

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA – EST**  
**CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**THAYSA MENDES DA SILVA**

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO  
ENDOFÍTICO *Botryosphaeria mamane* ISOLADO DO CRAJIRU  
(*Arrabidaea chica*) PARA AUMENTO DO RENDIMENTO DO  
EXTRATO FÚNGICO ENRIQUECIDO EM COMPOSTOS  
FENÓLICOS**

MANAUS

2023

**THAYSA MENDES DA SILVA**

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO  
ENDOFÍTICO *Botryosphaeria mamane* ISOLADO DO CRAJIRU  
(*Arrabidaea chica*) PARA AUMENTO DO RENDIMENTO DO  
EXTRATO FÚNGICO ENRIQUECIDO EM COMPOSTOS  
FENÓLICOS**

**Monografia apresentada ao Curso de  
Graduação em Engenharia Química da  
Escola Superior de Tecnologia da  
Universidade do Estado do Amazonas,  
para obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia Química.**

**Orientador: Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque**

**Coorientador: Ma. Raiana Silveira Gurgel**

**MANAUS**

**2023**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

M538o Silva, Thaysa Mendes da  
Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico  
*Botryosphaeria mamane* isolado do cajuru (*Arrabidaea  
chica*) para aumento do rendimento do extrato fúngico  
enriquecido em compostos fenólicos / Thaysa Mendes da  
Silva. Manaus : [s.n], 2023.  
80 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Engenharia Química -  
Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.  
Inclui bibliografia  
Orientador: Patrícia Melchionna Albuquerque  
Coorientador: Raiana Silveira Gurgel

1. DCCR. 2. Planejamento Fatorial Fracionado. 3.  
Condições de cultivo. 4. Atividade Biológica. I. Patrícia  
Melchionna Albuquerque (Orient.). II. Raiana Silveira  
Gurgel (Coorient.). III. Universidade do Estado do  
Amazonas. IV. Otimização das condições de cultivo do fungo  
endofítico *Botryosphaeria mamane* isolado do cajuru  
(*Arrabidaea chica*) para aumento do rendimento do extrato  
fúngico enriquecido em compostos fenólicos

THAYSA MENDES DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO  
ENDOFÍTICO *Botryosphaeria mamane* ISOLADO DO CRAJIRU  
(*Arrabidaea chica*) PARA AUMENTO DO RENDIMENTO DO  
EXTRATO FÚNGICO ENRIQUECIDO EM COMPOSTOS  
FENÓLICOS**

**Monografia de Conclusão de Curso para obtenção do título de Engenheiro,  
Habilitação em Engenharia Química – Escola Superior de Tecnologia,  
Universidade do Estado do Amazonas**

**Banca Examinadora:**

*Patricia Melchionna Albuquerque*

Prof. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque – Orientadora

*Erica Simplicio Souza*

Profa. Dra. Érica Simplicio Souza – UEA

*Lucas de Souza Falcão*

Prof. Dr. Lucas de Souza Falcão – IFAM

**Conceito:**

**Manaus, 20 de março de 2023.**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: Kelly Mendes e Francistone Mendes, sou grata por terem me incentivado a arriscar e sonhar alto, e por terem me ensinado desde a infância como o estudo pode transformar vidas. Se estou aqui hoje é graças a vocês.

Ao meu namorado e melhor amigo: Enrique Bruno obrigada por ter me ouvido, me acalmado e me dado forças para continuar nos momentos de estresse e cansaço. Sua paciência, carinho e compreensão foram peças chaves para que eu alcançasse meus objetivos. Obrigada por ser meu companheiro, meu amigo e meu amor.

À minha amiga Ana Beatriz: minha querida amiga e dupla de laboratório nos últimos 5 anos, não imagino como teria sido esse processo sem você. Sua contribuição e amizade foi imprescindível para meu crescimento como estudante e como pessoa. Você me ensinou a tornar a vida mais leve e meu coração se enche de alegria em celebrar essa conquista ao seu lado.

Aos meus amigos: Cayo Henrique, Laís Cristina, Laura Sobral, Guilherme Brasil e Antônio Braga: os momentos de tensão e cansaço foram muitos, mas vocês sempre estiveram ao meu lado, me encorajando e motivando a seguir em frente. As palavras de incentivo, os abraços e as risadas compartilhadas me ajudaram a manter o ânimo e a persistir até o fim. Sou sortuda por ter feito amigos tão únicos como vocês.

À minha coorientadora Ma. Raiana Gurgel: você é exemplo de perseverança e força para mim. Grande maioria dos conhecimentos aplicados nesse trabalho foi você quem compartilhou comigo e por isso serei eternamente grata. Quando penso mulheres que me inspiram na pesquisa e na vida, penso em você.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Melchionna: não há palavras para expressar minha gratidão por todo seu suporte e orientação desde minha época de iniciação científica até a finalização desse TCC. Além de me guiar em aspectos técnicos do trabalho, suas sugestões e críticas construtivas me ajudaram a aprimorar minhas habilidades de pesquisa e escrita para desenvolvimento de um trabalho de qualidade e relevância acadêmica, e isso levarei comigo eternamente.

À banca Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érica Simplício e Prof. Dr. Lucas Souza, obrigada pelo tempo dedicado em ler e avaliar meu trabalho e pelas sugestões e críticas que me ajudarão a aperfeiçoar minha pesquisa. Suas contribuições serão lembradas e valorizadas por mim.

Por fim, à Universidade do Estado do Amazonas, à Escola Superior de Tecnologia, ao Grupo de Pesquisa Química Aplicada à Tecnologia, ao corpo docente do curso de Engenharia Química e todos os funcionários: agradeço por todo o suporte para que esse trabalho fosse executado. Mais do que apenas uma instituição de ensino superior, a EST é uma comunidade de indivíduos que acreditam na inovação e na ciência. Sou grata por ter feito parte disso.

*“Era impossível, é claro. Mas quando é  
que isso impediu um sonhador de  
sonhar?”*

**Laini Taylor, *Strange The Dreamer***

## RESUMO

O rendimento de extratos fúngicos e a produção de metabólitos secundários podem ser significativamente afetados pelas variações no ambiente de cultivo. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de interesse farmacológico, em função de suas atividades biológicas, como antimicrobiana e antioxidante. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar como alguns fatores nutricionais e ambientais influenciam o aumento do rendimento de extrato e a produção de compostos fenólicos pelo fungo endofítico *Botryosphaeria mamane*, isolado da planta *Arrabidaea chica* (crajiuru). Além disso, foram investigadas as atividades antioxidante e antimicrobiana para o extrato fúngico produzido que apresentou a maior concentração de compostos fenólicos. Foi conduzido um Planejamento Fatorial Fracionado  $2^{4-1}$  com quatro variáveis independentes (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, temperatura e pH). O pH foi a única variável que influenciou significativamente a produção de compostos fenólicos. A fonte de carbono e a temperatura foram as variáveis que afetaram significativamente ( $p < 0,05$ ) o rendimento e foram então escolhidas para otimização das condições de cultivo por meio de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com as variáveis nitrogênio e pH fixadas em 3,0 g/L e 6,5, respectivamente. A maximização do rendimento de extrato fúngico e o aumento da concentração de compostos fenólicos foram eficientemente compreendidos através da aplicação de métodos estatísticos, modelos polinomiais e análises de superfície de resposta. Foi possível identificar o ponto crítico de cultivo para o rendimento ( $C = 12,119$  g/L e  $T = 33,93$  °C) e observar que a temperatura teve um papel fundamental no aumento da concentração de fenólicos no extrato fúngico. A amostra selecionada para investigação das atividades biológicas apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* com Concentração Inibitória Mínima de 2,5, 5,0 e 2,5 mg/mL, respectivamente, e também demonstrou atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical DPPH com concentração eficiente necessária para sequestro de 50% dos radicais ( $CE_{50}$ ) de 14,94 mg/mL. Com este trabalho, foi possível otimizar as condições de cultivo de um fungo endofítico amazônico e aumentar o rendimento de um extrato rico em compostos fenólicos, que apresenta atividade antimicrobiana e antioxidante.

Palavras-chave: DCCR. Planejamento Fatorial Fracionado. Condições de cultivo. Atividade biológica.

## ABSTRACT

The yield of fungal extracts and the production of secondary metabolites can be significantly affected by variations in the cultivation environment. Phenolic compounds are secondary metabolites of pharmacological interest, due to their biological activities, such as antimicrobial and antioxidant. In this sense, the objective of this study was to evaluate how some nutritional and environmental factors influence the increase in extract yield and the production of phenolic compounds by the endophytic fungus *Botryosphaeria mamane*, isolated from the *Arrabidaea chica* (crajiuru) plant. In addition, antioxidant and antimicrobial activities were investigated for the fungal extract produced that showed the highest concentration of phenolic compounds. A Fractional Factorial Design  $2^{4-1}$  was conducted with four independent variables (carbon source, nitrogen source, temperature, and pH). The pH was the only variable that significantly influenced the production of phenolic compounds. The carbon source and temperature were the variables that significantly affected ( $p < 0.05$ ) the yield and were therefore chosen for optimization of the cultivation conditions through a Central Composite Rotatable Design (CCRD), with variables nitrogen and pH fixed at 3.0 g/L and 6.5, respectively. The maximization of fungal extract yield and the increase in phenolic compound concentration were efficiently understood through the application of statistical methods, polynomial models, and response surface analyses. It was possible to identify the critical cultivation point for yield ( $C = 12,119$  g/L and  $T = 33,93$  °C) and observe that temperature played a fundamental role in increasing the concentration of phenolics in the fungal extract. The selected sample for investigation of biological activities showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* strains with Minimum Inhibitory Concentration of 2,5, 5,0, and 2,5 mg/mL, respectively, and also demonstrated antioxidant activity by the DPPH radical scavenging method with an efficient concentration necessary for scavenging 50% of radicals (EC<sub>50</sub>) of 14,94 mg/mL. With this work, it was possible to optimize the cultivation conditions of an Amazonian endophytic fungus for the increase in yield of an extract rich in phenolic compounds, which shows antimicrobial and antioxidant activity

