-7-(1-Metiletênio) e o [1aR-(1 α .,4 α \beta,7 α .,7 α \beta,7 β \alpha.)] Decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno-1H-ciclopropilazulene.

Figura 23 - Espectro de massas do isopropenil-1,4-dimetil-1,2,3,3a,4,5,6,7-octahidroazuleno, obtido a partir do cromatograma da fração acetato de etila do endofítico *Fusarium* sp. 4./LMA 1719.



Fonte: arquivos pessoais (2017).

De acordo com Liu (2002), os derivados do azuleno podem apresentar coloração, por exemplo, o composto azuleno-1-carboxaldeído, apresenta coloração magenta, com base nesta informação, possivelmente a coloração arroxeadada apresentada pelo extrato bruto do endófito *Fusarium* sp. 4, pode ser atribuída ao composto isopropenil-1,4-dimetil-1,2,3,3a,4,5,6,7-octahidroazuleno identificado na fração acetato de etila, juntamente com outras moléculas que apresentam esta tonalidade.

5.4. Análises químicas nas folhas de *P. incarnata*

A abordagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico a 60% (v/v) das cinco amostras de folhas de *P. incarnata*, revelou a presença de diferentes grupos de metabólitos secundários. Segundo López (2006), moléculas resultantes do metabolismo secundário dão origem aos

princípios ativos das plantas, de modo que muitos vegetais apresentam importância medicinal e ecológica, devido à ação desses compostos sobre seus mecanismos de defesa e perpetuação.

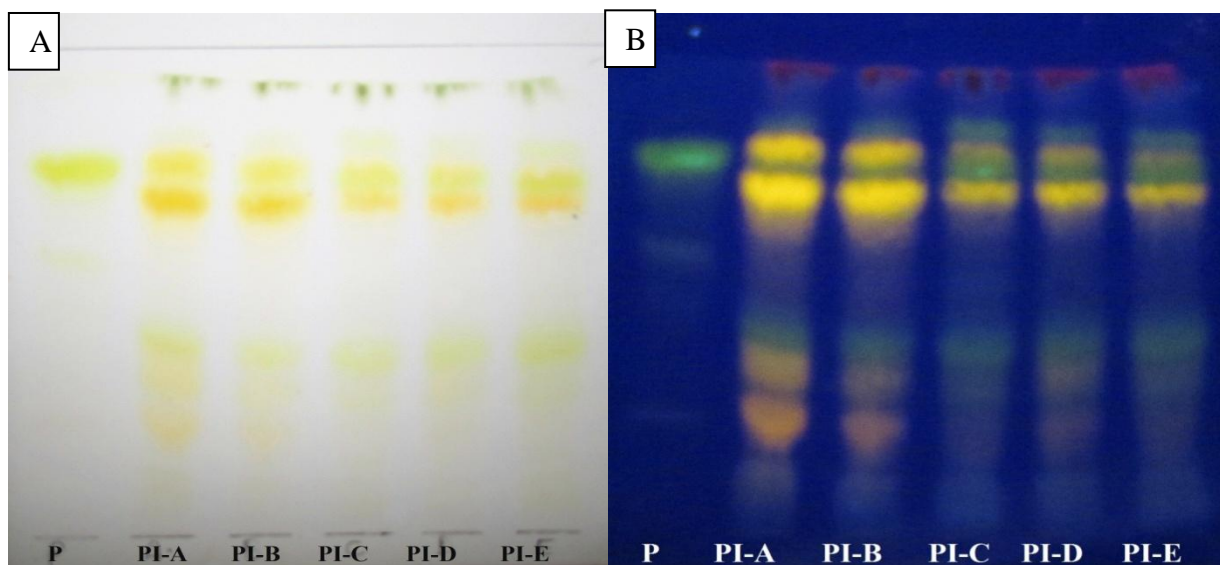
Dentre os compostos encontrados foi verificada a presença de flavonoides, fenóis e alcaloides nos cinco espécimes analisados. Esses resultados corroboram com aqueles relatados em estudos anteriores, no qual também foram detectadas as classes de substâncias mencionadas na espécie *P. incarnata* (MENDEZ et al., 2011). Não foi constatada a presença de saponinas nos extratos analisados. Esses dados podem ser confirmados com os obtidos na literatura, pois de acordo com Reginatto et al. (2004) até aquele momento somente a espécie *P. alata* apresentava saponinas como metabólitos secundários majoritários, diferindo das demais espécies do gênero, nas quais os flavonoides são os metabólitos principais (GOSMANN et al., 2011).

Os alcalóides, que são compostos heterocíclicos que contém nitrogênio em sua estrutura, já foram descritos para o gênero *Passiflora*, neste grupo de plantas eles são do tipo indólicos, da família dos β - carbolinicos, sendo que muitos desses possuem atividades farmacológicas, como anti-hipertensiva e ansiolítica (HARBORNE; BAXTER, 1995). Há relatos da presença de vários grupos de alcalóides (harmina, harmol, harmalina, harmalol e harmana) para a espécie *P. incarnata* (POETHKE et al., 1970; SPENCER; SEIGLER, 1985; REHWALD et al., 1995; SAMPATH et al., 2011).

Como já relatado anteriormente, os principais metabólitos da espécie estudada são os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, estes compostos foram identificados nos testes fitoquímicos. Neste estudo utilizamos outros três métodos para analisar a presença de flavonoides nas folhas de *P. incarnata*, CCD e espectrofotometria UV-Vis e CLAE-DAD.

Na Figura 24 é possível comparar o perfil cromatográfico por CCD nas cinco amostras analisadas, nela observou-se que há uma composição semelhante de flavonoides entre os espécimes. O padrão utilizado nesta análise foi a vitexina (Rf 0,8). As amostras PI-A e PI-B, apresentaram as bandas com Rf 0,72 e 0,80 mais intensas, indicando que esses compostos estão em maior quantidade nessas amostras. A diferença de coloração para a vitexina e as amostras que apresentaram mesmo Rf, pode ser justificada, pois em seu estudo avaliando o perfil cromatográfico de espécies do gênero *Passiflora*, Wosch et al. (2017) utilizando mesma fase móvel e reveladores, observaram coloração diferentes (amarelo, amarelo esverdeado e laranja) para a vitexina na espécie *P. incarnata*, corroborando com as bandas observadas em nosso estudo.

Figura 24 – Cromatoplaca observada em luz visível (A) e em luz UV₃₆₆ (B) utilizando fase móvel polar (acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água) e reveladores difenilborato de aminoetanol a 1% (p/v) e macrogol a 5% (p/v).

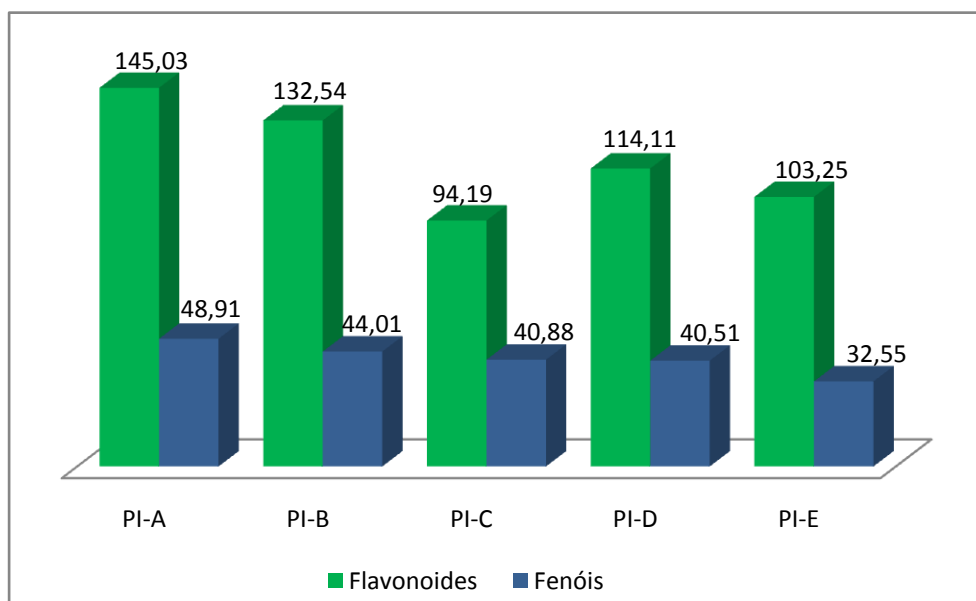


Fonte: arquivos pessoais (2016).

P: padrão vitexina; PI-A a PI-E: amostras de extrato etanólico de folhas de *P. incarnata*.

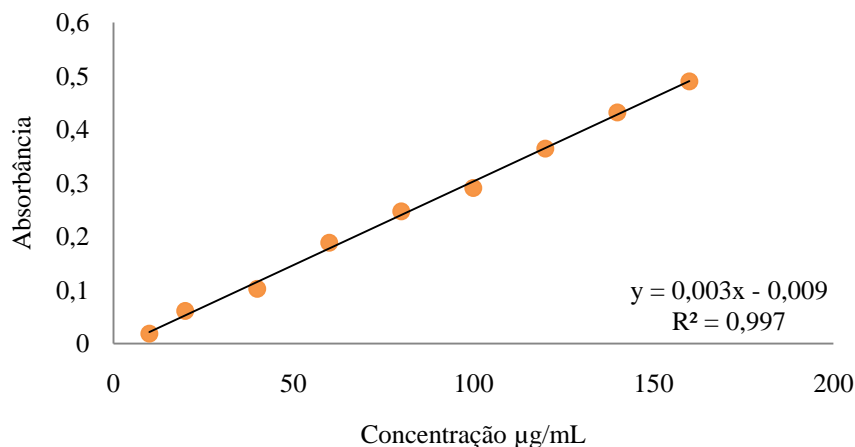
Na determinação da composição quantitativa de flavonoides e fenóis, os teores para estes compostos observados para os extratos etanólicos se apresentaram diferentes, entre as plantas analisadas (Figura 25). Os dados utilizados para construção das respectivas curvas analíticas são mostrados nas Figuras 26 e 27.

Figura 25 – Teor de flavonoides totais expressos em rutina e de compostos fenólicos expressos em ácido gálico, dos cinco espécimes de *P. incarnata*.



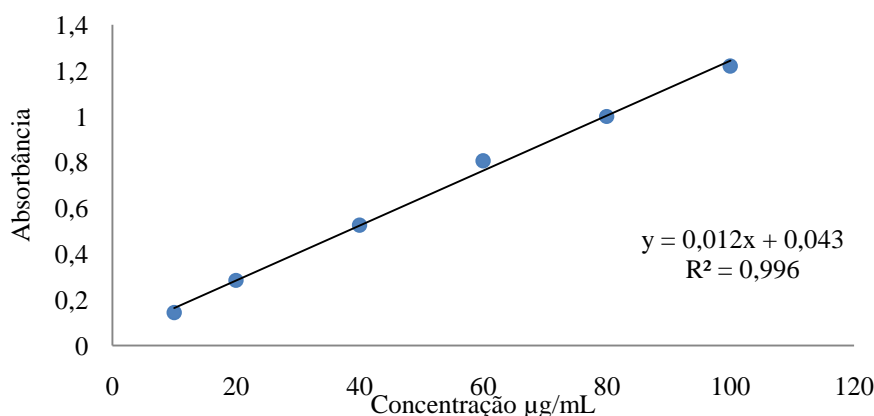
Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Figura 26 - Curva analítica expressa em $\mu\text{g/mL}$ obtida para a rutina ($\lambda = 430\text{nm}$)



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Figura 27 - Curva analítica expressa em $\mu\text{g/mL}$ obtida para o ácido gálico ($\lambda = 765\text{nm}$)



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Os resultados observados na cromatoplaça (Figura 24) para as amostras PI-A e PI-B que apresentaram bandas intensas podem ser confirmados nos testes quantitativos, onde essas amostras apresentaram teores de flavonoides iguais a 145,03 mg e 132,54 mg expressos em rutina, respectivamente.

Aplicou-se o teste de Kruskal-Wallis, que mostrou que a planta PI-A difere estatisticamente das plantas PI-C e PI-E e a planta PI-B difere de PI-E em relação ao teor de flavonoides totais, já para os compostos fenólicos o teste indicou que PI-A difere de PI-C, PI-D e PI-E e PI-B difere apenas de PI-E.

Uma das possíveis explicações para a variação no teor de flavonoides entre as amostras analisadas pode ser esclarecida pela exposição das folhas à radiação ultravioleta. Estes são acumulados principalmente nas folhas, pois absorvem a radiação UV-B, e sua síntese é controlada por enzimas da rota biossintética dos fenilpropanoides, que podem ter sua

expressão gênica induzida pela luz (WATERMAN; MOLE, 1994; BHARTI; KHURANA, 1997).

Como informado anteriormente, os flavonoides pertencem a uma classe muito extensa de moléculas naturais que estão amplamente distribuídas no reino vegetal. São substâncias fenólicas presentes em todas as partes das plantas, desde as raízes até as flores e frutos e folhas, sendo que a espécie *P. incarnata* é uma das espécies que apresenta maior teor desta biomolécula em suas folhas (DHAWAN et al., 2004). Foi relatado por Menghini et al. (1993) que a maior concentração de flavonoides em *P. incarnata* encontra-se nas folhas, sendo que o maior teor de isovitexina foi encontrado no período de pré-floração e fase de floração.

Dhawan et al. (2004) em sua revisão sobre o gênero *Passiflora* relata que em vários estudos quantitativos, observou-se que o extrato etanólico de *P. incarnata* apresentou maior teor de flavonoides, em comparação com outros solvente, além disso a técnica de espectrofotometria UV-Vis vem sendo utilizada na avaliação de soluções extrativas do gênero *Passiflora* (PETRY et al., 1998; SOUZA et al., 2000; DE-PARIS et al., 2002). A literatura descreve teores de flavonoides totais presentes em *P. alata* de 1,90% (p/p) para extrato aquoso (DE-PARIS et al., 2002) e de 2,90% (p/p) para extrato hidroetanólico (PETRY et al., 2001). O ensaio se baseia na formação de um complexo flavonoide- AlCl_3 , que permite a determinação quantitativa.

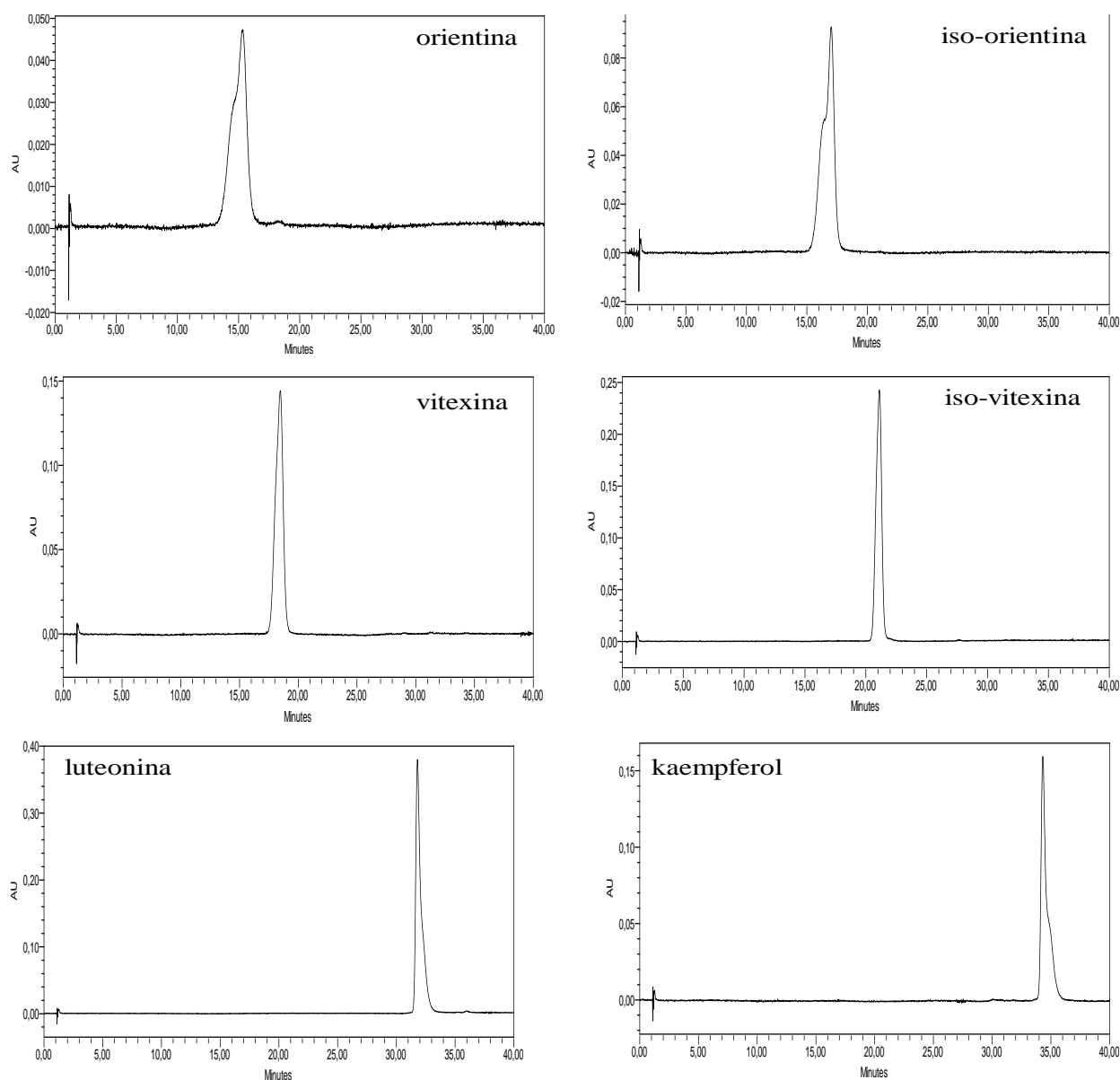
Os nossos dados corroboram com os dados disponíveis na literatura quanto ao teor de flavonoides quantificados nas folhas de *P. incarnata*. Masteikova et al. (2008), analisaram a presença de flavonoides no extrato aquoso e etanólico de *P. incarnata* e encontraram teores de 12 mg e 164 mg respectivamente, os teores foram expressos em rutina.

Estudando o teor de compostos fenólicos e flavonoides presente no extrato hidroalcoólico de vinte plantas medicinais indianas distribuídas em quinze famílias diferentes, Sulaiman e Balachandran (2012), concluíram que as plantas pertencentes a família Mimosaceae é a fonte mais rica em fenóis (*Acacia nilotica*: 80,63 mg EAG, *Acacia catechu* 78,12 mg EAG, *Albizia lebbek* 66,23 mg EAG) entre as espécies analisadas. O segundo grupo com alto conteúdo fenólico é a família Caesalpiniaceae (*Senna tora* 65,54 mg EAG, *Saraca asoca* 38,15 mg EAG e *Caesalpinia sappan* 24,52 mg EAG). A família Caesalpiniaceae possui uma relação significativa entre o teor de fenóis e flavonoides que indica que a família é rica nestes compostos. As folhas de *Oroxylum indicum* apresentou o menor teor de flavonoides (0,08 mg), já *Senna tora* o maior teor (21,58 mg). *Embelia ribes*, *Aerva lanata*, *Biophytum sensitivum* mostram um valor mediano desses compostos, 13,52 mg, 22,7 mg e 13,52 mg EAG para compostos fenólicos e 01,86 mg, 6,99 mg e 01,86 mg para

flavonoide, respectivamente. *Ficus microcarpa* e *Ficus racemosa* pertencentes à família Moraceae apresentam fenólicos comparativamente bons em comparação com as outras plantas, 24,47 mg EAG e 12,36 mg EAG.

Neste trabalho utilizamos a técnica de CLAE-DAD como método complementar à espectrofotometria UV-Vis, a fim de identificar e quantificar os flavonoides presentes no extrato etanólico de *P. incarnata*. Foi utilizado como padrão de referência os flavonoides já descrito nesta espécie, que são, orientina, iso-orientina, vitexina, isovitexina, luteolina e kaempferol, os cromatogramas destes padrões encontram-se na Figura 28.

Figura 28 – Cromatograma dos padrões de flavonoides já encontrado na espécie de *P. incarnata*. Orientina (15,34 min.), Iso-orientina (17,00 min), Vitexna (18,47 min.), Isovitexina (21,11 min.), Luteolina (31,79 min) e Kaempferol (34,31 min.).



Fonte: arquivos pessoais (2017).

A quantificação dos flavonoides nos extratos hidroetanólicos 60% (v/v) das amostras de *P. incarnata* foi realizado por meio do método de padronização externa, utilizando-se as curvas analíticas construídas para cada padrão. Não foi constatada a presença de orientina, luteolina e kaempferol nas cinco amostras de *P. incarnata* analisadas. Os teores de flavonoides encontrados nas amostras estão representados na Tabela 10.

Tabela 10 – Teor (%) dos flavonoides encontrados nas folhas de *P. incarnata*.

Amostras	Flavonoides		
	Iso-vitexina	Vitexina	Iso-orientina
PI-A	11,60	1,41	2,96
PI-B	8,37	0,99	2,42
PI-C	5,91	0,52	2,03
PI-D	4,25	0,45	3,31
PI-E	2,89	0,25	3,92

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

A amostra PI-A apresentou os maiores teores de iso-vitexina e vitexina, 11,60 e 1,41 % respectivamente, seguido da amostra PI-B com 8,37 e 0,99 % respectivamente. As amostras PI-D e PI-E possuem os maiores teores para iso-orientina, 3,31 e 3,92% respectivamente.

A ausência da orientina e outros flavonoides pode estar relacionada a diversos fatores de cultivo de *P. incarnata*, bem como ao estágio de desenvolvimento da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Dentro da família Passifloraceae a espécie *P. incarnata* é mais estudada do ponto de vista farmacológico (DHAWAN et al., 2004; MIRODDI et al., 2013), sendo que seu extrato foliar tem demonstrado possuir atividade ansiolítica e sedativa (SAMPATH et al., 2011; APPEL et al., 2011), bem como no tratamento para diabétes (GUPTA et al., 2012), além de atividade antiinflamatória (MONTANHER et al., 2007) e antioxidante (ZANOLI et al., 2000).

Chipault et al. (1952, 1955) estão entre os primeiros pesquisadores a estudar a atividade antioxidante de extratos vegetais, desde então, o interesse em relatar a atividade antioxidante de extratos de plantas aumentou consideravelmente, ampliando informações sobre os compostos e mecanismos envolvidos. A atividade antioxidante tanto de compostos puros, quanto de extratos vegetais, tem sido determinada pela quantificação do consumo de oxigênio ou pela produção de hidroperóxidos ou outros produtos de degradação (BRAND-WILLIAMS, CUVELIE; BERSSET, 1995). Em sua revisão Alam et al. (2013) descrevem uma variedade de métodos que estão sendo utilizado para determinar a capacidade antioxidante e

avaliar a degradação de radicais a partir de produtos naturais, sendo que o método mais utilizado para avaliar a atividade antioxidante é o da captura do radical livre DPPH.

A ação antioxidante dos extratos etanólicos de *P. incarnata* foi analisada por meio da capacidade dos antioxidantes presentes na amostra de capturarem o radical livre DPPH, os resultados obtidos estão descritos na Tabela 11 e Figura 29.

Tabela 11 – IC_{50} das amostras de *P. incarnata*

Espécime de <i>P. incarnata</i>	IC_{50} (mg/mL)
PI-A	$0,87 \pm 1,233$
PI-B	$1,15 \pm 1,784$
PI-C	$1,46 \pm 0,982$
PI-D	$1,95 \pm 1,433$
PI-E	$1,71 \pm 1,224$
Ácido ascórbico	$0,28 \pm 0,091$
BHT	$0,42 \pm 0,101$
Rutina	$0,25 \pm 0,301$

Fonte: elaborado pelo autor (2016).