Keywords: CCRD. Fractional Factorial Design. Cultivation conditions. Biological activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química das antocianidinas carajurina (A) e carajurona (B).....	21
Figura 2 - Representação da estrutura de um flavonoide. ....	22
Figura 3 - Estrutura química dos principais subgrupos dos flavonoides.....	22
Figura 4 - Estrutura química de ácidos fenólicos: (A) Ácido hidroxicinâmico e (B) Ácido hidroxibenzóico. ....	23
Figura 5 - Estrutura química do composto fenólico cumarina. ....	23
Figura 6 - Bioatividades relatadas para compostos fenólicos.....	24
Figura 7 - Demonstração do sequestro do radical livre DPPH (A) por um agente antioxidante (B). ....	25
Figura 8 - Estrutura química de flavonoides com atividade antibacteriana. A = Quercetina; B = Apigenina; C = Luteonina; D = Pinocembrina; E = Naringina e F = Kaempferol..	26
Figura 9 - Estrutura química de flavonoides prenilados com atividade antimicrobiana isolados de <i>Morus</i> .....	27
Figura 10 - Cancro dos ramos de pitaya ( <i>Hylocereus undatus</i> ) causado por <i>Botryosphaeria dothidea</i> . ....	28
Figura 11 - Isocumarinas isoladas do fungo endofítico <i>Botryosphaeria parva</i> . ....	29
Figura 12 - Diagrama de fluxo das etapas desenvolvidas no trabalho. ....	35
Figura 13 - Filtração a vácuo dos metabólitos fúngicos.....	40
Figura 14 - Separação das frações dos metabólitos fúngicos. ....	40
Figura 15 - Evaporação do solvente em capela de exaustão. ....	41
Figura 16 - Diagrama de Pareto obtido no planejamento fatorial para o rendimento de extrato fúngico a partir do cultivo de <i>B. mamane</i> em diferentes condições.....	46
Figura 17 - Superfície de resposta obtida pelo planejamento fatorial para o rendimento em função da dextrose (C) e temperatura de cultivo (T).....	46
Figura 18 - Superfície de resposta obtida pelo planejamento fatorial para o rendimento em função do extrato de levedura (N) e pH.....	48
Figura 19 - Curva de calibração de ácido gálico para quantificação de compostos fenólicos. ....	49
Figura 20 - Diagrama de Pareto obtido pelo planejamento fatorial para produção de compostos fenólicos a partir do cultivo de <i>B. mamane</i> em diferentes condições. ....	51

Figura 21 - Superfície de resposta para produção de fenólicos a partir do planejamento fatorial em função temperatura de cultivo (T) e pH. ....	51
Figura 22 - Superfície de resposta para produção de fenólicos a partir do planejamento fatorial em função temperatura de cultivo (T) e fonte de carbono (C).....	52
Figura 23 - Superfície de resposta para produção de fenólicos a partir do planejamento experimental em função da fonte de carbono (C) e fonte de nitrogênio (N).....	53
Figura 24 - Diagrama de Pareto para o rendimento de extrato fúngico obtido no delineamento (DCCR) a partir do cultivo de <i>B. mamane</i> em diferentes condições para as variáveis selecionadas C e T.....	56
Figura 25 - Superfície de resposta para aumento do rendimento de extrato fúngico a partir da otimização (DCCR) pelo <i>B. mamane</i> em função das variáveis T e C.....	56
Figura 26 - Diagrama de Pareto para quantidade de fenólicos totais obtido no delineamento (DCCR) a partir do cultivo do fungo endofítico <i>B. mamane</i> em diferentes condições para as variáveis selecionadas C e T. ....	59
Figura 27 - Superfície de resposta a partir da otimização (DCCR) para quantidade de fenólicos totais pelo <i>B. mamane</i> em função das variáveis T e C.....	60
Figura 28 - Gráfico de regressão linear do percentual de atividade antioxidante do extrato rico em compostos fenólicos produzido pelo fungo endofítico <i>B. mamane</i> .....	63
Figura 29 - Gráfico de regressão linear do percentual de atividade antioxidante obtido através de diluições sucessivas do padrão quercetina. ....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e seus níveis utilizados para o cultivo do fungo endofítico <i>B. mamane</i> visando o aumento da produção de compostos fenólicos e do rendimento de extrato fúngico.....	37
Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental fatorial fracionado $2^{4-1}$ utilizado para avaliar a produção de compostos fenólicos e o rendimento de extrato fúngico.....	37
Tabela 3 - Níveis de variáveis definidos para a otimização das condições de cultivo do fungo endofítico <i>B. mamane</i> , por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	38
Tabela 4 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) utilizado para o estudo das condições ótimas de cultivo do fungo endofítico <i>B. mamane</i> visando o aumento do rendimento de extrato fúngico e da produção de compostos fenólicos. ....	39
Tabela 5 - Rendimento dos extratos fúngicos obtidos no planejamento fatorial 24-1 a partir do cultivo do fungo endofítico <i>B. mamane</i> em diferentes condições. ....	45
Tabela 6 - Concentração de AGE nos extratos fúngicos obtidos no planejamento fatorial 24-1 a partir do cultivo do fungo endofítico <i>B. mamane</i> em diferentes condições.....	50
Tabela 7 - Rendimento dos extratos fúngicos obtido no estudo rotacional (DCCR) a partir do cultivo de <i>B. mamane</i> em diferentes condições para as variáveis selecionadas.....	55
Tabela 8 - Quantidade de fenólicos totais obtido no estudo DCCR a partir do cultivo de <i>B. mamane</i> em diferentes condições para as variáveis selecionadas C e T.....	58
Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato rico em compostos fenólicos produzido pelo fungo endofítico <i>B. mamane</i> para diferentes bactérias.....	61
Tabela 10 - Resultados de absorvância e porcentagem de sequestro de radicais livres DPPH do extrato rico em compostos fenólicos, obtido após otimização das condições de cultivo do fungo endofítico <i>B. mamane</i> .....	63
Tabela 11 - Resultados de absorvância e porcentagem de sequestro de radicais livres DPPH para o padrão antioxidante quercetina.....	64

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 - Atividade biológica de metabólitos produzidos por fungos endofíticos. ....	20
Quadro 2 - Agentes de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos. ....	25
Quadro 3 - Etapas de planejamento experimental para otimização de processos. ....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. chica</i>	<i>Arrabidaea chica</i>
Abs	Absorbância
AGE	Ácido gálico equivalente
ANOVA	Análise de variância
<i>B. mamane</i>	<i>Botryosphaeria mamane</i>
<i>B. dothidea</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
<i>B. rhodina</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i>
BDA	Ágar Batata Dextrose
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CE50	Concentração Eficiente para sequestro de 50% dos radicais
CF213	Código do fungo endofítico utilizado no trabalho
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
AG	Ácido Gálico
AGE	Ácido Gálico Equivalente
UEA	Universidade do Estado do Amazonas
sp.	espécie (utilizado para espécies não identificadas)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PFF	Planejamento Fatorial Fracionado
RNA	Ácido Ribonucleico
rpm	Rotação Por Minuto
β	Beta (alfabeto grego)
°C	Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1 COMPOSTOS NATURAIS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO.....	18
2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS COMO FONTE NATURAL DE BIOATIVOS .....	19
2.3 IMPORTÂNCIA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS FENÓLICOS .....	21
2.4 PRINCIPAIS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS....	24
<b>2.4.1 Atividade Antioxidante</b> .....	24
<b>2.4.2 Atividade Antibacteriana</b> .....	25
2.5 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS .	28
<b>2.5.1 Cultivo de Fungos para Produção de Metabólitos Secundários</b> .....	29
<b>2.5.2 Influência das Condições de Cultivo na Produção de Compostos Fenólicos</b> .	31
<b>2.5.3 Planejamento Experimental Fatorial para Otimização de Processos</b> .....	32
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
3.2 MICRORGANISMO.....	35
<b>3.2.1 Reativação do Isolado Fúngico</b> .....	35
3.3 CULTIVO SUBMERSO DO FUNGO .....	36
3.4 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	36
<b>3.4.1 Planejamento Experimental Fatorial Fracionado</b> .....	36
<b>3.4.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)</b> .....	38
3.5 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS E CÁLCULO DO RENDIMENTO.....	39
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS.....	41
<b>3.6.1 Preparo das Soluções</b> .....	41
<b>3.6.2 Obtenção da Curva de Calibração</b> .....	42
<b>3.6.3 Análise dos Extratos</b> .....	42
3.7 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	43
<b>3.7.1 Atividade Antimicrobiana</b> .....	43
<b>3.7.2 Atividade Antioxidante</b> .....	44
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
4.1 SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	45
<b>4.1.1 Seleção das Variáveis Significativas para o Rendimento do Extrato Fúngico</b>	45
<b>4.1.2 Seleção das Variáveis Significativas para Produção de Compostos Fenólicos</b> .....	48

<b>4.2 Otimização das Condições de Cultivo.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.1 Otimização das Condições de Cultivo para Rendimento de Extrato.....</b>	<b>54</b>
<b>4.2.2 Otimização das Condições de Cultivo para Produção de Compostos Fenólicos .....</b>	<b>57</b>
<b>4.3 Avaliação das Atividades Biológicas .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3.2 Avaliação da Atividade Antioxidante .....</b>	<b>62</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>79</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Amazônia é reconhecida por possuir a maior diversidade biológica terrestre do mundo, abrigando uma riqueza inexplorada de plantas, animais e microrganismos com grande potencial farmacológico. Nesse sentido, torna-se crucial realizar pesquisas sobre os produtos naturais originários dessa região, com o objetivo de estudar seus compostos químicos e atividades biológicas (RUFINO, 2022).

Tendo em vista as limitações das plantas na produção de metabólitos secundários para a indústria devido a exploração excessiva, sazonalidade e desmatamento, muitas fontes de metabólitos importantes estão à beira da extinção (CHATTERJEE et al., 2022). As bactérias e os fungos surgem como alternativa sustentável na obtenção de substâncias com potencial para fins medicinais de interesse industrial, devido sua fácil reprodutibilidade, manipulação e produção de compostos com atividades biológicas diversas (AGOUR et al., 2022).

Os fungos endofíticos habitam espécies vegetais sem oferecer risco à planta hospedeira e estão presentes em todos os nichos ecológicos, sendo considerados recursos importantes devido sua capacidade de produção de enzimas, antibióticos, hormônios, entre outros metabólitos secundários (GUNATILAKA, 2006; ZHAO et al., 2022). Devido à possibilidade de produção de substâncias químicas originadas da planta hospedeira, os endofíticos apresentam metabólitos com diversas bioatividades, como antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e anti-inflamatória (ALY et al., 2010; GURGEL et al., 2020) pertencentes à diversas classes químicas, como alcalóides, fenóis, quinonas, xantonas e terpenóides (MORAIS et al., 2014).