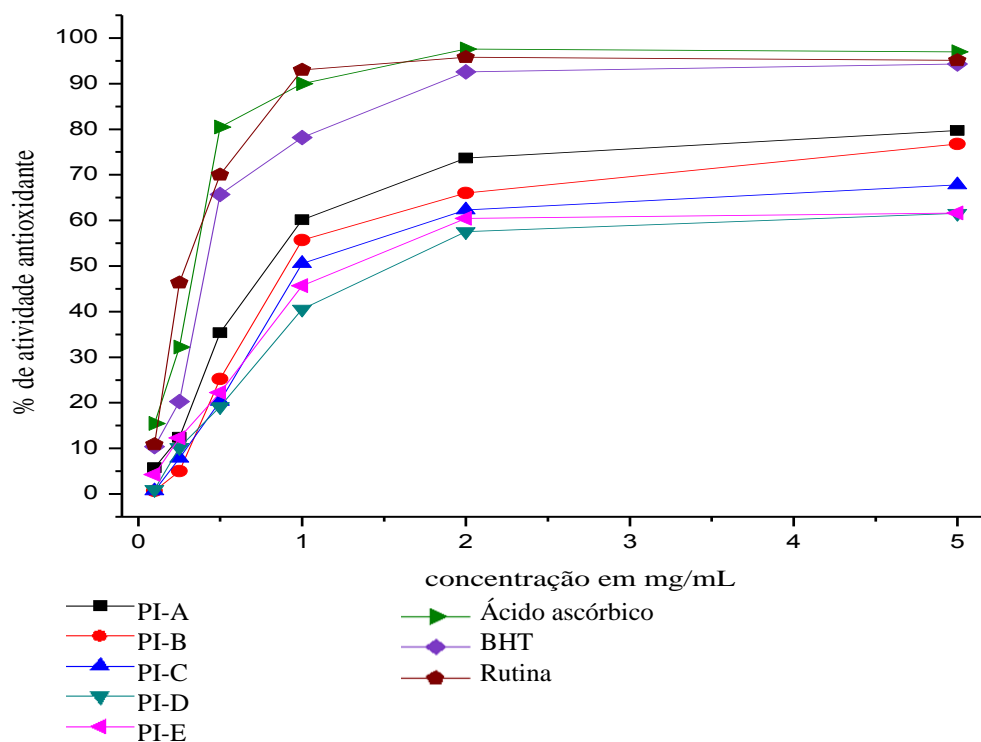
Marroquín et al. (2012) estudando *P. edulis*, *P. incarnata* e *P. ligularis* cultivadas na Guatemala, encontraram um melhor resultado de atividade antioxidante para o extrato metanólico de *P. ligularis* (IC_{50} 1,65 mg/mL), o extrato metanólico de *P. incarnata* apresentou atividade antioxidante de IC_{50} 2,2 mg/mL. Todos os espécimes analisados no nosso estudo apresentaram IC_{50} (0,87 – 1,71 mg/mL) menores do que a *P. incarnata* cultivada nos territórios da Guatemala, as condições de plantio, localização e o solvente entrator podem ser as causas dessa diferença.

Ramaiya et al. (2014) encontraram valores distintos de atividade antioxidante em três espécies diferentes de *Passiflora* utilizando três diferentes solventes. O IC_{50} variou de 0,456 a 3,42 mg/mL e de 0,31 a 2,13 μ g/mL para as folhas e caules, respectivamente. O percentual de atividade antioxidante foi maior no extrato metanólico, seguido pela acetona, a menor atividade antioxidante foi observada nos extratos de éter de petróleo. Observou-se que a atividade antioxidante da folha foi mais alta no extrato de metanol de *P. maliformis* (0,45 mg/mL), seguindo-se as de *P. edulis* (0,65 mg/mL) e *P. quadrangularis* (0,78 mg/mL).

Estudando a atividade antioxidante de sete espécies do gênero *Passiflora* Montero et al. (2014), viram que as espécies de interesse comerciais apresentaram valores variados de atividade antioxidante, *P. edulis* apresentou média de 60%, *P. alata* 40% e *P. incarnata* 55%, já as espécies nativas, como *P. gardneri* e *P. mucronata* apresentaram menos de 40% de captura do radical livre DPPH. Masteikova et al. (2008), estudando o extrato etanólico de *P.*

incarnata, constatou que o extrato das folhas de maracujá era capaz de eliminar 70% dos radicais livres presentes no meio. Essas informações corroboram com os dados obtidos em nosso estudo, onde o percentual de atividade antioxidante variou de 58-79% entre as amostras de *P. incarnata*.

Figura 29 - Percentual de atividade antioxidante entre as amostras de *P. incarnata* avaliadas.



Fonte: elaborado pelo autor (2016).

Os dados obtidos na triagem dos fungos endofíticos mostram que os isolados *Aspergillus versicolor* e *Chaetomium* sp. apresentam maior atividade antioxidante que sua planta hospedeira 94,31 e 94,64% respectivamente, e IC_{50} também menor 0,23 e 0,21 mg.g⁻¹. Isso nos mostra que os fungos endofíticos isolados de *P. incarnata* são capazes de produzir moléculas bioativas com capacidade antioxidante. Estudos posteriores poderão elucidar a estrutura química dessas moléculas e sua aplicação biotecnológica, bem como nos mostrar se esses compostos são os mesmos presentes nas folhas de *P. incarnata*.

6 CONCLUSÃO

As amostras de folha de *P. incarnata* apresentaram fungos endofíticos de ocorrência comum em outras plantas medicinais, provavelmente o número significativo de morfotipos não esporulantes obtidos também revele espécies ainda desconhecidas para a ciência.

Os dados obtidos mostraram que os endófitos aqui isolados são capazes de produzir pelo menos uma classe de metabolito secundário (compostos fenólicos, flavonoides, taninos e/ou saponinas) de importância farmacêutica, como revelado pela triagem fitoquímica.

Para estudos futuros de aplicação farmacológica de nossos isolados, os compostos fenólicos devem ser priorizados, pois dentre a triagem realizada foi o metabólito de maior ocorrência, com destaque para a atividade antioxidante.

A espectrofotometria no UV-visível de complexo flavônicos com cloreto de alumínio é adequada para a determinação de flavonoides em filtrados fúngicos, ao contrário do método que foi adaptado da Farmacopéia Européia.

Nossos resultados mostraram que os endófitos *Chaetomium* sp/LMA 1793 e *Aspergillus versicolor*/LMA 1705 apresentam compostos com elevada atividade antioxidante, uma vez que estes fungos apresentaram IC₅₀ menores que os extratos etanólicos das folhas de *P. incarnata* e dos padrões utilizados neste estudo e, portanto, podem ser considerados como possíveis fontes promissoras de novos fármacos.

As análises por CG-EM comprovaram a presença de alguns compostos fenólicos tais como metoximetil fenol, orcinol e sorbicilina, sendo os dois últimos de importância para a indústria farmacêutica.

7. PERSPECTIVAS

O presente trabalho contribuiu com a criação de uma coleção de micro-organismos isolados de hospedeiro ainda não estudado no âmbito de micro-organismos endofíticos. Esse importante patrimônio genético está em avaliação por discentes que compõem o projeto vinculado à FAPESP.

Os resultados preliminares revelaram que os fungos bioprospectados são muitíssimos promissores para futuras aplicações biotecnológica, merecendo destaque cinco deles, onde produziram biomoléculas com alta atividade antioxidante, além disso todas as linhagens apresentaram diversidade de metabolitos químicos mediante a análise qualitativa de fitoconstituintes.

Estudos futuros poderão continuar a explorar o potencial biotecnológico, farmacêutico e taxonômico dessa coleção de micro-organismos. Além disso, muitos dos endófitos recuperados das folhas de *P. incarnata* incluem isolados que não ainda não foram identificados morfológica e molecularmente, portanto, estudos futuros de taxonomia e sistemática poderão revelar espécies novas contidas nessa coleção.

REFERÊNCIAS

- ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J. R.; KHAN, I. A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants - I. Application to *Passiflora* flavonoids. **Pharmaceutical Biology**, United Kingdom, v. 40, n. 2, p. 81-91, 2008.
- AGUIAR, C. L. et al. Transformações enzimáticas de flavonoides. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 25, n. 1, p. 61-76, 2007.
- AHMAD, R. et al. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some *Hedyotis* species. **Life Sciences**, Netherlands, v. 76, n. 17, p. 1953-1964, 2005.
- AKHONDZADEH, S. et al. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot double-blind randomized controlled trial with oxazepam. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, United Kingdom, v. 26, n. 5, p.363-367, 2001.
- ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Saudi Arabia, v.21, n. 2, p. 143–152, 2013.
- ALMEIDA, C.V.; YARA, R.; ALMEIDA, M. Fungos endofíticos isolados de ápices caulinares de pupunheira cultivada *in vivo* e *in vitro*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n. 5, p.467-470, 2005.
- ALONSO, J. R. **Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y Farmacológicas**. Buenos Aires: Isis Ediciones SRL, 1998.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- APPEL, K. et al. Modulation of the gamma-aminobutyric acid (GABA) system by *Passiflora incarnata* L. **Phytotherapy Research**, Unites Kingdom, v. 25, p. 838-843, 2011.
- ARAÚJO, W. L. et al. **Guia Prático: Isolamento de Microrganismos Endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2010. 167 p.
- ARIMA, K.; NAKAMURA, H.; KOMAGATA, K. Studies on variation of penicillin producing mold. Part II. Biochemical genetical studies on the yellow pigments losing mutation of chrysogenum Q 176 to pigmentless sultant Pen. chrysogenum Q 176. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, Japan, v. 27, p. 345–348, 1953.
- ARORA, D. S.; CHANDRA, P. Antioxidant activity of *Aspergillus fumigatus*. **ISRN Pharmacology**, United States, p. 1-11, 2011.
- ARORA, D. S.; CHANDRA, P. Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 765-777, 2010.

AWAD, N. E. et al. Bioassays guided isolation of compounds from *Chaetomium globosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, France, v. 24, n. 2, p. 35-42, 2014.

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

AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N.; DESMUCKH, S. K. (Org.). **Fungi: multifacetated microbes**. 1st ed. New Dehli: Anamaya Publication, 2006. p. 189-207.

BARREIROS, A. L. B. S. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BARROS, I. A. **Isolamento e biodiversidade de bactérias endofíticas de *Dicksonia sellowiana* e seu potencial biotecnológico**. 2003. 76f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2003.

BARY, A. **Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten und Myxomyceten**. Leipzig: Wilhelm Engelman, 1866. 316p.

BASHYAL, B. P. et al. Globosumones A-C, cytotoxic orsellinic acid esters from the Sonoran desert endophytic fungus *Chaetomium globosum*. **Journal of Natural Products**, United States, v. 68, n. 5, p. 724–728, 2005.

BENAVENTE-GARCÍA, O. et al. Uses and properties of *Citrus* flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, United States, v. 45, n. 12, p. 4505–4515, 1997.

BENINCÁ, J. P. et al. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, Netherlands, v. 104, n. 3, p. 1097-1105, 2007.

BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 25, n. 2, p. 355-356, 2003.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine: Expanded Commission and Monographs**. Austin: American Botanical Council, 2000.

BOTELLA, L.; DIEZ, J. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. **Fungal Diversity**, Netherlands, v. 47, p. 9–18, 2011.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, United Kingdom, v. 28, n. 1, p.25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, Canada, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRIGGS, L. H. et al. Chemistry of fungi XI. Corticins A, B and C, benzobisbenzofurans from *Corticium caeruleum*. **Australian Journal of Chemistry**, Australia, v. 29, p. 179-190, 1976.

BROCKMANN, H.; FALKENHAUSEN, E. H.; DORLARES, A. Die konstitution des hypericins. **Naturwissenschaften**, Germany, v. 37, p. 540–545, 1950.

BROUILLARD, R. et al. pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. **Journal Chemical Society Perkin Transactions**, London, v.2, p.1235-1241, 1991.

BRUCKNER, C. H.; PICANÇO, M. C. **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. 286p.

CAMPOS, M. G. **Efeito da adubação orgânica na produção de fitomassa e nos compostos bioativos de *Passiflora incarnata* L.** 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Horticultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

CANNON, P. F. et al. *Colletotrichum* – current status and future directions. **Studies in Mycology**, Arizona, v. 73, n. 1, p. 181-213, 2012.

CARROL, G. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: FOKKEMA, N. J.; VAN DEN HEAVEL, J. (Ed.). **The Microbiology of the Phyllosphere**. London: Cambridge University Press, 1986. p. 205-222.

CARVALHO, J. C. T. et al. Compostos fenólicos simples e heretosídeos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2010. p. 519-536.

CASTILLO, U. F. et al. Biologically active endophytic streptomycetes from *Nothofagus* spp. and other plants in Patagonia. **Microbial Ecology**, United States, v. 53, n. 1, p. 12-19, 2007.

CENTROFLORA, B. *Passiflora incarnata*. **Boletim Técnico do Grupo Centroflora**, Botucatu, n.1, p. 1-28, 2011.

CHATURVEDI, P. et al. Determination of kaempferol in extracts of *Fusarium chlamydosporum*, an endophytic fungi of *Tylophora indica* (Asclepeadaceae) and its anti-microbial activity. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, India, v. 9, p. 51–55, 2014.

CHENG, M. J. et al. Secondary metabolites from the endophytic fungus of *Annulohyphoxylon ilanense*. **Chemistry of Natural Compounds**, United States, v. 49, n. 3, p. 523–525, 2013.

CHIPAULT, J. R. et al. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, Toronto, v.17, p. 46–55, 1952.

CHIPAULT, J. R. et al. Antioxidant properties of spices in oil-in-water emulsion. **Food Research**, Toronto, v. 20, p. 443-448, 1955.

CHITRA, K. P.; PILLAI, K. S. Antioxidants in Health. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, India, v. 46, n. 1, p.1-5, 2002.

CHUNG, K. T. et al. Tannins and human health: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, United States, v. 38, n. 6, p. 421- 464, 1998.

COFFEY, T. **The History and Folklore of North American Wildflowers**. Boston: Houghton Mifflin, 1993. 356 p.

COSTA et al. Chemical profiles of traditional preparations of four South American *Passiflora* species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 26, n. 4, p. 451-458, 2016.

COSTA, A. M.; TUPINAMBÁ, D. D. O maracujá e suas propriedades medicinais - estado da arte. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2005. p. 475-506.

COX, R. J.; SIMPSON, T. J. Fungal type I polyketide synthases. **Methods Enzymol**, United States, v. 459, p. 49-78, 2009.

COX, R. J. Polyketides, proteins and genes in fungi: Programmed nano-machines begin to reveal their secrets. **Organic & Biomolecular Chemistry**, London, v. 5, n. 13, p. 2010-2026, 2007.

CRAM, D. J.; TISHLER, M. Mold metabolites: isolation of several compounds from clinical penicillin. **Journal of American Chemical Society**, United States, v. 70, n. 12, p. 4238-4252, 1948.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p.

CROUS, P. W. et al. **Fungal biodiversity**. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2009. 270 p.

CUI, J. L. et al. Diversity and antioxidant activity of culturable endophytic fungi from alpine plants of *Rhodiola crenulata*, *R. angusta*, and *R. sachalinensis*. **PLoS ONE**, United States, p. 1-16, 2015.

DA SILVA, J. R. S. et al. Efeito do extrato da *Passiflora edulis* na cicatrização de gastrorrafias em ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 52-60, 2006.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DEMAIN, A. L.; FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, United States, v. 69, p. 1-39, 2000.

DE-PARIS, F. et al. Pharmacochemical study of aqueous extract of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Argentina, v. 21, p. 5-8, 2002.

DEVI, N. N.; PRABAKARAN, J. J.; WAHAB, F. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, China, p. 1280-1284, 2012.

DHANKHAR, S. et al. Antioxidant activity of fungal endophytes isolated from *Salvadora oleoides* Decne. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, India, v. 4, n. 2, p. 381-385, 2012.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 94, n. 1, p. 1-23, 2004.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Antiasthmatic activity of methanol extract of leaves of *Passiflora incarnata*. **Phytotherapy Research**, London, v.17, n. 7, p. 821-822, 2003.

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 78, p. 165-170, 2001.

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of Soil Fungi**. 2.ed. Eching: IHW-Verlag, v.1, 1993.

DORKO, C. Antioxidants used in foods. **Food Technology**, United States, v. 48, n. 4, p. 33, 1994.

DOYAMA, J. T. et al. Chemical investigation and effects of the tea of *Passiflora alata* on biochemical parameters in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 96, n. 3, p. 371-374, 2005.

DURÁN, E. L. et al. The foliar fungal endophytes of *Citrus limon* in Argentina. **Canadian Journal of Botany**, Canada, v. 83, p.350-355, 2005.

EIJK, G.W. Isolation and identification of orsellinic acid and penicillic acid produced by *Penicillium fennelliae* Stolk. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Netherlands, v. 35, n. 4, p. 497-504, 1969.

ELLIS, M. B. *More Dematiaceus Hyphomycetes*. Kew: commonwealth Mycological Institute, 1976. 507 p.

EUROPEAN Pharmacopoeia .7ed. Strasbourg: Council of Europe, 2010.

EYBERGUER, A. L.; REJESWARY, D.; PORTTER, J. R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Jornal of Natural Products**, India, v. 69, n. 8, p. 1121-1124, 2006.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. Germoplasma e melhoramento genético do maracujazeiro - Desafios da pesquisa. In: FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T.

V.; BRAGA, M. F. (Ed.). **Maracujá: germoplasma e melhoramento genético**. Planaltina Distrito Federal: Embrapa Cerrados, 2005. p.187-210.

FAURÉ, M. et al. Antioxidant activities of lignans and flavonoids. **Phytochemistry**, New York, v. 29, p. 3773-3775, 1990.

FERNANDES et al. Total Flavonoids Content in the Raw Material and Aqueous Extractives from *Bauhinia monandra* Kurz (Caesalpiniaceae). **The Scientific World Journal**, United States, v. 2012, p. 1-7, 2012.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, Switzerland, v. 3, p. 1-15, 2012.

FILL, T. P.; DA SILVA, B. F.; RODRIGUES-FO, E. Biosynthesis of Phenylpropanoid Amides by an Endophytic *Penicillium brasilianum* Found in Root Bark of *Melia azedarach*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Republic of Korea, v. 20, n. 3, p. 622-629, 2010.

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

FRAAIJE, M. W. et al. Subcellular localization of vanillyl-alcohol oxidase in *Penicillium simplicissimum*. **FEBS Letters**, Heidelberg, v. 422, p. 65-68, 1998.

FRIEDRICH, J. et al. Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v. 28, n. 2, p.127-130, 1999.

GAO, S. S. et al. Comazaphilones A-F, azaphilone derivatives from the marine sediment-derived fungus *Penicillium commune* QSD-17. **Journal of Natural Products**, United States, v. 74, n. 2, p. 256-261, 2011.

GAO, Y. et al. Antioxidant properties, superoxide dismutase and glutathione reductase activities in HepG2 cells with a fungal endophyte producing apigenin from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Food Research International**, United States, v. 49, n. 1, p. 147-152, 2012.

GARCIA-LAFUENTE, A. et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: Implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, Basel, v. 58, p. 537-552, 2009.

GAUCHER, G. M.; SHEPHERD, M. G. Isolation of orsellinic acid synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, United States, v. 32, p. 664-671, 1968.

GERARDO, N. M. et al. Exploring a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ants symbiosis. **Proceeding of the Royal Society of London series B**, London, v. 271, n. 1550, p. 1791-1798, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

- GONÇALVES - FILHO, A. et al. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* (maracujá) na cicatrização de bexiga em ratos: estudo morfológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, p. 1-6, 2006.
- GONTHIER, P.; GENNARO, M.; NICOLOTTI, G. Effects of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. **Fungal Diversity**, Netherlands, v. 21, p. 69-80, 2006.
- GOSMANN, G. et al. Composição química e aspectos farmacológicos de espécies de *Passiflora* L. (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 1, p. 88-99, 2011.
- GOVINDAPPA, M. et al. Phytochemical screening, antimicrobial and in vitro anti-inflammatory activity of endophytic extracts from *Loranthus* sp. **Pharmacognosy Journal**, Netherlands, v. 3, n. 25, p. 82-90, 2011.
- GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAG, Ö.; BALSEVICH, J.; MAZZA, G. Pressurized low polarity water extraction of saponins from cow cockle seed. **Journal of Food Engineering**, London, v. 80, n. 2, p. 619-630, 2007.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **Journal of Natural Products**, India, v. 69, n. 3, p. 509-526, 2006.
- GUO, B. et al. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Moscow, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.
- GUPTA, R. K. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 139, n. 3, p. 801-806, 2012.
- HAGGAG, M. Y.; SHALABY, A. S.; VERZAR-PETRI, G. Thin layer and gaschromatographic studies on the essential oil from *Achillea millefolium*. **Planta Medica**, Germany, v. 27, p. 361-366, 1975.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, v.41, p.95-98, 1999.
- HALLIWELL, B. et al. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.
- HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, London, v. 355, p. 1179-1780, 2000.
- HARBORNE, J. B.; BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**. 2. ed. London: Taylor e Francis, 1995. 976 p.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, New York, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

- HARMON, A. D.; WEISGRABER, K. H.; WEISS, U. Preformed azulene pigments of *Lactarius indigo* (Schw.) Fries (Russulaceae, Basidiomycetes). **Experientia**, Switzerland, v. 36, p. 54 - 56, 1980.
- HARNED, A. M.; VOLP, K. A. The sorbicillinoid family of natural products: Isolation, biosynthesis, and synthetic studies. **Natural Product Reports**, United Kingdom, v. 28, p. 1790–1810, 2011.
- HARPER, J. K. et al. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, London, v. 59, n. 14, p. 2471-2476, 2003.
- HARTWELL, J. L. et al. Podophyllotoxin from *Juniperus* species. Savinin. **Journal of the American Chemical Society**, United States, v.75, p. 235-236, 1953.
- HEIM, E. K.; TAGLIAFERRO, R. A.; BOBILYA, J. D. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Unites States, v. 13, n.10, p. 572-584, 2002.
- HIGGINS, K. L. et al. Communities of fungal endophytes in tropical forest grasses: highly diverse host- and habitat generalists characterized by strong spatial structure. **Fungal ecology**, London, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2014.
- HOEHNE, F. C. **Botânica e agricultura no Brasil (Século XVI)**. São Paulo: Companhia Editora Nacional Brasileira, 1937. 410 p.
- HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 110-125, 1999.
- HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A. Isolation of natural products by droplet counter-current chromatography and related methods. **Natural Products Report**, London, v.1, n.5, p.409-512, 1984.
- HUANG, J. X. et al. *Mucor fragilis* as a novel source of the key pharmaceutical agents podophyllotoxin and kaempferol. **Journal of Pharmaceutical Biology**, India, v. 52, n. 10, p. 1237-1243, 2014.
- HUANG, W. Y. et al. A potential; antioxidant resource: endophytic from medicinal plants. **Economic Botany**, United States, v. 61, n. 1, p. 14-30, 2007.
- HUANG, W. Y. et al. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**, Netherlands, v. 33, p. 61-75, 2008.
- HUANG, W. Y. et al. Endophytic fungi from *Nerium oleander* L (Apocynaceae): main constituents and antioxidant activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v. 23, n. 9, p. 1253-1263, 2007.
- HUANG, Z. et al. Isoflavones from the mangrove endophytic fungus *Fusarium* sp. (ZZF41). **Natural Product communications**, Westerville, v. 5, n. 11, p. 1771-1773, 2010.

HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. **Fungal Ecology**, United Kingdom, v. 6, p.19-26, 2013.

ICHIMURA, T. et al. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, London, v. 70, n. 3, p. 718-721, 2006.

JASZEK, M. et al. New Bioactive Fungal Molecules with High Antioxidant and Antimicrobial Capacity Isolated from *Cerrena unicolor* Idiophasic Cultures. **BioMed Research International**, United States, p. 1-11, 2013.

JORGENSEN, S. H. et al. *Fusarium graminearum* PKS14 is involved in orsellinic acid and orcinol synthesis. **Fungal Genetics and Biology**, United States, v. 70, p. 24 - 31, 2014.

JUDD, W. S. et al. **Sistemática Vegetal: Um enfoque filogenético**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2009. 612 p.

KALINOWSKA, M. et al. The formation of sugar chains in triterpenoid saponins and glycoalkaloids. **Phytochemistry Reviews**, Netherlands, v. 4, n. 2, p. 237-257, 2005.

KALYONCU, F. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of mycelia of 10 wild mushroom species. **Journal of Medicinal Food**, United States, v. 13, n. 2, p. 415-419, 2010.

KANAGASABAPATHY, G. et al. Chemical composition and antioxidant properties of extracts of fresh fruiting bodies of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, United States, v. 59, n. 6, p. 2618–2626, 2011.

KARUNAI SELVI, B.; BALAGENGATHARATHILAGAM, P. Isolation and screening of endophytic fungi from medicinal plants of Virudhunagar district for antimicrobial activity. **International Journal of Science and Nature**, Bangladesh, v. 5, n. 1, p. 147–155, 2014.

KHANNA, V. G.; KANNABIRAN, K. Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v. 24, p. 2737-2740, 2008.

KHIRALLA, A. et al. A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, United Kingdom, v. 8, n. 9, p. 701-704, 2015.

KING, A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, United States, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KRINGS, M. et al. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution and host responses. **New Phytologist**, London, v. 174, n. 3, p. 648-657, 2007.

KRISHNAMURTHY, P.; WADHWANI, A. Antioxidant enzymes and human health. In; M. A. El-Missiry (Ed.). **Antioxidant enzyme**. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. p. 3-18.