Dentre as atividades biológicas dos metabólitos produzidos pelos endófitos, a atividade antimicrobiana se destaca, devido ao aumento preocupante no número de microrganismos resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis. Devido a isso, a utilização de fungos endofíticos como produtores de compostos com potencial antimicrobiano, principalmente da classe dos flavonoides, tem sido empregada como alternativa natural para a descoberta de novos fármacos (SILVA et al., 2020).

A busca por antioxidantes naturais capazes de estabilizar quimicamente radicais livres também recebe grande atenção (LOURENÇO et al., 2019), uma vez que o estresse oxidativo, quando desordenado, pode desencadear doenças como Alzheimer, câncer e Parkinson (PEREIRA e CARDOSO, 2012). Alguns compostos antioxidantes naturais

produzidos abundantemente por fungos endofíticos são os compostos fenólicos, tais como flavonoides e ácidos fenólicos (JORGE, 2013).

Portanto, a produção de compostos fenólicos, flavonoides ou não-flavonoides, é extremamente importante levando em consideração suas atividades biológicas ( ORAK, 2007; HURTADO-FERNÁNDEZ et al., 2010; ALARCÓN-FLORES et al., 2013; LIU, 2013). Dessa maneira, os fungos endofíticos são considerados ótimo recurso para obtenção de metabólitos secundários fenólicos (ESTEVINHO et al., 2022), como demonstram os estudos voltadas para os fungos do gênero *Botryosphaeria*, incluindo as espécies *B. parva* e *B. dothidea* (MONFARDINI, 2016; VALENTE, 2017).

Considerando que um único fungo endofítico pode produzir diversas substâncias com atividade biológica, há a necessidade de descoberta de novos princípios ativos e otimização das condições de cultivo para produção de metabólitos secundários (SPECIAN et al., 2014). A biossíntese de metabólitos de interesse em fungos pode ocorrer através de cultivo em meio sólido ou submerso (TABARAIE, 2020). O cultivo em meio líquido é o mais utilizado pelas vantagens de padronização do processo, homogeneização do sistema e facilidade de crescimento dos microrganismos (SILVA, 2017).

A produção de metabólitos secundários pelos microrganismos é influenciada diretamente pelo meio de cultura, pela espécie do microrganismo e pelos nutrientes disponíveis como fonte de nitrogênio e fonte de carbono (MOREIRA, 2021). As modificações de fatores como pH e temperatura podem auxiliar na produção de substâncias bioativas de interesse (KUMAR, 2015)

Além disso, em diversos casos a obtenção dos metabólitos se dá em baixos rendimentos, não garantindo o escalonamento industrial. Por isso, faz-se uso de técnicas estatísticas de planejamento experimental para otimização das condições do processo e aumento de rendimento dos compostos, além de auxiliar no entendimento do comportamento das variáveis estudadas, aumentando a confiabilidade dos resultados obtidos e permitindo a condução dos ensaios de modo interativo (COSTA, 2016; YUN, 2018).

Neste contexto, esse trabalho teve por objetivo geral otimizar as condições de cultivo do fungo endofítico *Botryosphaeria mamane* para o aumento de rendimento de extratos ricos em compostos fenólicos. Os objetivos específicos foram:

- a) Investigar a influência das condições de cultivo submerso do fungo endofítico *Botryosphaeria mamane* para obtenção de extratos metabólicos ricos em compostos fenólicos e com alto rendimento;

- b) Otimizar as condições de cultivo visando maiores rendimentos dos extratos fúngicos e maior produção de compostos fenólicos;
- c) Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do extrato fúngico com a maior concentração de compostos fenólicos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 COMPOSTOS NATURAIS DE INTERESSE FARMACOLÓGICO

O conceito de farmacologia, ciência que estuda a interatividade de substâncias químicas com sistemas biológicos, foi introduzido por Peigen Xiao em 1980. A partir de então, o estudo da diversidade química e atividades biológicas levantaram grande interesse em compostos isolados de recursos naturais, em particular de plantas medicinais (HAO e XIAO, 2020). Além disso, o uso de recursos naturais para fins medicinais se perpetua desde a antiguidade, uma vez que o homem recorria aos vegetais para produção de infusões e especiarias terapêuticas (PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Em território brasileiro, a investigação científica de plantas para fins medicinais começou no século XVIII através de trabalhos de botânicos que passaram a coletar dados da *Flora Brasiliensis* (BRAGA, 2020). Em 1843, o médico e botânico Carl Von Martius publicou o *Systema Materiae Medicae Vegetabilis Brasiliensis*, descrevendo 470 espécies de vegetais e destacando a diversidade de plantas aplicadas medicinalmente no Brasil. (MELLO, 1980).

O Brasil é considerado o país com a maior biodiversidade vegetal do mundo, possuindo por volta de 46 mil espécies vegetais registradas em diversos ecossistemas. Apesar disso, pouco se conhece ainda sobre as propriedades químicas e farmacológicas das espécies da flora brasileira devido sua vasta extensão de diversidade (FAZOLIN et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015)

Apesar das plantas se destacarem, elas não são os únicos seres que apresentam propriedades de interesse para estudos do ramo da farmácia e medicina. Existem vários microrganismos que já foram e ainda são estudados devido à capacidade de produzir substâncias de interesse farmacológico, se apresentando como uma classe de interesse biotecnológico (OLIVEIRA et al., 2015).

Sabendo isso, os microrganismos se tornaram singulares por serem uma matriz de fácil reprodutibilidade e renovação quando comparados aos vegetais, uma vez que a grande maioria dos fármacos empregados na indústria tem origem microbiana, por sua capacidade de produção de compostos bioativos únicos de alto valor comercial (AGOUR et al., 2022). Dentre os fármacos advindos de microrganismos se destacam penicilinas, carbapeninas, tetraciclinas (SILVA, 2010), fluvastina, paroxetina (SANTOKE e

COOPER, 2017) ciclopamina, triptantrina, veticinona, dentre outros (MORCEAU et al., 2015).

## 2.2 FUNGOS ENDOFÍTICOS COMO FONTE NATURAL DE BIOATIVOS

O termo endofítico foi definido inicialmente por Barry (1866) como organismos que crescem dentro de tecidos vegetais. Posteriormente foram descritos como microrganismos assintomáticos e colonizadores de tecidos e órgãos internos de plantas, sem oferecerem risco nocivo à hospedeira (CARROL, 1986; PETRINI, 1991). O grupo de endofíticos engloba bactérias e fungos, todavia os fungos são isolados com maior frequência tendo em vista que são capazes de produzir bioativos com maior complexidade que as bactérias (ZHANG et al., 2006).

Os fungos são uma grande classe de micróbios de células eucarióticas distribuídos vastamente na natureza, presentes em quase todos os nichos ecológicos, sendo encontrados não apenas em ambientes terrestres como também em aquáticos doce e marinho (SPITELLER, 2015). Além disso, os fungos são considerados uma ótima fonte de alimentos e medicamentos naturais por serem ricos produtores de metabólitos secundários (ZHAO et al., 2022).

As moléculas bioativas em sua maioria são produtos do metabolismo secundário destes microrganismos, ou seja, são pertencentes à classe de metabólitos secundários. Estas moléculas não estão diretamente envolvidas com a manutenção das funções vitais do organismo, mas contribuem diretamente para a adaptação das espécies e sua sobrevivência. Por isso, muitas vezes, são produzidos em situações de estresse ou perigo para o microrganismo (SILVA, 2014; ZHANG et al., 2019).

Os fungos endofíticos podem gerar substâncias químicas originadas da própria planta hospedeira, tendo em vista a capacidade de transporte horizontal de genes durante a evolução do endófito (ALY et al., 2010). A capacidade do microrganismo de fornecer metabólito bioativo igual ao da sua hospedeira contribui para a preservação da biodiversidade pois reduz a extração de plantas incomuns e com risco de extinção (STIERLE et al., 1993).

Muitos endófitos extraídos de plantas apresentam metabólitos com atividade comprovada, conforme exemplifica o Quadro 1.

Quadro 1 - Atividade biológica de metabólitos produzidos por fungos endofíticos.

<b>Planta</b>	<b>Fungo Endofítico</b>	<b>Bioatividade</b>	<b>Referência</b>
<i>Torreya taxifolia</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Antifúngico	LI et al., 2001
<i>Betula pendula</i>	<i>Phomopsis phaseoli</i>	Atividade nematocida contra nematoide-das-galhas	SCHWARZ et al., 2004
<i>Erythrina cristagalli</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	Atividade anti-inflamatória, citotóxica e antibacteriana	WEBER et al., 2004
<i>Myrcia guianensis</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	Atividade antioxidante e citotóxica	GURGEL et al., 2020
<i>Euterpe precatoria</i>	<i>Penicillium</i> sp.	Atividade citotóxica	GURGEL et al., 2020
<i>Abies holophylla</i>	<i>Xylaria</i> sp.	Antibiótico e antifúngico	PARK et al., 2005
<i>Cynodon dactylon</i>	<i>Rhizoctonia</i> sp.	Atividade antibacteriana	MA et al., 2004
<i>Artemisia annua</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	Antibacteriano e antifúngico	LU et al., 2000
<i>Cassia spectabilis</i>	<i>Phomopsis cassiae</i>	Antitumoral e antifúngico	SILVA et al., 2005

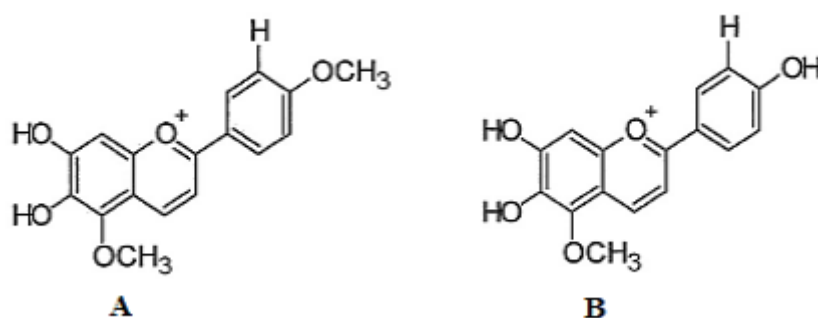
As classes de moléculas produzidas a partir de fungos endofíticos podem conter atividades hormonais, antitumorais, antibióticas (PEIXOTO et al., 2002), antifúngicas, citotóxicas (SILVA, 2010), antivirais, imunossupressoras, antiparasitárias, dentre outras (DEMAIN e SANCHEZ, 2009). Estas substâncias bioativas incluem principalmente as classes químicas dos esteroides, alcalóides, fenóis, quinonas, xantonas e terpenóides (MORAIS et al., 2014).