- KUKLINSKY, S. J. et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 273, p. 91-99, 2005.
- KUSARI, S. et al. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 71, n. 2, p. 26-29, 2008.
- KUSARI, S. et al. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v. 28, p.1287-1294, 2012.
- KUSARI, S.; LAMSHÖFT, M.; SPITELLER, M. *Aspergillus fumigatus* Fresenius, an endophytic fungus from *Juniperus communis* L. horstmann as a novel source of the anticâncer pro-drug deoxypodophyllotoxin. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v.107, p. 1019-1030, 2009.
- KUSARI, S.; SPITELLER, M. Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? **Natural Product Reports**, London, v. 28, p. 1203-1207, 2011.
- KUSARI, S.; SPITELLER, M. Metabolomics of endophytic fungi producing associated plant secondary metabolites: progress, challenges and opportunities. In: ROESSNER, U. (Ed). **Metabolomics**. Rijeka: InTech, 2012. p. 241-266.
- KYUNGMI, M.; EBELER, S. E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 46, n.1, p.96-104, 2008.
- LADOH-YEMEDA, C. F. et al. Identification and phytochemical screening of Endophytic fungi from stems of *Phragmanthera capitata* (Sprengel) S. Balle (Loranthaceae). **Journal of Applied Biosciences**, India, v. 90, p. 8355-8360, 2015.
- LARRAN, S. et al. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Republic of Korea, v. 18, p. 683-686, 2002.
- LARSEN, T. O.; PERRY, N. B.; ANDERSEN, B. Infectopyrone, a potential mycotoxins from *Alternaria infectoria*. **Tetrahedron Letters**, United Kingdom, v. 44, p. 4511- 4513, 2003.
- LEDWITCH, K. et al. Taxol: Efficacy Against Oral Squamous Cell Carcinoma. **Mini reviews in medicinal chemistry**, China, v. 13, n. 4, p. 509–521, 2013.
- LIEBERMANN, B.; NUSSBAUM, R. P.; GÜNTHER, W. Bicycloalternarenes produced by the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. **Phytochemistry**, United Kingdom, v. 55, p. 987-992, 2000.
- LIN, M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M. T.; PAI, Y. S. *In vitro* antiHIV activity of bioflavonoids isolated from rhus succedanea and garciana multiflora. **Journal Natural Products**, United States, v. 60, p. 884-888, 1997.

- LIU, K.; DING, X.; DENG, B. 10-Hydroxycamptothecin produced by a new endophytic *Xylaria* sp., M20, from *Camptotheca acuminata*. **Biotechnology Letters**, Netherlands, v. 32, p. 689-693, 2010.
- Liu, R. S. H. Colorful azulene and its equally colorful derivatives. **Journal of Chemical Education**, United States, v. 79, p. 183-185, 2002.
- LIU, X. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. **Food Chemistry**, Netherlands, v. 105, p. 548-554, 2007.
- LÓPEZ, O. P.; JIMÉNEZ A. R.; VARGAS F. D. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, London, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.
- LÓPEZ. C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, Boa Vista, v.1, p.19-27, 2006.
- LORENZI, H. E.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil/ Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.
- LUO, S.L. et al. Biotransformation of saponins by endophytes isolated from *Panax notoginseng*. **Chemistry and Biodiversity**, Germany, v. 10, p. 2021-2031, 2013.
- MA, L.; LIU, W.; HUANG, Y.; RONG, X. Two acid sorbicillin analogues from saline lands-derived fungus *Trichoderma* sp. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 64, n. 9, p. 645-657, 2011.
- MACDOUGAL, J. M. Revision of *Passiflora* subgenus *Decaloba* section *Pseudodysosmia* (Passifloraceae). **Systematic Botany Monographs**, Laramie, v. 41, p. 1-46, 1994.
- MAHADY, G. B. et al. *In vitro* susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Phytotherapy Research**, London, v. 19, n. 11, p. 988-991, 2005.
- MARCHART, E.; KRENN, L.; KOOP, B. Quantification of the flavonoid glycoside in *Passiflora incarnata* by capillary eletroforesis. **Planta Medica**, Germany, v. 69, p. 452-456, 2003.
- MÁRQUEZ, S. S.; BILLS, G. F.; ZABALGOGEAZCOA, I. The endophytic mycobiota of the grass *Dactylis glomerata*. **Fungal Diversity**, Netherlands, v. 27, p. 171-195, 2007.
- MARROQUÍN, M. N.; CRUZ, S. M.; CÁCERES, A. Antioxidant activity and phenolic compounds in three species of Passifloraceae (*Passiflora edulis*, *P. incarnata*, *P. ligularis*) from Guatemala. **Acta Horticulturae**, Belgium, v. 964, p. 93-98, 2012.
- MASTEIKOVA, R. et al. Antiradical activities of the extract of *Passiflora incarnata*. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, Poland, v. 65, n. 5, p. 577-583, 2008.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica experimental**. 2. ed. Ceará: Editora da UFC, 1997. 141p.

- MCGUIRE, C. M. Field performance and phenotypic variation of *Passiflora incarnata* L., in New York State. **Horticultura Science**, Pleasanton, v. 33, n. 2, p. 240-241, 1998.
- MCGUIRE, C. M. *Passiflora incarnata* (Passifloraceae): a new fruit crop. **Economic Botany**, New York, v. 53, p. 161-176, 1999.
- MENDEZ, A. S. L.; SIMIONATO, N. O.; VALDUGA, A. T.; REGINATTO, F. H. Caracterização de preparações extrativas obtidas de *Passiflora alata* Curtis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 32, p. 105-111, 2011.
- MENGHINI, A. et al. Flavonoids contents in *Passiflora* spp. **Pharmacology Research Communications**, Netherlands, v. 27, p. 13-14, 1993.
- MENGHINI, A.; MANCINI, L. A. TLC determination of flavonoid accumulation in clonal population of *Passiflora incarnata* L. **Pharmacology Research Communications**, Netherlands, v. 20, p. 113-116. 1988.
- MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAMI, C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: HARBORNE, J. B. (Ed.). **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 619-652.
- MIRODDI, M. et al. *Passiflora incarnata* L.: Ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal Ethnopharmacology**, Ireland, v. 150, p. 791-804, 2013.
- MOELLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, London, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.
- MONTANHER, A. B., et al. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, Ireland, v. 109, n. 2, p. 281-288, 2007.
- MONTERO, D. A.V et al. Comparison of free radical scavenging activity between seven species of *Passiflora* L. **International Journal of Applied Science and Technology**, United States, v. 4, n. 4, 2014.
- MOON, B. S. et al. Glyscavins A, B and C, new phenolic glycoside antioxidants produced by a fungus *Mycelia sterilia* F020054. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 59, p. 735-739, 2006.
- MOSBACH, K. On the Biosynthesis of Lichen Substances. **Acta Chemica Scandinavica**, Denmark, v. 18, p. 329-334, 1964.
- MOSBACH, K.; EHRENSVÄRD, U. Preparation and properties of a depside hydrolysing esterase and of orsellinic acid decarboxylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, United States, v. 22, p. 145-150, 1966.

- MÜLLER, S. D. et al. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Netherlands, v. 37, p. 399-403, 2005.
- MUSSI-DIAS, V.; ARAÚJO, A. C. O.; SILVEIRA, S. F.; ROCABADO, J. M. A.; ARAÚJO, K. L. Fungos endofíticos associados a plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n. 2, 2012.
- NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. (Ed.). **Food Chemistry**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1985. p.139-244.
- NICOLETTI, R.; FIORENTINO, A. Plant bioactive metabolites and drugs produced by endophytic fungi of Spermatophyta. **Agriculture**, Canada, v. 5, p. 918-970, 2015.
- NIELSEN, R. I.; OXENBOLL, K. Enzymes from fungi: their technology and uses. **Mycologist**, London, v. 12, n. 2, p. 69-71, 1998.
- O'HAGAN, D. **The polyketide metabolites**. New York: Ellis Horwood, 1991. 176 p.
- OLESZEK, W. A. Saponins. In: NAIDU, A. S. (Ed.). **Natural food antimicrobial systems**. Florida: CRC Press, 2000. p. 295-325.
- OLESZEK, W.; HAMED, A. Saponin-based surfactants. In: KJELLIN, M.; JOHANSSON, I. (Ed.). **Surfactants from renewable resources**. West Sussex: Wiley Series in Renewable Resources, 2010. p. 239- 252.
- OLIVEIRA, A. C., et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- PATIL, M. P.; PATIL, R. H.; MAHESHWARI V. L. Biological activities and identification of bioactive metabolite from Endophytic *Aspergillus flavus* L7 isolated from *Aegle marmelos*. **Current Microbiology**, United States, v. 71, p. 39-48, 2015.
- PAUL, N. C. et al. Endophytic Fungi from *Lycium chinense* Mill and Characterization of Two New Korean Records of *Colletotrichum*. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 15, n. 9, p. 15272-15286, 2014.
- PELZER, E. L. et al. Acute and chronic Anti-inflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco**, France, v. 53, p. 421-424, 1998.
- PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochemistry and Biophysics**, United States, v. 53, n. 2, p. 75-100, 2009.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews, J. H.; Hirano, S. S. (Ed.) **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag, 1991. p.179-197.
- PETRY, R. D. Comparative pharmacological study of hydroethanol extracts of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* leaves. **Phytotherapy Research**, United Kingdom, v. 15, p. 162-164, 2001.

- PETRY, R. D.; ORTEGA, G. G.; SILVA, W. B. Flavonoid content assay: influence of the reagent concentration and reaction time on the spectrophotometric behavior of the aluminium chloride-flavonoid complex. **Pharmazie**, Germany, v. 56, n. 6, p. 465-470, 2001.
- PETRY, R. D. et al. Doseamento do teor de flavonoides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Cryander (maracujá). **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 7-10, 1998.
- PETTERSSON, G. An orsellinic acid decarboxylase isolated from *Gliocladium roseum*. **Acta Chemica Scandinavica**, Denmark, v. 19, p. 2013-2021, 1965.
- PHARMACOPÉE Française. 10 ed. Paris: Ministère de la Santé, 2007.
- PIETTA, G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, United States, v. 63, 1035-1042, 2000.
- PIMENTEL, I. C.; FIGURA, G.; AUER, C. G. Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. **Summa phytopathology**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 85-88, 2010.
- PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 40, n.1, p.1-11, 2007.
- POETHKE, W.; SCHWARZ, C.; GERLACH, H. Contents of *Passiflora bryonioides*. 1. Alkaloids. **Planta Medica**, Germany, v. 18, p. 303-309, 1970.
- POPOVA, M. et al. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochemical Analysis**, London, v.15, p. 235-240, 2004.
- POZZI, A. C. S. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonoides do “maracujá” (*Passiflora alata* e *Passiflora edulis*)**. 2007. 73 f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.
- PROESTOS, C.; SERELI, D.; KOMAITIS, M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. **Food Chemistry**, Netherlands, v. 95, p. 44-52, 2006.
- PROMPUTTHA, I. et al. Ribosomal DNA fingerprinting in the identification of non sporulating endophytes from *Magnolia liliifera* (*Magnoliaceae*). **Fungal Diversity**, Netherlands, v. 20, n. 1, p.167-186, 2005.
- PUSZTAHELYI, T.; HOLD, I. J.; PÓSCI, I. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 573-591, 2015.
- PUUPPONEN-PIMIA, R. et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, London, v. 90, p. 494-507, 2001.
- QIU, M. et al. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. **Annals of Microbiology**, Germany, v. 60, p. 143-150, 2010.

- RAFFAELLI, A. et al. Mass spectrometric characterization of flavonoids in extracts from *Passiflora incarnata*. **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v. 777, p. 223-231, 1997.
- RAMAIYA, S. D.; BUJANG, J. S.; ZAKARIA, M. H. Assessment of Total Phenolic, Antioxidant, and Antibacterial Activities of *Passiflora* Species. **The Scientific World Journal**, United States, v. 2014, p. 1-10, 2014.
- REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, United States, v. 289, p. 1920-1921, 2000.
- REGINATTO, F. H.; GOSMANN, G.; SCHRIPEMA, J.; SCHENKEL, E. P. HPLC/UV Assay of quadranguloside, the major saponin from *Passiflora alata* leaves. **Phytochemical Analysis**, United Kingdom, v. 15, p. 195-197, 2004.
- REHMAN, S. et al. Comparative studies and identification of camptothecin produced by an endophyte at shake flask and bioreactor. **Natural Product Research**, Switzarland, v. 23, p. 1050-1057, 2009.
- REHWALD, A.; STICHER, O.; MEIER, B. Trace analysis of harman alkaloids in *Passiflora incarnata* by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, London, v. 6, p. 96-100, 1995.
- REIMBERG, M. C. H. **Estudo de algumas variáveis que interferem na concentração de flavonoides do cultivo de folhas de *Passiflora incarnata* L.** 78 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.
- RIBÉREAU-GAYON, P. **Les composés phénoliques des végétaux.** Paris: Dunod , 1968. 254 p.
- RIOS, M. F. et al. Synthesis and free radical scavenging activity of a novel metabolite from the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, London, v. 6, p. 5836-5839, 2006.
- SADANANDA, T. S. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of anticancer agent (lapachol). **Journal of Medicinal Plants Research**, Nigeria, v. 5, p. 3643–3652, 2011.
- SALO, O. et al. Identification of a polyketide synthase involved in sorbicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. **Applied and Environmental Microbiology**, United States, v. 82, p. 3971-3978, 2016.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. J.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual.** 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SAMMAN, S.; LYONS WALL, P. M.; COOK, N. C. Flavonoids and coronary heart disease: Dietary perspectives. In: EVANS, C. A. R.; PACKER, L. (Ed.). **Flavonoids in health and disease.** New York: Marcel Dekker, 1998. p. 469-482.

SAMPATH, M. et al. Anxiolytic effects of fractions obtained from *Passiflora incarnata* L. in the elevated plus maze in mice. **Phytotherapy Research**, United Kingdom, v. 25, p. 789-795, 2011.

SANCHEZ, J. F. et al. Molecular genetic analysis of the orsellinic acid/F9775 gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **Molecular BioSystems**, United States, v. 6, p. 587-593, 2010.

SAXENA, S.; MESHRAM, V.; KAPOOR, N. *Muscodor tigerii* sp. nov. - Volatile antibiotic producing endophytic fungus from the Northeastern Himalayas. **Annals of Microbiology**, Germany, v. 67, p. 47-57, 2015.

SCHILCHER, H. Zur kenntnis der flavon C-glykoside in *Passiflora incarnata* L. **Zeitschrift fur Naturforsch**, Germany, v. 23, p. 1393-1411, 1968.

SCHOTSMANS, W. C.; FISCHER, G. Passion fruit (*Passiflora edulis* Sims.). **Food Science, Technology and Nutrition**, India, v. 125, p. 142-143, 2011.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, United Kingdom, p. 661-686, 2005.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.32, n.1, p.67-103, 1992.

SHANKAR, B. et al. Biodiversity of endophytic fungi from seven herbaceous medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, southern India. **Journal of Forestry Research**, China, v. 25, n. 3, p. 707-711, 2014.

SIDDIQUEE, S.; CHEONG, B. E.; TASLIMA, K.; KAUSAR, H. MAINUL HASAN, M. Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. **Journal of Chromatographic Science**, United Kingdom, v. 50, p. 358-367, 2012.

SIES, H. **Oxidative Stress**. London: Academic Press, 1985, 507 p.

SINGH, M. P. et al. Biological activity of guanacastepene, a novel diterpenoid antibiotic produced by an unidentified fungus CR115. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 53, p. 256-261, 2000.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p. 144-149, 1965.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin - Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, United States, v. 299, p. 152-178, 1999.

SLATER, F. T. Free radical mechanism in tissue injury. **Biochemical Journal**, United Kingdom, v. 222, p. 1-15, 1984.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SONG, T. Y.; YEN, G. C. Antioxidant properties of *Antrodia camphorata* in submerged culture. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, United States, v. 50, p. 3322-3327, 2002.

SONG, Y. C. et al. Characterization of graphislactone A as the antioxidant and free radical scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Japan, v. 28, n. 3, p. 506-509, 2005.

SOUSA, F. C. F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 18, p. 642-654, 2008.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI F. S. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, Manaus, v.34, p.185-195, 2004.

SOUZA, J. S. I.; MELETTI, L. M. M. **Maracujá**: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: FEALQ, 1997. 179 p.

SOUZA, K. C. B. et al. The adjuvants aerosil 200 and gelita-sol-P influence on the technological characteristics of spraydried powders from *Passiflora edulis* var. *flavicarpa*. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, United States, v. 26, p. 331-336, 2000.

SOZO, J. S. **Perfis de metabólitos secundários e atividade antioxidante de frutos, sementes e calos cultivados in vitro de *Passiflora setacea* e *Passiflora tenuifila* (Passifloraceae)**. 2014. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

SPENCER, K. C.; SEIGLER, D. S. Passibiflorin, epipassibiflorin and passitriasciatin: cyclopentenoid cyanogenic glycosides from *Passiflora*. **Phytochemistry**, United Kingdom, v. 24, p. 981-986, 1985.

SPERONI, E.; MINGHETTI, A. Neuropharmacological activity of extracts from *Passiflora incarnata*. **Planta Medica**, Germany, v. 54, p. 488-491, 1988.

STANIEK, A.; WOERDENBAG, H. J.; KAYSER, O. Endophytes: exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. **Journal of Plant Interactions**, United Kingdom, v. 3, n. 2, p. 75-93, 2008.

STAUNTON, J.; WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. **Natural Product Reports**, United Kingdom, p. 380-416, 2001.

STICHER, O. 'Plant mono-, di- and sesquiterpenoids with pharmacological or therapeutic activity'. In: WAGNER, H.; WOLFF, P. (Ed.). **New Natural Products with Pharmacological, Biological or Therapeutic Activity**. Berlin: Springer-Verlag, 1977. p. 17-23.

- STIERLE, A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific Yew. **Science**, United States, v. 260, p. 214-216, 1993.
- STROBEL, G. et al. Isopestacin, a unique isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora* possessing antifungal and antioxidant properties. **Phytochemistry**, United Kingdom, v. 60, n. 2, p. 179-183, 2002.
- STROBEL, G. A.; DAISY, Y. B. Bioprospecting for microbial Endophytes and their Natural Products. **American Society of Microbiology News**, United States, v. 67, p. 491-502, 2003.
- SUGIHARTO, S.; TURRINI Y.; ISROL, I. Assay of Antioxidant Potential of Two Filamentous Fungi Isolated from the Indonesian Fermented Dried Cassava. **Antioxidant**, Switzerland, v. 2, n. 5, p. 1-6, 2016.
- SULAIMAN, C. T.; BALACHANDRAN, I. Total phenolics and total flavonoids in selected Indian medicinal plants. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, India, v. 74, n. 3, p. 258-260, 2012.
- TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: A rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, United Kingdom, v. 18, p. 448-459, 2001.
- TANKANOW, R. et al. Interaction Study between digoxin and a preparation of hawthorn (*Crataegus oxyacantha*). **European Journal of Clinical Pharmacology**, Germany, v. 43, p. 637-642, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed. 2013.
- TAYUNG, K.; SARKAR, M.; BARUAH, P. Endophytic fungi occurring in *Ipomoea carnea* tissues and their antimicrobial potentials. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 55, n. 5, p. 653-660, 2012.
- TEIXEIRA, T. et al. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. **BioMed Research International**, United States, p. 1-11, 2013.
- U'REN, J. M. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungal communities at a continental scale. **American Journal of Botany**, United States, v. 99, p. 898-91, 2012.
- ULMER, T.; MACDOUGAL, J. M. 2004. **Passiflora**: Passionflowers of the world. Portland: Timber Press, 2004.
- VAZ, A. B.M. et al. Fungal endophyte β -diversity associated with Myrtaceae species in an Andean Patagonian forest (Argentina) and an Atlantic forest (Brazil). **Fungal ecology**, United Kingdom, v. 8, p. 28-36, 2014.
- VLOT, A C.; DEMPSEY, D. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual review of phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 177-206, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

WANG, H.; WANG, Y.; WANG, W.; FU, P.; LIU, P.; ZHU, W. Anti-influenza Virus polyketides from the Acid-Tolerant Fungus *Penicillium purpurogenum* JS03-21. **Journal of Natural Products**, United States, v. 74, p. 2014-2018, 2011.

WANG, Y.; GUO, L. D.; HYDE, K.D. Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in northeast China based on rDNA sequences. **Fungal Diversity**, Netherlands, v. 20, p. 235-260, 2005.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species**. 2 ed. Florida: CRC Press, 2002. 486p.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.

WEETE, J. D.; LASETER, J. L. Distribution of sterols in the fungi. I. Fungal spores. **Lipids**, Germany, v. 9, p. 575-581, 1974.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (Ed.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WORTHINGTON Enzyme Manual. Lakewood: Worthington Biochemical Corporation, 2009.

WOSCH, L.; SANTOS, K. C.; IMIG, D. C.; SANTOS, C. A. M.. Comparative study of *Passiflora* taxa leaves: II. A chromatographic profile. **Revista Brasileira Farmacognosia, de Curitiba**, v.27, n.1, p. 40-49, 2017.

WU, Z. et al. Antioxidative phenolic compounds from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. **Tetrahedron**, London, v. 72, p. 50-57, 2016.

WU, H.; YANG, H.; YOU, X. Isolation and Characterization of Saponin-Producing Fungal Endophytes from *Aralia elata* in Northeast China. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 13, p. 16255-16266, 2012.

WU, S.; ZHAO, L.; CHEN, Y.; HUANG, R.; MIAO, C.; WANG, J. Sesquiterpenoids from the Endophytic Fungus *Trichoderma* sp. PR-35 of *Paeonia delavayi*. **Chemistry and Biodiversity**, Germany, v. 8, p. 1717-1723, 2011.

XU, G. B.; WANG, N. N.; BAO, J. K.; YANG, T.; LI, G. Y. New orsellinic acid esters from fungus *Chaetomium globosporum*. **Helvetica Chimica Acta**, Switzerland, v. 97, p. 151-159, 2014.

YADAV, M.; YADAV, A.; YADAV, J. P. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, London, v. 7, p. 256–261, 2014.

ZANOLI, P. R.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. Behavioral characterisation of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia**, Italy, v. 71, p. S117-S123, 2000.

ZERAIK, M. L. et al. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.20, n.3, p.459-471, 2010.

ZHANG M. et al. Progress on studies of endangered ethno-medicine of Rhizoma Paris. **Journal of Minzu University of China (Natural Sciences Edition)**, China, v. 20, p. 65-69, 2011.

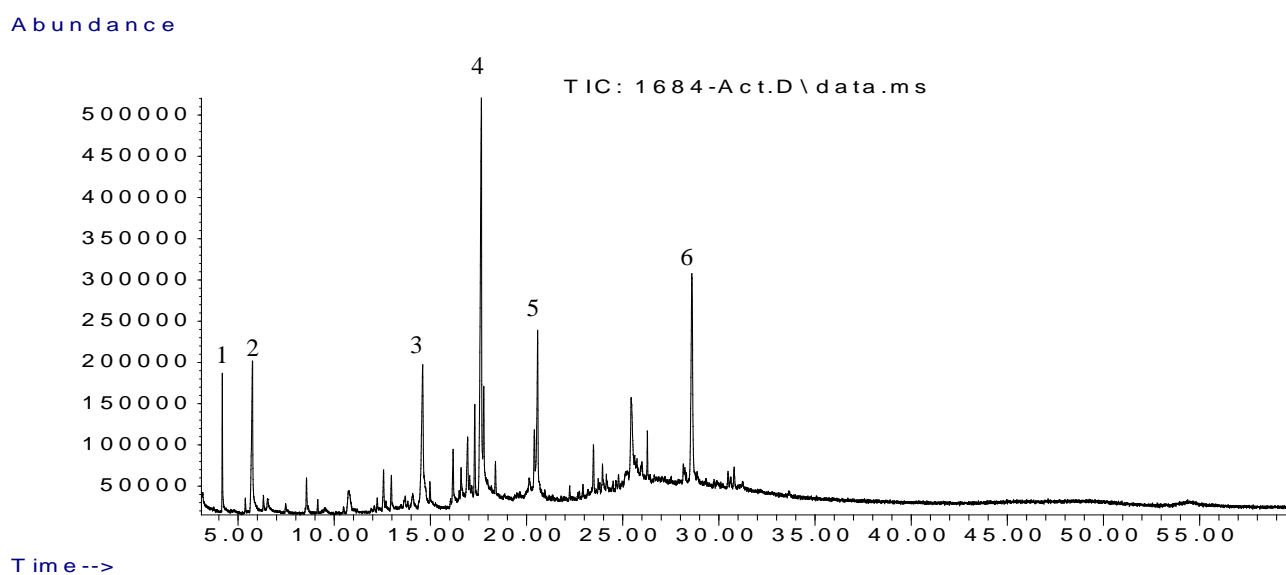
ZHAO, J. T. et al. *In vitro* antioxidant activities and antioxidant enzyme activities in HepG2 cells and main active compounds of endophytic fungus from pigeon pea [*Cajanus canga* (L.) Millsp.]. **Food Research International**, United Kingdom, v. 56, p. 243 – 251, 2014.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. Universidade UFSC, 2010. p.577-611.

APÊNDICE A

Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) e seus compostos/tempo de retenção.

Figura A1 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) da fração AcOEt do fungo endofítico *Trichoderma* sp./LMA 1684.