### 2.3 IMPORTÂNCIA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos têm como atributo, em sua estrutura, um ou mais anéis aromáticos com grupamentos hidroxilas como substituintes (CUNHA et al., 2016). Esse grupo diverso é caracterizado em: flavonoides (que contém os polifenóis) e não-flavonoides (caracterizado por fenóis simples ou ácidos fenólicos) (SILVA et al., 2010). Os flavonoides podem ser divididos em 14 subclasses, encontrando-se compostos como as antocianidinas, catequinas, flavonóis, flavonas e isoflavonas que apresentam bioatividade e são de grande importância para a saúde humana (CHAVES NETO et al., 2018).

Dentre os flavonoides, as antocianidinas se destacam por serem pigmentos naturais e por apresentarem atividade antioxidante (PEREIRA e CARDOSO, 2012). Importante salientar o estudo de Chapman e colaboradores (1927), quando isolaram os pigmentos da classe das antocianidinas, carajurina (6,7-diidroxiflavílio) e carajurona (6,7,4'-triidroxi-5-metoxiflavílio) (Figura 1), responsáveis pela coloração avermelhada de extratos da planta *Arrabidaea chica*, hospedeira do fungo endofítico utilizado no presente trabalho.

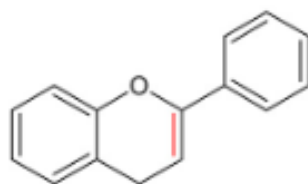
Figura 1 - Estrutura química das antocianidinas carajurina (A) e carajurona (B).



Fonte: PAULA et al., 2013.

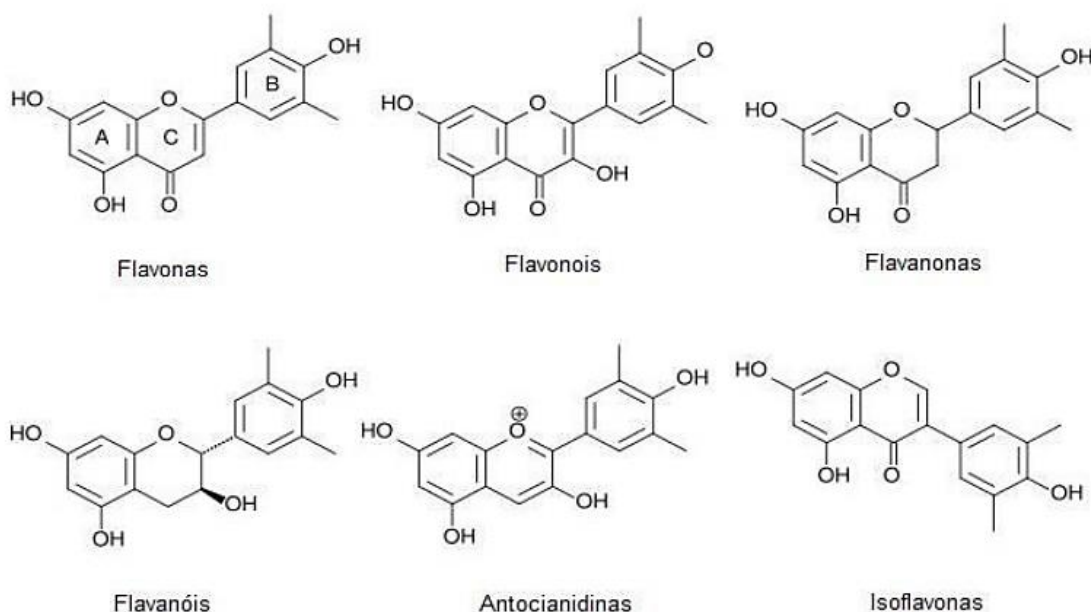
A estrutura química dos flavonoides (Figura 2) se baseia no núcleo flavilium constituído de três anéis fenólicos. As bioatividades dos flavonoides e de seus metabólitos são dependentes da estrutura química, que são capazes de variar com substituições como hidrogenação, metilações, hidroxilações, malonilações, glicosilações e sulfatações (SILVA e BIESK, 2018) conforme se observa na Figura 3.

Figura 2 - Representação da estrutura de um flavonoide.



Fonte: SCHNARR et al., 2022.

Figura 3 - Estrutura química dos principais subgrupos dos flavonoides.



Fonte: SILVA et al., 2018.

Na indústria alimentícia e farmacêutica, derivados polifenólicos distribuídos em frutas, legumes, cereais e bebidas ganharam visibilidade devido suas bioatividades (PAGLIARULO et al., 2016). Além disso, investigações epidemiológicas fornecem evidências significativas entre a ingestão regular de compostos e derivados fenólicos e a redução de câncer, patologias inflamatórias, obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (CORY et al., 2018).

Como consequência disso, os flavonoides possuem relevância econômica devido a suas muitas propriedades, como antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, citotóxico, antioxidante, anti-hipertensivo, anti-inflamatório e hipolipidêmico (CHEN et al., 2018).

Por outro lado, o grupo de não-flavonoides também têm sua importância, uma vez que diversos autores descrevem alto potencial antioxidante para essa classe de fenólicos

(BARBI, 2016). Os não flavonoides englobam derivados de ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico (Figura 4) (SILVA et al., 2010).

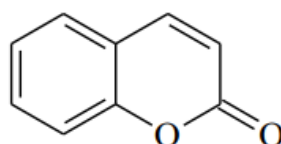
Figura 4 - Estrutura química de ácidos fenólicos: (A) Ácido hidroxicinâmico e (B) Ácido hidroxibenzóico.



Fonte: SILVA et al., 2010.

Um dos metabólitos que também se destacam no grupo de compostos fenólicos são as cumarinas, derivadas da fenilalanina, sendo mais comumente encontradas em sua forma mais simples (1,2-benzopirona) presente na Figura 5 (NERI, 2016). Esse composto pode ser obtido de diversas espécies vegetais, apresentando atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anticoagulante e antioxidante (SKALICKA-WOŹNIAK, 2016).

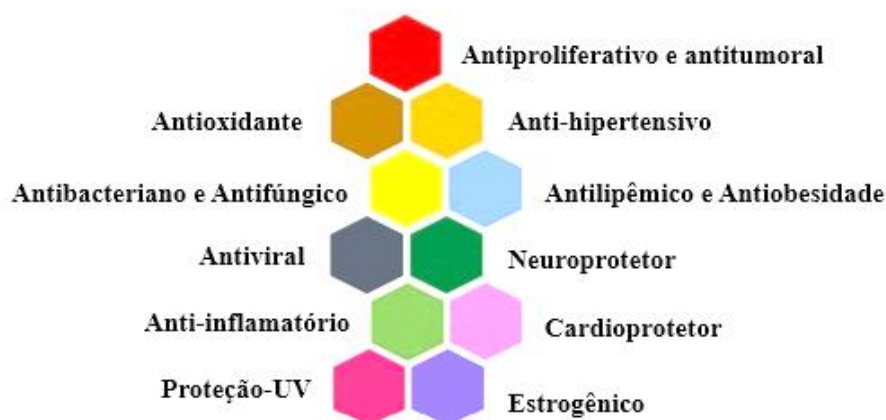
Figura 5 - Estrutura química do composto fenólico cumarina.



Fonte: NERI, 2016.

Assim, compostos fenólicos são agentes bioativos com capacidade de inutilizar estresse abiótico e biótico, eliminam espécies de oxigênio e nitrogênio, quelatos de metais pró-oxidantes e auxiliam na regeneração antioxidante, tornando-se essenciais contra danos nitro oxidativos e doenças degenerativas (FORNI et al., 2019; TULADHAR et al., 2021), possuindo diversas atividades biológicas descritas, conforme se observa na Figura 6.

Figura 6 - Bioatividades relatadas para compostos fenólicos.



Fonte: GIL-MARTIN, 2022.

## 2.4 PRINCIPAIS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE COMPOSTOS FENÓLICOS

### 2.4.1 Atividade Antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas através de reações biológicas que resultam em danos oxidativos às biomoléculas do corpo, desempenhando papel vital na morte celular em resposta ao estresse oxidativo (RAVINDRAN et al., 2012). Nessa situação, a produção de superóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio contribuem para ocorrência de processos degenerativos e patológicos como envelhecimento, câncer, Alzheimer e doenças cardíacas (LAWAL et al., 2015).

Desse modo, o principal papel de compostos antioxidantes é inibir a difusão de reações em cadeia de radicais livres para prevenir a oxidação de moléculas orgânicas (LAWAL et al., 2015), sendo especialmente importantes para preservação de alimentos e para a defesa dos sistemas vivos contra o estresse advindo da oxidação (MASUDA et al., 2003).

Por isso, buscam-se substâncias com alto potencial antioxidante de origem natural que possam diminuir esses efeitos (STEFANELLO, 2013). Os compostos de defesa antioxidante podem ser agrupados em enzimáticos e não enzimáticos. No Quadro 2 se observam exemplos destes compostos.

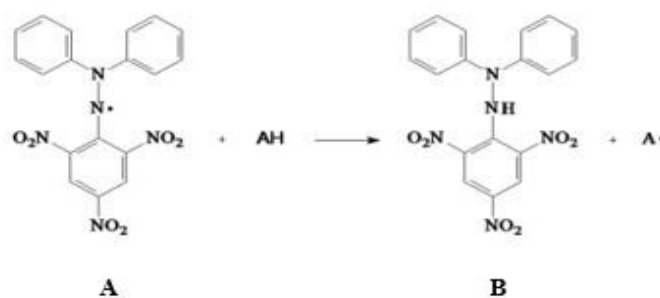
Quadro 2 - Agentes de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos.

Agentes enzimáticos	Agentes não enzimáticos
Catalase	Compostos fenólicos
Tiorredoxina	$\beta$ -caroteno
Glutationa-S-transferase	Vitamina E
Superóxido dismutase	Vitamina C
Glutationa redutase	Ácido úrico
Glutationa peroxidase	Glutationa

Fonte: Adaptado de MAGALHÃES, 2009.

Os grupos hidroxila dos compostos fenólicos são excelentes doadores de hidrogênio, capazes de reagir com substâncias contendo oxigênio e nitrogênio em reações terminais, evitando a origem de novos radicais livres (HEIM et al., 2002). Na Figura 7, observa-se o sequestro de radical livre DPPH por um agente antioxidante, reação aplicada para determinar a atividade antioxidante de compostos fenólicos, fenilpropanóides e flavonóis (ALVES et al., 2010).