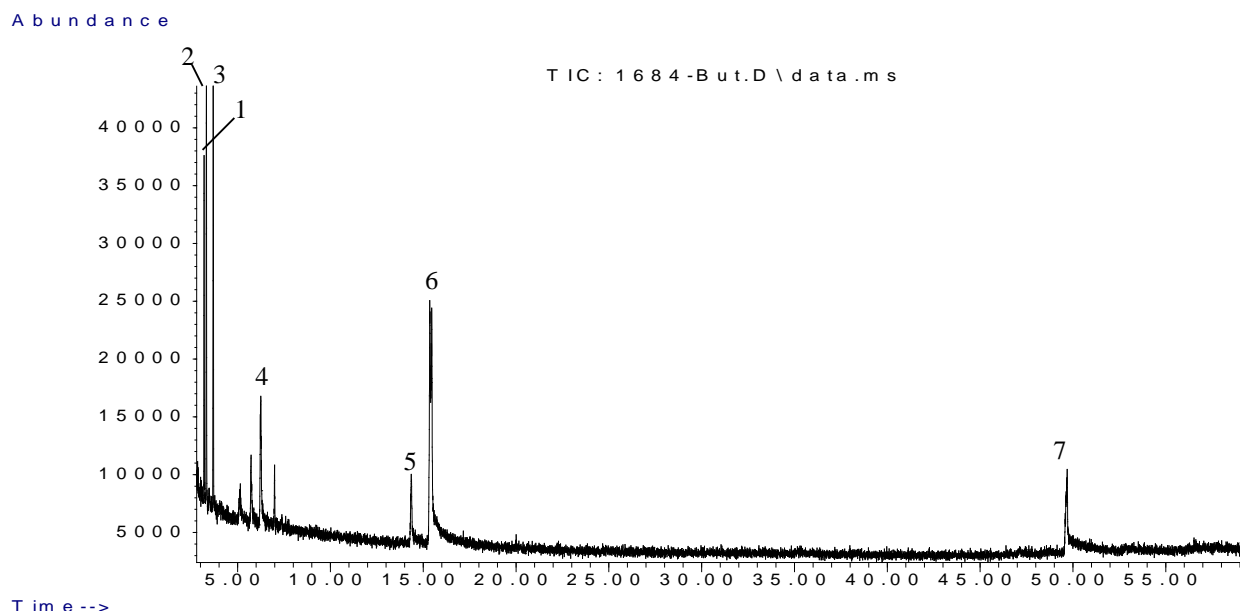
Fonte: arquivos pessoais (2017).

Tabela A1—Constituintes da fração AcOEt do fungo endofítico *Trichoderma* sp./LMA 1684.

Pico	Constituinte	T.R	Área (%)
1	1,4-metoximetilfenol	4,181	4,79
2	N.I.	5,746	12,39
3	N.I.	14,602	16,07
4	Sorbicillina	17,308	33,59
5	N.I.	20,576	10,04
6	Ergosterol	28,592	23,08

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Figura A2 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) da fração BuOH do fungo endofítico *Trichoderma* sp./LMA 1684.



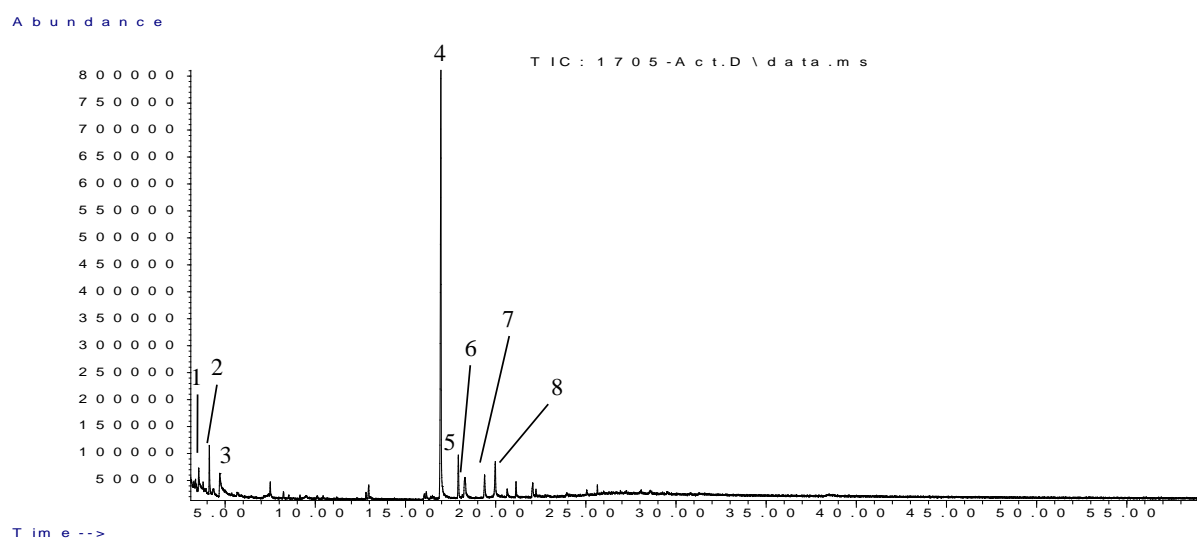
Fonte: arquivos pessoais (2017).

Tabela A2—Constituintes da fração BuOH do fungo endofítico *Trichoderma* sp./LMA 1684.

Pico	Constituinte	T.R	Área (%)
1	N.I.	2,331	20,23
2	N.I.	2,983	22,14
3	N.I.	3,456	20,41
4	N.I.	6,324	8,53
5	N.I.	14,345	4,53
6	N.I.	15,865	17,35
7	N.I.	49,343	6,81

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Figura A3 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) da fração AcOEt do fungo endofítico *Aspergillus versicolor*/LMA 1705.



Fonte: arquivos pessoais (2017).

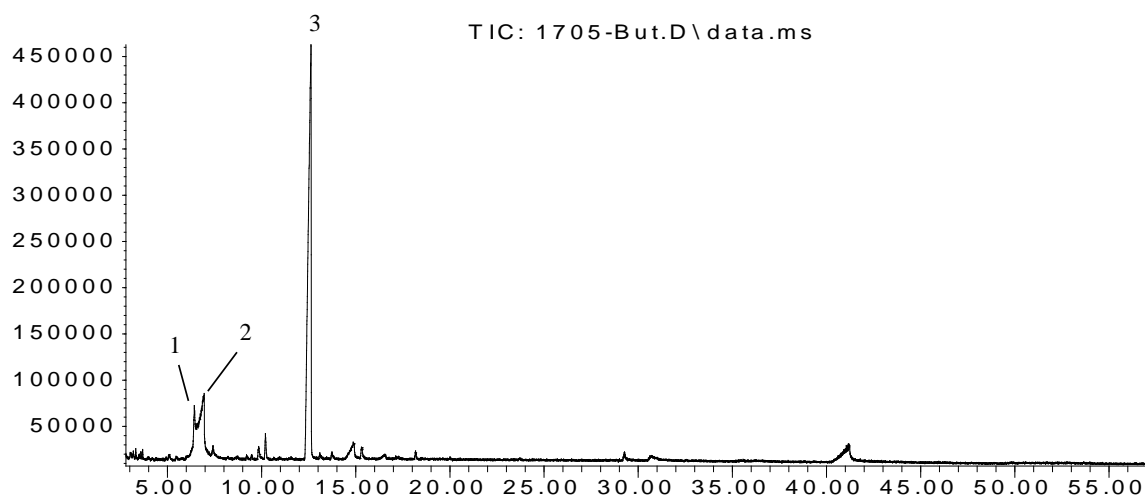
Tabela A3—Constituintes da fração AcOEt do fungo endofítico *Aspergillus versicolor*/LMA 1705.

Pico	Constituinte	T.R	Área (%)
1	orcinol	3,539	3,19
2	N.I.	4,124	5,49
3	N.I.	4,709	3,77
4	N.I.	16,962	66,65
5	N.I.	17,936	5,74
6	N.I.	18,298	5,26
7	N.I.	19,386	4,37
8	N.I.	19,978	5,50

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Figura A4 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) da fração BuOH do fungo endofítico *Aspergillus versicolor*/LMA 1705.

Abundance



Time-->

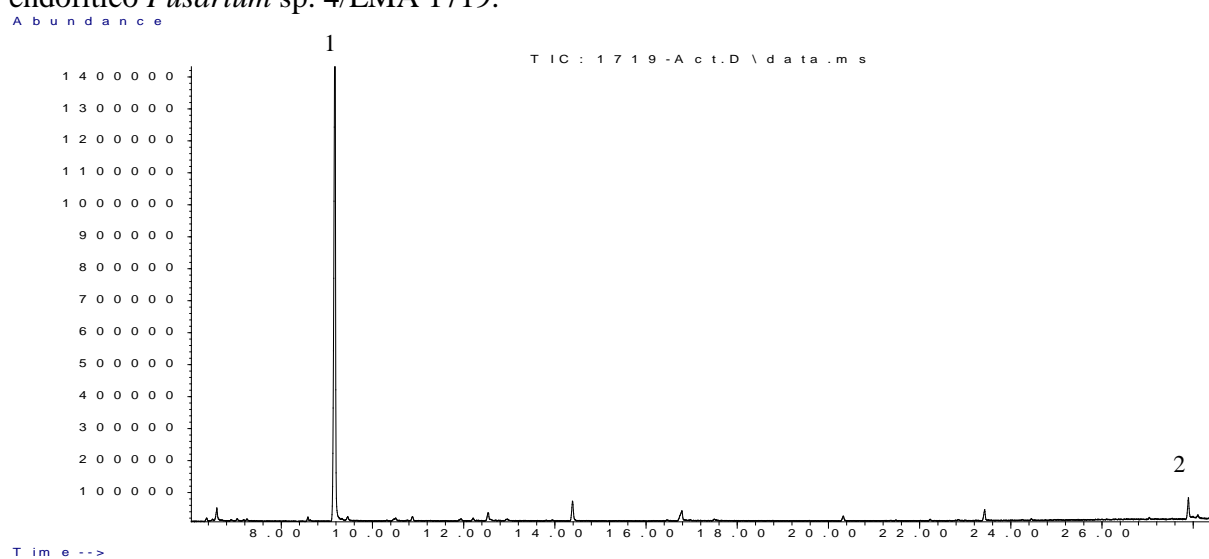
Fonte: arquivos pessoais (2017).

Tabela A4 –Constituintes da fração BuOH do fungo endofítico *Aspergillus versicolor*/LMA 1705.

Pico	Constituinte	T.R	Área (%)
1	N.I.	6,43	17,48
2	N.I.	6,94	20,12
3	N.I.	12,61	62,41

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Figura A5 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) da fração AcOEt do fungo endofítico *Fusarium* sp. 4/LMA 1719.



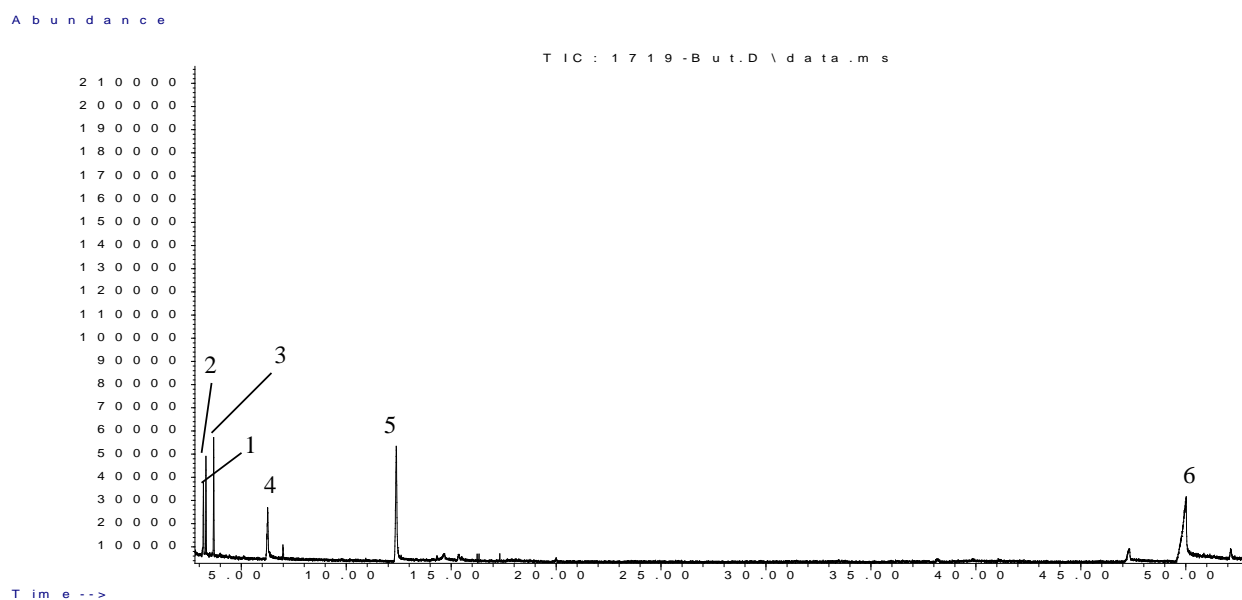
Fonte: arquivos pessoais (2017).

Tabela A5—Constituintes da fração AcOEt do fungo endofítico *Fusarium* sp. 4/LMA 1719.

Pico	Constituinte	T.R	Área (%)
1	isopropenil-1,4-dimetil-1,2,3,3a,4,5,6,7-octahidroazuleno	9,18	96,36
2	N.I.	27,89	3,63

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Figura A6 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) da fração BuOH do fungo endofítico *Fusarium* sp. 4/LMA 1719.



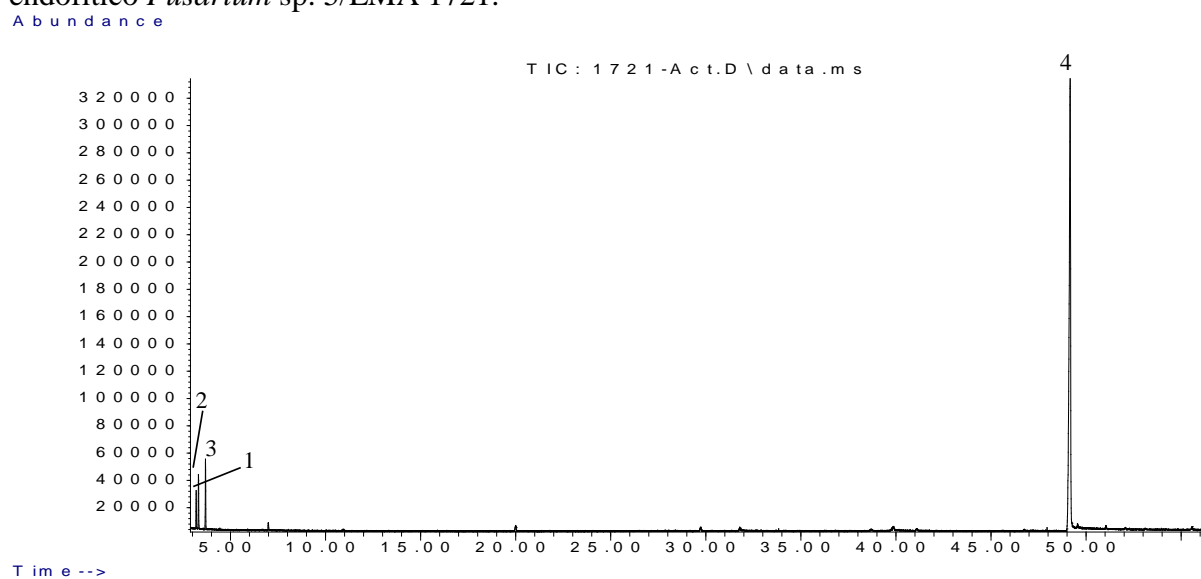
Fonte: arquivos pessoais (2017).

Tabela A6—Constituintes da fração BuOH do fungo endofítico *Fusarium* sp. 4/LMA 1719.

Pico	Constituinte	T.R	Área (%)
1	N.I.	3,20	12,19
2	N.I.	3,32	13,77
3	N.I.	3,68	16,49
4	N.I.	6,45	11,34
5	N.I.	12,38	17,74
6	N.I.	50,01	28,98

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Figura A7 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) da fração AcOEt do fungo endofítico *Fusarium* sp. 5/LMA 1721.



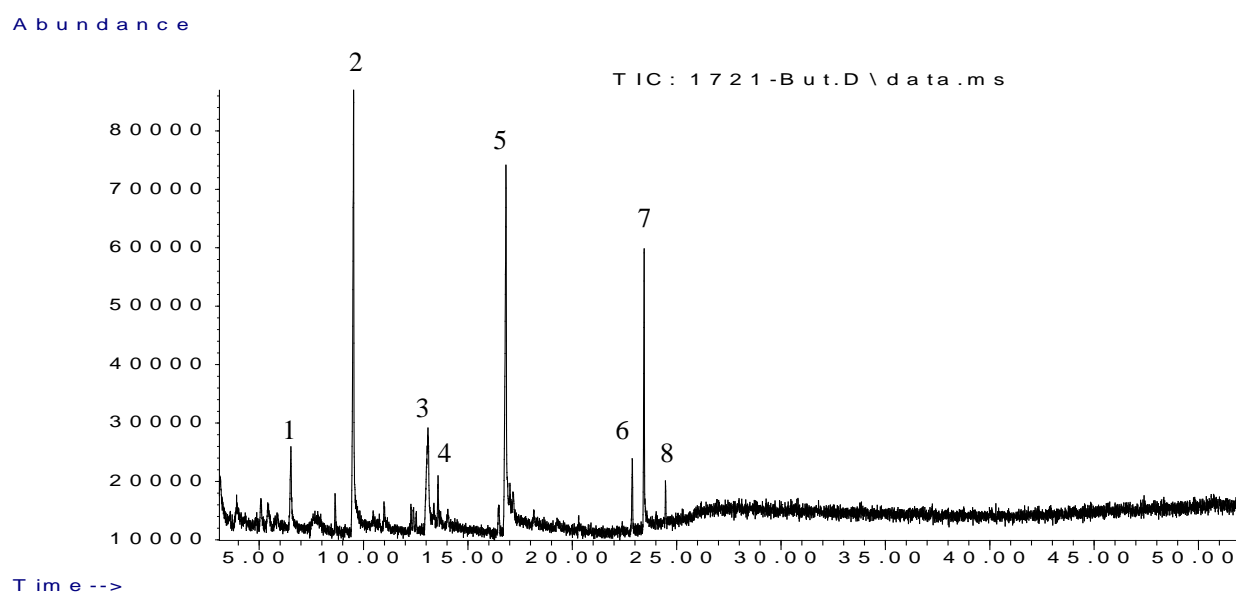
Fonte: arquivos pessoais (2017).

Tabela A7—Constituintes da fração AcOEt do fungo endofítico *Fusarium* sp. 5/LMA 1721.

Pico	Constituinte	T.R	Área (%)
1	N.I.	3,20	2,17
2	N.I.	3,32	3,19
3	N.I.	3,68	4,35
4	N.I.	49,16	90,27

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Figura A8 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) da fração BuOH do fungo endofítico *Fusarium* sp. 5/LMA 1721.



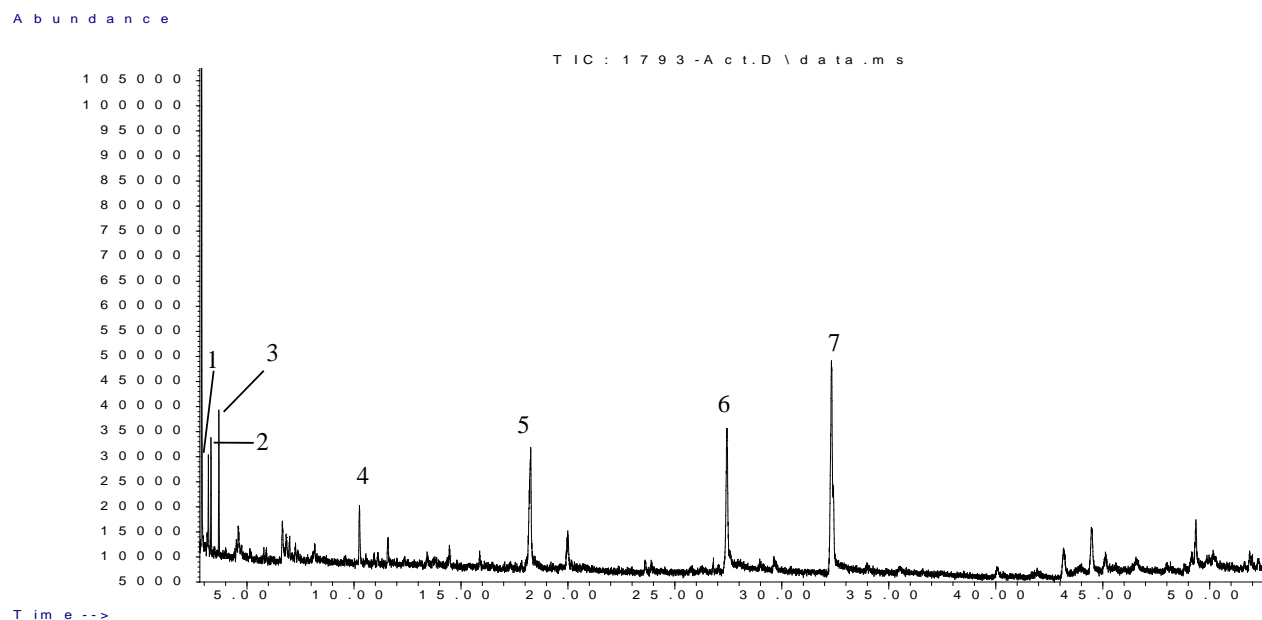
Fonte: arquivos pessoais (2017).

Tabela A8—Constituintes da fração BuOH do fungo endofítico *Fusarium* sp. 5/LMA 1721.

Pico	Constituinte	T.R	Área (%)
1	N.I.	6,522	5,483
2	N.I.	9,525	27,790
3	N.I.	13,082	16,054
4	N.I.	13,571	2,434
5	N.I.	16,829	28,232
6	N.I.	22,879	3,727
7	N.I.	23,445	14,046
8	N.I.	24,470	2,234

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Figura A9 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) da fração AcOEt do fungo endofítico *Chaetomium* sp./LMA 1793



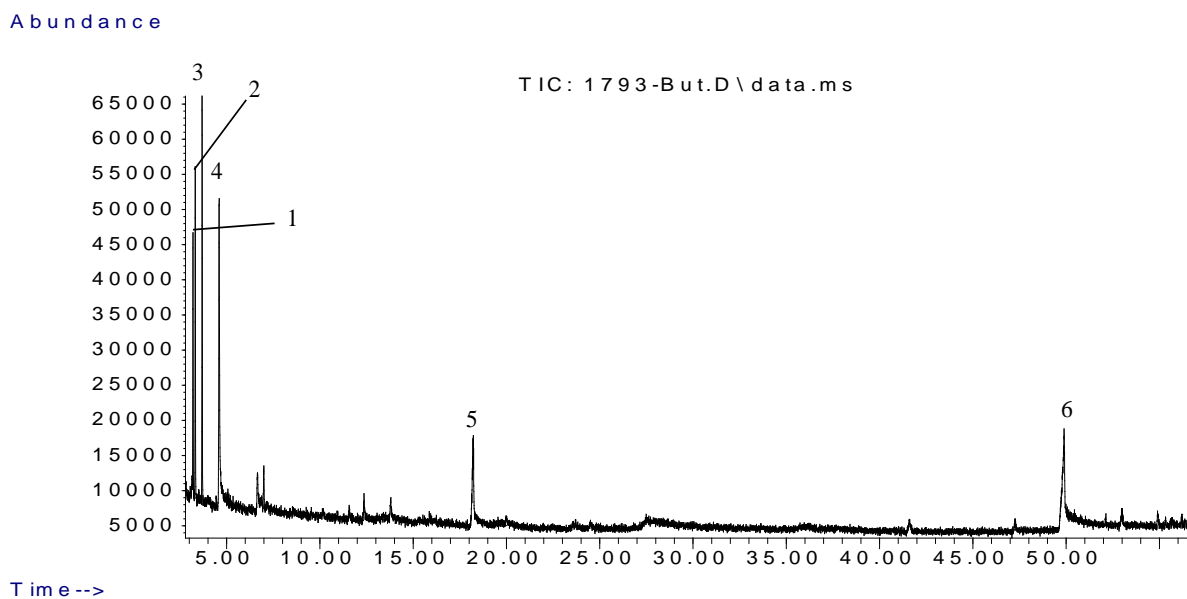
Fonte: arquivos pessoais (2017).

Tabela A9 – Constituintes da fração AcOEt do fungo endofítico *Chaetomium* sp./LMA 1793.

Pico	Constituinte	T.R	Área (%)
1	N.I.	2,88	14,14
2	N.I.	3,20	8,32
3	N.I.	2,68	12,03
4	N.I.	10,28	3,31
5	N.I.	18,26	16,66
6	N.I.	27,43	21,32
7	N.I.	32,31	27,22

Fonte: elaborado pelo autor (2017).

Figura A10 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG) da fração BuOH do fungo endofítico *Chaetomium* sp./LMA 1793.



Fonte: arquivos pessoais (2017).

Tabela A10 – Constituintes da fração BuOH do fungo endofítico *Chaetomium* sp./LMA 1793.

Pico	Constituinte	T.R	Área (%)
1	N.I.	3,20	11,69
2	N.I.	3,32	17,61
3	N.I.	3,68	19,84
4	N.I.	4,60	27,21
5	N.I.	18,26	9,53
6	N.I.	49,78	16,12

Fonte: elaborado pelo autor (2017).