Figura 7 - Demonstração do sequestro do radical livre DPPH (A) por um agente antioxidante (B).



Fonte: Adaptado de ALVES et al., 2010.

#### 2.4.2 Atividade Antibacteriana

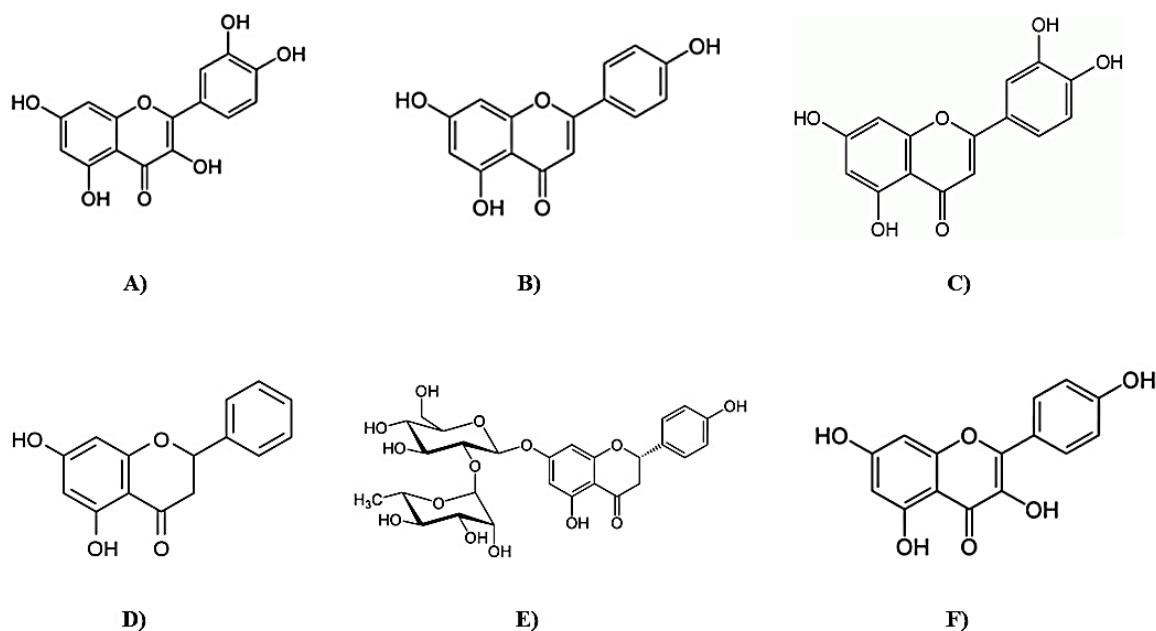
Os antibióticos são um dos artifícios mais importantes no combate às infecções bacterianas e, desde a sua introdução, beneficiaram a saúde e qualidade de vida humana. No entanto, esse benefício está sob ameaça uma vez que pelo uso excessivo muitos

antibióticos se tornaram menos eficazes devido ao surgimento das bactérias resistentes (BHALODIA e SHUKLA, 2011).

O tratamento de protozoários, bactérias, vírus e fungos com os medicamentos existentes têm se tornado árduo devido ao crescente número de casos em que o agente infeccioso é resistente aos agentes microbianos (NEVES, 2015). Por outro lado, a dificuldade em descobrir novos compostos com atividade antibacteriana ressalta o uso dos compostos fenólicos como alternativa eficiente uma vez que apresentam essa atividade (ALVES et al., 2013).

Os flavonoides se destacam por sua capacidade antibiótica, entre eles a quercetina, apigenina, luteonina pinocembrina, naringina e o kaempferol (Figura 8) entre diversas outras isoflavonas, flavonas, flavonóis e chalconas. Além disso, uma das propriedades dos flavonoides é a habilidade de inibir a produção de síntese de ácidos nucleicos, bem como a função da membrana plasmática e do metabolismo energético (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Figura 8 - Estrutura química de flavonoides com atividade antibacteriana. A = Quercetina; B = Apigenina; C = Luteonina; D = Pinocembrina; E = Naringina e F = Kaempferol.



Fonte: Adaptado de CUSHNIE et al., 2005.

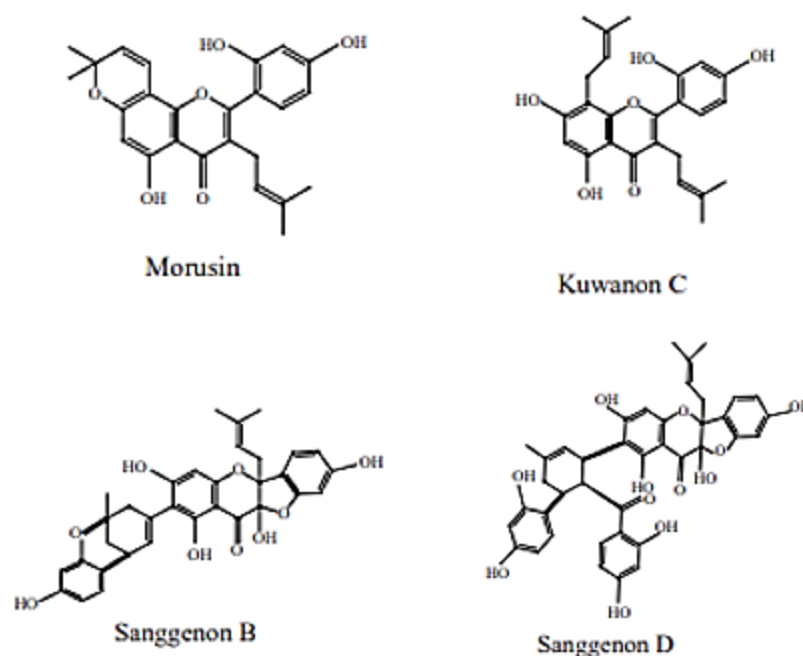
O polifenólico epigallocatequina-3-galato se destaca por sua característica de inibição da síntese de DNA e RNA frente as bactérias *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus*

*aureus*, uma vez que o anel B desse composto atua na interpolação e construção de ligações de hidrogênio empilhados nas bases dos ácidos nucleicos (MORI et al., 1987).

O propólis, por sua vez, apresenta propriedades antimicrobianas atribuídas à presença de flavonona, pinocembrina, flavonol, galangina e ao éster fenetil do ácido cafeico, funcionando como mecanismo de ação baseado na inibição da RNA polimerase bacteriana (TAKAISI-KIKUNI e SCHILCHER, 1994). Outro exemplo de recurso natural antibacteriano são os extratos vegetais de *Sophora flavescense* (YAGI et al., 1989), extrato de casca de caule de *Magnolia obovata* (BANG et al., 2000) e óleo de *Melaleuca alternifolia* (HAYES e MARKOVIC, 2002) cujos flavonoides prenilados são fonte de agentes antimicrobianos (BARRON e IBAHIM, 1996).

A atividade antibacteriana também é amplamente encontrada em diferentes grupos químicos de flavonoides prenilados, como é o caso do Morusin, kuwanon C, sanggenon B e D (Figura 9) isolados da casca da raiz de *Morus* que apresentam atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmatis* (NOMURA, 1988).

Figura 9 - Estrutura química de flavonoides prenilados com atividade antimicrobiana isolados de *Morus*.



Fonte: Adaptado de SOHN et al., 2004.

## 2.5 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos são considerados uma promissora fonte de metabólitos secundários como os alcalóides, terpenóides, quinonas, flavonoides e ácidos fenólicos (ESTEVINHO et al., 2022). Um exemplo é o ascomiceto *Botryosphaeria dothidea* que têm se destacado como alternativa na produção de antioxidantes devido sua alta produção de metabólitos fenólicos (VALENTE, 2017).

Esse endofítico, isolado de *Solanum americanum*, também é relatado como causador das manchas marrons em folhas e responsável por podridão em frutas, conforme ilustrado na Figura 10. Apesar disso, essa capacidade invasiva e de apropriação rápida o torna fonte de alto potencial de produção de metabólitos interessantes (XIAO et al., 2014).

Figura 10 - Cancro dos ramos de pitaya (*Hylocereus undatus*) causado por *Botryosphaeria dothidea*.



Fonte: DALBOSCO et al., 2019.

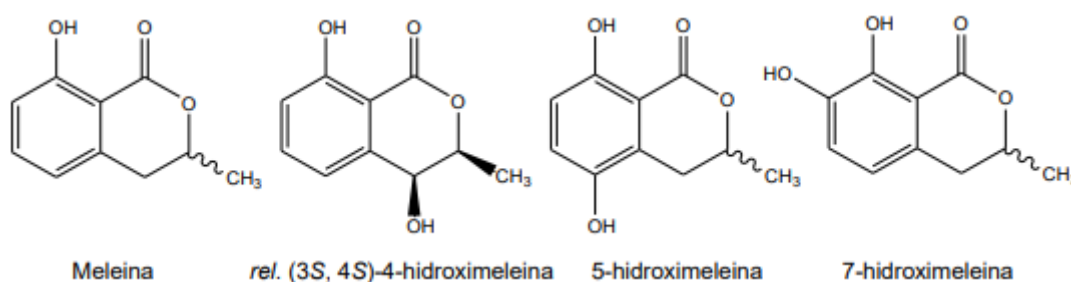
Em um estudo utilizando frações butanólicas do isolado *Pisolithus microcarpus* UFSC-Pt 221, obtido em áreas impactadas pela mineração de carvão, foi verificada a presença de flavonoides e também atividade antibacteriana frente às cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (MAMED, 2015).

A grafislactona A é uma substância reconhecida por sua atividade frente aos radicais livres, sendo um metabólito fenólico extraído dos fungos endofíticos *Cephalosporium sp.*, isolado de *Trachelospermum jasminoides*, e *Microsphaeropsis olivacea*, isolado de *Pilgerodendron uviferum* (SONG et al., 2005). Há também a piperina que apresenta potente atividade antioxidante, extraída a partir de metabólitos do fungo *Colletotichum gloeosporioides*, isolado de *Piper nigrum* (CHITHRA et al., 2014).

Compostos fenólicos foram isolados também de *Aspergillus wentii*, obtidos de resíduos do fundo do mar do Sul chinês, onde se observou novos produtos naturais com ótima capacidade antioxidante (WU, 2016). Estreitando a correlação entre atividade antioxidante e compostos fenólicos, extratos metabólicos de *Aspergillus japonicus* isolado da esponja *Cladocroce caelum* e de *Tedania ignis* apresentam abundante quantidade de compostos fenólicos além de poderosa atividade sequestradora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (ANDRADE, 2017).

Para o endófito *Botryosphaeria parva*, isolado da espécie *Eugenia jambolana* Lam, estudos de bioprospecção apontam relevante potencial biotecnológico, como atividade anticolinesterásica e antifúngica, além da produção da classe de fenólicos isocumarinas (Figura 11) (MONFARDINI, 2016).

Figura 11 - Isocumarinas isoladas do fungo endofítico *Botryosphaeria parva*.



Fonte: MONFARDINI, 2016.

Diversas são as espécies vegetais que podem ser fontes de fungos endofíticos produtores de compostos fenólicos, contudo, endofíticos isolados de espécies tropicais ainda são poucos estudados, como é o caso dos microrganismos associados à *Arrabidaea chica* (crajiu). Desse modo, por ser fonte de atividade antioxidante (JORGE et al., 2008; SIRAICHI et al., 2013), anti-inflamatória, anticancerígena e antiproliferativa (MICHEL et al., 2015), torna-se imprescindível conhecer o potencial da produção de metabólitos secundários fenólicos de endófitos dessa espécie vegetal.

### 2.5.1 Cultivo de Fungos para Produção de Metabólitos Secundários

O cultivo microbiano é uma das etapas mais importantes na produção de substâncias com atividade biológica, levando em consideração que tantos os metabólitos

primários quanto os secundários são sintetizados nessa etapa do processo (TABARAIE, 2020).

Na produção de metabólitos obtidos a partir de fungos se usam dois métodos de cultivo, sendo estes o cultivo submerso e o cultivo em meio sólido (FUCK, 2018). O cultivo em substrato sólido, em ausência ou baixa presença de água livre, é menos utilizado tendo em conta a complexidade para adequar o substrato, controlar as variáveis de temperatura e umidade e dificuldades com contaminação em larga escala, controle de pH e limitação de transferência de oxigênio (GUTTERRES et al., 2011).

Em contrapartida, o cultivo submerso é vastamente aplicado na produção de compostos de grande relevância econômica utilizados nas indústrias farmacêutica, alimentícia, agrícola e principalmente na química (SINGH, 2017). Esse cultivo acontece em meio constituído em sua quase totalidade por água e nutrientes dissolvidos (MOREIRA, 2021). Além disso, quando comparado à fermentação sólida, o cultivo em meio líquido se destaca por oferecer maior possibilidade de padronização do processo, homogeneização do sistema e facilidade de crescimento microbiano (SILVA, 2017).

Desse modo, no cultivo em meio líquido, além do excesso de água livre e nutrientes, o microrganismo é inoculado em meio contendo oxigênio, sendo de fácil manuseio e permitindo a alteração de fatores que influenciam as respostas bioquímicas como aeração, agitação, umidade e pH (FUCK, 2018). Por isso esse processo facilita a produção de bioativos que são predominantemente secretados no caldo de cultivo, podendo ser separados do substrato por filtração, por exemplo, sem apresentar dificuldades (MOREIRA, 2021).

Independentemente do método de cultivo utilizado, o processo é influenciado de forma direta pelos nutrientes fornecidos ao meio como fonte de carbono e nitrogênio (VANDENBERGHE, 2017). Atentando para isso, a escolha do substrato é de suma importância, tal que no cultivo submerso os meios de cultivo sintéticos mais utilizados para fungos são: caldo de batata dextrose (BDA), caldo Czapek-Dox Broth (CDB), caldo de extrato de levedura peptona dextrose (PYG) e fosfato levedura amido solúvel (YpSs) (SHARMA et al., 2016; ZHU, 2017).

A quantidade de metabólitos produzidos pelos microrganismos é sensível às condições do meio de cultura onde ele está sendo cultivado (SHEN et al., 2016), uma vez que há diferença na concentração de nutrientes e nas vias metabólicas resultantes de acordo com o meio (HORAK, 2019). Portanto, as condições de cultivo influenciam diretamente no rendimento do bioprocessamento.

A utilização de fungos cultivados em meio submerso é amplamente descrita na literatura para produção de diversos compostos com atividade biológica, sejam antibióticos, vitaminas, compostos fenólicos, enzimas, micotoxinas e outros (ZANCHETTA, 2012). A extração de substâncias bioativas em cultivo submerso pode ser feita com uso de solventes orgânicos, como o acetato de etila, usado por Verma, Johri e Prakash (2014) para extração de metabólitos do fungo endofítico *Aspergillus flavipes*, isolado de *Stevia rebaudiana*.

Apesar das muitas vantagens do cultivo microbiano em meio líquido e do fato de que são relatados microrganismos que produzem diversos metabólitos secundários, esta produção ocorre, geralmente, em baixa quantidade. Para atender a demanda do mercado, há necessidade de estudos de otimização de fatores químicos e físicos do meio visando obtenção de maior rendimento e bioatividade desejada (RAI, 2014).

### **2.5.2 Influência das Condições de Cultivo na Produção de Compostos Fenólicos**

As condições de cultivo são parâmetros críticos para a produção de metabólitos secundários por um organismo. Na maioria das vezes, a mínima alteração nutricional ou ambiental apresenta impactos substanciais na quantidade e características do perfil dos metabólitos secundários (VANDERMOLEN et al., 2013).

Os microrganismos têm a habilidade de modificar suas características bioquímicas e fisiológicas conforme os nutrientes aos quais são expostos. Consequentemente, o meio nutricional exerce uma influência direta sobre a produção de compostos fenólicos, a qual pode ser otimizada através do ajuste de parâmetros físico-químicos, como pH, temperatura e agitação, a fim de maximizar o rendimento (COSTA, 2016).

Estudos afirmam também que a produção de metabólitos de interesse é dependente não somente do meio de cultura e do meio nutricional como também da espécie do microrganismo (KUMAR, 2015).

Existem relatos de que o aumento de concentração de nitrogênio nos meios de cultivo, como a peptona, favorece a produção de polifenóis e seus derivados, sugerindo que a produção de compostos fenólicos pode estar relacionada ao consumo ou acréscimo das fontes de nitrogênio (COSTA, 2016).

De acordo com Souza (2018), a produção de massa micelial e do composto fenólico salidroside pelo microrganismo *C. glutamicum* foi estimulada pela otimização dos parâmetros, como a fonte de carbono utilizada (glicose) e a quantidade de inóculo.

Em outro estudo, o fungo endofítico *Aspergillus tamarii*, isolado de *Casuarina junghuhniana*, apresentou produção significativa de conteúdos fenólicos totais e flavonoides, além de ótimo rendimento dos extratos fúngicos, ao se utilizar dextrose como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Observou-se também maior produção de compostos fenólicos quando o cultivo ocorreu em temperatura de 30°C e pH 5,0 (BOSE et al., 2019).

A variação de pH e temperatura também funcionou como fator determinante para aumentar a atividade antioxidante em extratos isolados de *Justicia gendarussa*, observando-se que cultivos em pH na faixa de 4 a 5 favorecem a produção de flavonoides e polifenóis (AMID, 2013). Além disso, faixas de temperatura entre 28°C e 33°C favoreceram maior produção de flavonoides e polifenóis durante o cultivo do fungo endofítico *Phomopsis sp.* isolado de *Bauhinia variegata* (COSTA, 2016).

Desse modo, as variações das condições de cultivo podem auxiliar na produção de substâncias com atividades biológicas de interesse, além de possibilitar melhor entendimento dos aspectos bioquímicos e fisiológicos dos organismos estudados (RAMOS, 2008).

### **2.5.3 Planejamento Experimental Fatorial para Otimização de Processos**

O planejamento e a análise de experimentos são metodologias utilizadas a partir da teoria estatística com o intuito de implementar melhorias de processos e produtos através da redução de recursos materiais, financeiros e números de testes (SIMONELLI, 2013). O uso dessas metodologias permite a otimização dos processos resultando em aperfeiçoamento de performance e aumento de rendimento dos produtos que se deseja obter (CUNICO, 2008).

A metodologia de planejamento experimental auxilia na visualização de variáveis e no entendimento da interferência das mesmas nos sistemas observados (BACO, 2019). Dessa maneira, o método facilita a combinação das variáveis envolvidas proporcionando maior precisão estatística possível (NARENDERAN et al., 2019).

Tendo entendimento que processos bioquímicos e químicos recebem influência de vários parâmetros, há a necessidade de entender e distinguir os que exercem maior impacto no sistema, podendo-se fazer uso de planejamento experimental para esse fim (BARROS et al., 2010).

Para definição do melhor projeto experimental, deve-se levar em conta os objetivos definidos, as variáveis e a etapa em que o processo se encontra. No Quadro 3 é possível observar as situações em que se aplicam as técnicas de planejamento de experimentos, sendo divididos em: triagem das variáveis, otimização das condições e validação das condições otimizadas (RODRIGUES e IEMMA, 2014; BACO, 2019).

Quadro 3 - Etapas de planejamento experimental para otimização de processos.

<b>Etapa do processo</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Situação</b>
Seleção de variáveis (Fatorial fracionado ou Plackett & Burman)	Identificação das variáveis de maior importância	Diversos fatores e pouco conhecimento do processo
Otimização de condições (Fatorial completo)	Construção de modelos preditivos	Poucos fatores e dentro de região ótima de processo
Validação das condições otimizadas	Confirmação experimental dos resultados obtidos por análise de superfície de resposta	Condições otimizadas definidas

Fonte: Adaptado de RODRIGUES e IEMMA, 2014.

Em situações de otimização das condições de cultivo para produção de metabólitos de interesse, o principal benefício da aplicação do planejamento fatorial é a avaliação das variáveis de maior relevância de modo simultâneo (SIMONELLI, 2013).

Normalmente essa técnica de planejamento é representada no formato  $a^k$ , onde  $a$  indica a quantidade de níveis (diferenças das condições experimentais de um fator) e o expoente  $k$  de fatores (variáveis que exercem influência na resposta do processo) presentes no sistema. O estudo mais comum de planejamento fatorial é do tipo  $a = 2$  (CUNICO, 2008).

O planejamento fatorial é amplamente aplicado em processos de extração para obtenção de metabólitos, como por exemplo a extração de flavonoides de *Lippia sidoides* utilizando planejamento fatorial  $2^3$ , tendo como fatores o método extrativo, solvente e quantidade de amostra vegetal (LIMA, 2015). Outra aplicação utilizando o mesmo planejamento é o ensaio que proporcionou maior teor de fenóis totais, flavonoides e taninos tendo como fatores o tempo de extração, proporção de extratos e teor alcóolico para *Maytenus rigida* (NERI, 2016).

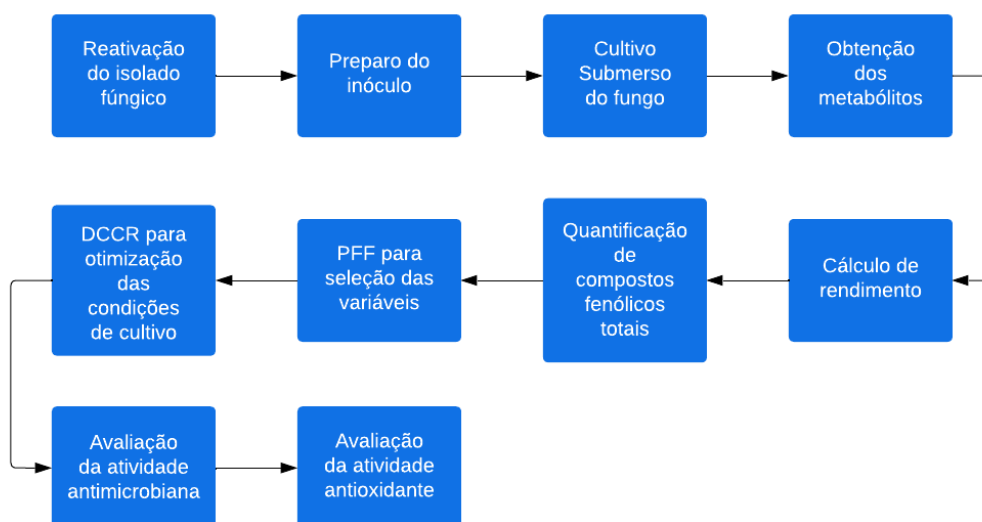
Dessa forma, a aplicação de planejamento experimental para otimização e obtenção de compostos bioativos apresenta diversas vantagens como entendimento dos efeitos das variáveis, confiabilidade dos resultados, condução da pesquisa em processo interativo, bem como conclusões obtidas a partir de produtos qualitativos (COSTA, 2016).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental deste estudo ocorreu conforme as etapas apresentadas na Figura 12.

Figura 12 - Diagrama de fluxo das etapas desenvolvidas no trabalho.



PFF = Planejamento Fatorial Fracionado; DCCR = Delineamento do Composto Central Rotacional.

#### 3.2 MICRORGANISMO

O fungo endofítico utilizado neste estudo foi o *Botryosphaeria mamane* CF213, isolado de folhas de *A. chica*, coletadas em março de 2019 na Embrapa Amazônia Ocidental. O microrganismo está depositado na Central de Coleções Microbiológicas, na subcoleção do grupo de pesquisa Química Aplicada à Tecnologia (QAT) da Escola Superior de Tecnologia (EST) da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), preservado através da técnica de Castellani (1939).

##### 3.2.1 Reativação do Isolado Fúngico

O fungo *B. mamane* CF213 foi reativado por inoculação de fragmento da cultura estoque em placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA) com posterior

incubação em estufa microbiológica (BOD) durante cinco dias à temperatura de 28°C, monitorando-se diariamente a necessidade de purificação da cepa.

### 3.3 CULTIVO SUBMERSO DO FUNGO

Foi preparado 150 mL de meio líquido composto por: caldo de batata portuguesa (200 g/L); dextrose (10 g/L); extrato de levedura (2,0 g/L); NaCl (5,0 g/L), em pH 5,0. Este meio foi colocado em frascos Erlenmeyer de 250 mL e, posteriormente, autoclavado à 121 °C durante 15 minutos.

Foram inoculados três fragmentos da cultura fúngica de 5x5 mm de diâmetro e o cultivo foi realizado em triplicata sob condições estáticas durante período de 14 dias a 30 °C e protegido de exposição luminosa, fazendo uso da metodologia de Bose, Gowrie e Chathurdevi (2019), com adaptações.

### 3.4 ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para avaliar o efeito das fontes de carbono e nitrogênio sobre o rendimento dos extratos fúngicos e produção de compostos fenólicos, diferentes concentrações de dextrose e extrato de levedura foram utilizadas. Temperatura de cultivo e pH do meio também foram avaliados, a fim de se encontrar as condições que proporcionassem maior rendimento do extrato e maior produção de compostos fenólicos.

A adição das fontes nutricionais (C e N), temperatura (T) e pH foram avaliadas por meio de planejamento experimental.

#### 3.4.1 Planejamento Experimental Fatorial Fracionado

Foi realizado inicialmente um planejamento fatorial fracionado (PFF)  $2^{4-1}$ , para selecionar as variáveis independentes - fonte de carbono (dextrose), fonte de nitrogênio (extrato de levedura), temperatura e pH - que influenciam de forma estatisticamente significativa a produção de compostos fenólicos e o rendimento dos extratos fúngicos (variáveis dependentes). As variáveis estudadas e seus níveis estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Variáveis e seus níveis utilizados para o cultivo do fungo endofítico *B. mamane* visando o aumento da produção de compostos fenólicos e do rendimento de extrato fúngico.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
C (g/L)	8	10	12
N (g/L)	1	2	3
T (°C)	27	30	33
pH	3,5	5	6,5

C = fonte de carbono (dextrose); N = fonte de nitrogênio (extrato de levedura); T = temperatura de cultivo; pH = potencial hidrogeniônico.

Na Tabela 2 está representada a matriz do planejamento experimental utilizada para realização do cultivo submerso do fungo visando avaliar quais das variáveis exerce um efeito significativo no rendimento e na concentração de compostos fenólicos.

Tabela 2 - Matriz do planejamento experimental fatorial fracionado  $2^{4-1}$  utilizado para avaliar a produção de compostos fenólicos e o rendimento de extrato fúngico.

Ensaio	Variáveis codificadas				Variáveis reais			
	C (g/L)	N (g/L)	T (°C)	pH	C (g/L)	N (g/L)	T (°C)	pH
1	-1	-1	-1	-1	8	1	27	3,5
2	1	-1	-1	1	12	1	27	6,5
3	-1	1	-1	1	8	3	27	6,5
4	1	1	-1	-1	12	3	27	3,5
5	-1	-1	1	1	8	1	33	6,5
6	1	-1	1	-1	12	1	33	3,5
7	-1	1	1	-1	8	3	33	3,5
8	1	1	1	1	12	3	33	6,5
9	0	0	0	0	10	2	30	5
10	0	0	0	0	10	2	30	5
11	0	0	0	0	10	2	30	5

C = fonte de carbono (dextrose); N = fonte de nitrogênio (extrato de levedura); T = temperatura de cultivo; pH = potencial hidrogeniônico.

### 3.4.2 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Após a seleção das variáveis por meio do PFF foi realizado um planejamento tipo DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) a fim de se conhecer as condições ótimas de cultivo para a obtenção de maior rendimento do extrato e do aumento da produção de compostos fenólicos.

Na Tabela 3 estão apresentados os níveis das variáveis selecionadas para o DCCR, visando a otimização das condições de cultivo.

Tabela 3 - Níveis de variáveis definidos para a otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *B. mamane*, por meio do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
C (g/L)	9	10,5	12	13,5	15
T (°C)	28	30,5	33	35,5	38

C = fonte de carbono (dextrose); T = temperatura de cultivo.

Além disso, fixou-se a fonte de nitrogênio (extrato de levedura) em 3,0 g/L e o pH em 6,5. Na Tabela 4 está apresentada a matriz do DCCR utilizado para avaliar a influência das condições selecionadas.

Para análise dos dados experimentais foi utilizado o Software Statistica 10.0 ( $p < 0,05$ ). Fazendo uso da ferramenta de planejamento experimental, foi possível investigar a influência das variáveis no aumento do rendimento e na produção de compostos fenólicos. O erro experimental foi avaliado a partir das triplicatas no ponto central (CUNICO, 2008, com adaptações).

Tabela 4 - Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) utilizado para o estudo das condições ótimas de cultivo do fungo endofítico *B. mamane* visando o aumento do rendimento de extrato fúngico e da produção de compostos fenólicos.

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	C (g/L)	T (°C)	C (g/L)	T (°C)
1	-1	-1	10,5	30,5
2	-1	1	10,5	35,5
3	1	-1	13,5	30,5
4	1	1	13,5	35,5
5	-1,41	0	9,0	33,0
6	1,41	0	15,0	33,0
7	0	-1,41	12,0	28,0
8	0	1,41	12,0	38,0
9	0	0	12,0	33,0
10	0	0	12,0	33,0
11	0	0	12,0	33,0

C = fonte de carbono (dextrose); T = temperatura de cultivo.

### 3.5 OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS E CÁLCULO DO RENDIMENTO

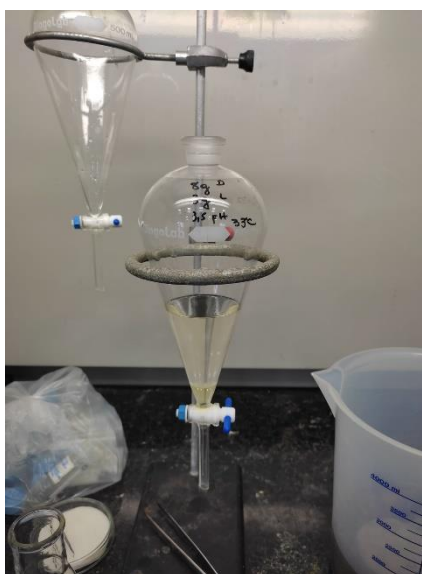
Após o tempo de cultivo, foi adicionado ao meio acetato de etila P.A em proporção 1:1 para extração dos metabólitos. Os frascos foram agitados a 120 rpm na temperatura ambiente em incubadora tipo shaker durante 4 horas. Passado o período de extração, foi realizada filtração a vácuo utilizando papel filtro com auxílio de funil de Büchner para retirada do micélio. As frações obtidas foram separadas em funil de separação, conforme as Figura 13 e 14.

Figura 13 - Filtração a vácuo dos metabólitos fúngicos.



Fonte: Autorial, 2023.

Figura 14 - Separação das frações dos metabólitos fúngicos.



Fonte: Autorial, 2023.

Para o cálculo do rendimento em massa foram utilizados béqueres previamente pesados em balança analítica onde foram adicionados os extratos para evaporação do solvente em capela de exaustão (Figura 15). Passado o período de evaporação, a massa de extrato seco obtida foi mensurada na mesma balança analítica utilizada para pesagem dos béqueres e a diferença de peso do frasco com a massa e o frasco vazio foi considerada o rendimento obtido.

Figura 15 - Evaporação do solvente em capela de exaustão.



Fonte: Autoral, 2023.

Os extratos foram ressuspensos em solução de DMSO a 10% na concentração de 10 mg/mL e depois foram armazenados em freezer a  $-18^{\circ}\text{C}$  para quantificação dos compostos fenólicos totais e posterior avaliação das atividades biológicas.

### 3.6 QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

#### 3.6.1 Preparo das Soluções

A quantificação de fenólicos totais nos extratos foi determinada seguindo a metodologia de Folin-Ciocalteu descrita por Singleton e Rossi (1965) com modificações. Foram preparadas três soluções: carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 10%, Folin-Ciocalteu a 3% e a solução padrão de ácido gálico (AG) (200 mg/L).

Para preparo da primeira solução, pesou-se 10,06 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  que foi diluído com água destilada para 100 mL em balão volumétrico, agitando-se até completa diluição da amostra. Em seguida, para a solução de Folin-Ciocalteu, diluiu-se 3 mL do reagente com água destilada para um volume final de 100 mL em balão volumétrico, garantindo mistura completa. Por fim, para a solução padrão, diluiu-se 0,0101 g de AG 99% com etanol P.A. para volume final de 50 mL. Todas as soluções foram armazenadas em frasco de vidro âmbar.

### 3.6.2 Obtenção da Curva de Calibração

Para obtenção da curva de calibração foram utilizadas as concentrações de 100; 80; 60; 40 e 20 mg AG/L, obtidas a partir da diluição da solução padrão de AG em etanol P.A utilizando balão volumétrico. Em seguida, fazendo uso de tubos de ensaio de 10 mL envolvidos em papel alumínio, adicionaram-se 0,25 mL das soluções padrão de AG (100 a 20 mg AG/L) e 2,75 mL da solução de Folin-Ciocalteu a 3%. Todas as análises foram realizadas em triplicata, totalizando quinze tubos de ensaio. Como branco, utilizou-se um tubo contendo 0,25 mL de etanol P.A e 2,75 mL da solução de Folin-Ciocalteu a 3%, também em triplicata.

As amostras foram submetidas a 10 segundos de agitação em vortex seguidos de 5 minutos de repouso. Passado esse período, adicionou-se 0,25 mL da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10% e os tubos de ensaio foram colocados em repouso à temperatura ambiente, protegidos da exposição luminosa por uma hora. Após isso, realizou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro a 765 nm e a partir dos valores de concentração e absorbância (Abs) das soluções padrão, construiu-se a curva de calibração e se obtiveram os parâmetros  $a$  (coeficiente angular),  $b$  (coeficiente linear) e  $r^2$  (coeficiente de correlação) da reta de regressão linear.

### 3.6.3 Análise dos Extratos

Para análise das amostras dos extratos fúngicos foram utilizados tubos de ensaio de 10 mL envolvidos em papel alumínio, onde se adicionou 0,25 mL de extrato e 2,75 mL da solução de Folin-Ciocalteu a 3%. Como branco se utilizou a mesma amostra aplicada na construção da curva de calibração e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os tubos contendo as amostras foram agitados durante 10 segundos em vortex seguidos de 5 minutos de repouso. Posteriormente foram adicionados 0,25 mL da solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10% e, em seguida, foram agitados por mais 10 segundos. Depois disso, as amostras repousaram durante uma hora à temperatura ambiente, protegidas da exposição luminosa.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 765 nm, obtendo-se os valores de absorbância para cada amostra utilizados para determinação da concentração de ácido gálico equivalente (AGE) no extrato a partir da Equação 1 abaixo.

$$C \text{ (mg/L)} = \frac{(Abs-b)}{a} \quad (1)$$

Onde:

C = Concentração de Ácido Gálico Equivalente;

Abs = Absorbância da amostra a 765 nm;

b = Coeficiente linear da curva de calibração;

a = Coeficiente angular da curva de calibração.

### 3.7 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 3.7.1 Atividade Antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi utilizada a técnica de microdiluição (CLSI, 2017) por redução da resazurina na amostra que apresentou maior concentração de AGE (mg/L) obtida a partir do DCCR.

Os metabólitos fúngicos das amostras selecionadas foram testados frente às cepas obtidas comercialmente da Cefar Diagnóstica Ltda: *Staphylococcus aureus* (CCCD-S009), *Escherichia coli* (CCCD-E005) e *Pseudomonas aeruginosa* (CCCD-P004).

Para o ensaio foram utilizados 100 µL de extrato da amostra e 100 µL de inóculo microbiano. O controle positivo foi realizado com 100 µL de Levofloxacino (antibiótico) na concentração de 0,25 mg/mL e 100 µL de inóculo, enquanto para controle negativo foi utilizado 100 µL de inóculo microbiano. Para controle de esterilidade foi utilizado 100 µL de meio de cultura estéril (caldo Mueller Hinton) utilizado para preparação do inóculo.

As placas foram incubadas à temperatura de 37°C em BOD durante 24 horas e, posteriormente foram inseridos 30 µL de resazurina em todos os poços. Em seguida, foram incubadas mais uma vez, sob mesma temperatura, durante 1 hora, para verificação da redução do revelador inserido. O aparecimento da cor rosa indicou que houve crescimento celular (sem atividade antimicrobiana) enquanto a coloração azul indica ausência de crescimento celular e, conseqüentemente, presença de atividade antimicrobiana.

A Concentração Mínima Inibitória (CIM) foi determinada por meio de diluições sucessivas das amostras nas concentrações de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125 mg/mL, onde a menor concentração dos meios metabólicos que conseguiu inibir o crescimento microbiano foi considerada a CIM.

### 3.7.2 Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada através do método do sequestro do radical livre DPPH na amostra que apresentou maior produção de compostos fenólicos a partir da otimização obtida com o DCCR. A solução de DPPH foi preparada na concentração de 0,06 mmol/L com metanol P.A, sendo armazenada em frasco âmbar para proteção da exposição luminosa (SILVA, 2012).

Foram utilizadas microplacas de 96 poços onde se adicionou 40 µL de extrato e 250 µL da solução de DPPH. Como branco, utilizou-se 40 µL do extrato fúngico e 250 µL de álcool metílico P.A e, como controle negativo, utilizou-se 40 µL de álcool metílico P.A e 250 µL da solução de DPPH.

Após 10 minutos em ambiente escuro, as misturas reacionais foram submetidas às leituras de absorbância com uso do leitor de microplaca (Molecular Devices, modelo Spectramax Plus) a 517 nm. A mudança de coloração púrpura para amarelo observada indicou a perda de absorbância medida em espectrofotômetro.

Como padrão foi utilizado quercetina partindo de concentração de 40 µg/mL e diluindo sucessivamente até a concentração de 0,625 µg/mL a fim de construir a curva de calibração. A Equação 2 abaixo foi utilizada para calcular a porcentagem de sequestro dos radicais livres DPPH através da diminuição da absorbância da amostra ( $Ab_{amostra}$ ) e do controle ( $Ab_{controle}$ ).

$$AA (\%) = \frac{Abscontrole - Absamostra}{Abscontrole} \times 100 \quad (2)$$

Determinou-se a concentração eficiente ( $CE_{50}$ ), necessária para o sequestro de 50% dos radicais DPPH•, através de sucessivas diluições das amostras e da geração de um gráfico de regressão linear.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS

#### 4.1.1 Seleção das Variáveis Significativas para o Rendimento do Extrato Fúngico

Avaliou-se o rendimento do extrato fúngico por meio da análise da influência das fontes de carbono (dextrose), nitrogênio (extrato de levedura), temperatura e pH. A partir do PFF  $2^{4-1}$  foi possível observar maior rendimento de extrato no ensaio 8, com 0,2495 g, em cultivo realizado com 12 g/L de dextrose, 3 g/L de extrato de levedura, temperatura de 33°C e pH 6,5. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Rendimento dos extratos fúngicos obtidos no planejamento fatorial  $2^{4-1}$  a partir do cultivo do fungo endofítico *B. mamane* em diferentes condições.

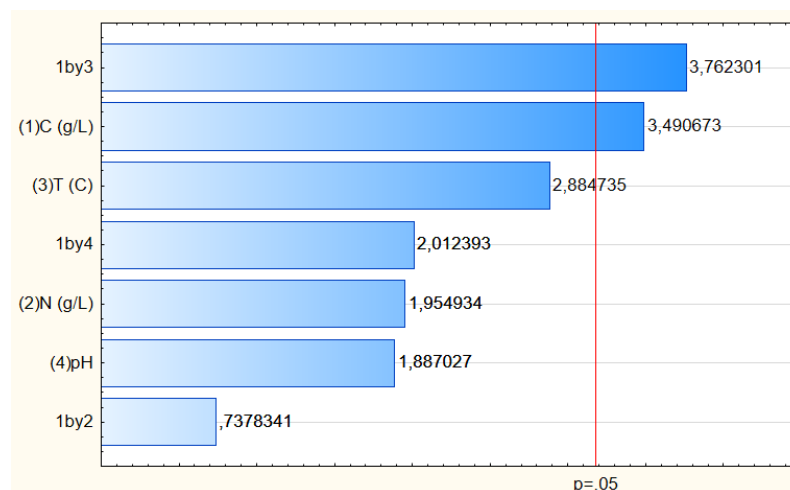
Ensaio	Variáveis				Rendimento de extrato (g)
	C (g/L)	N (g/L)	T (°C)	pH	
1	-1	-1	-1	-1	0,0539
2	1	-1	-1	1	0,0707
3	-1	1	-1	1	0,0748
4	1	1	-1	-1	0,0476
5	-1	-1	1	1	0,0347
6	1	-1	1	-1	0,1233
7	-1	1	1	-1	0,0604
<b>8</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0,2495</b>
9	0	0	0	0	0,0692
10	0	0	0	0	0,0522
11	0	0	0	0	0,0551

C = fonte de carbono (dextrose); N = fonte de nitrogênio (extrato de levedura); T = temperatura de cultivo; pH = potencial hidrogeniônico.

O fator de maior influência sobre o rendimento do extrato de *B. mamane* ( $p = 0,033$ ) foi a interação entre as variáveis C e T, com efeito estimado de 3,76. Além disso, a fonte de carbono individualmente também se mostrou significativa ( $p < 0,05$ ), com

efeito estimado de 3,49. Os efeitos das variáveis estudadas e de suas interações sobre o rendimento de extrato estão demonstrados no diagrama de Pareto (Figura 16).

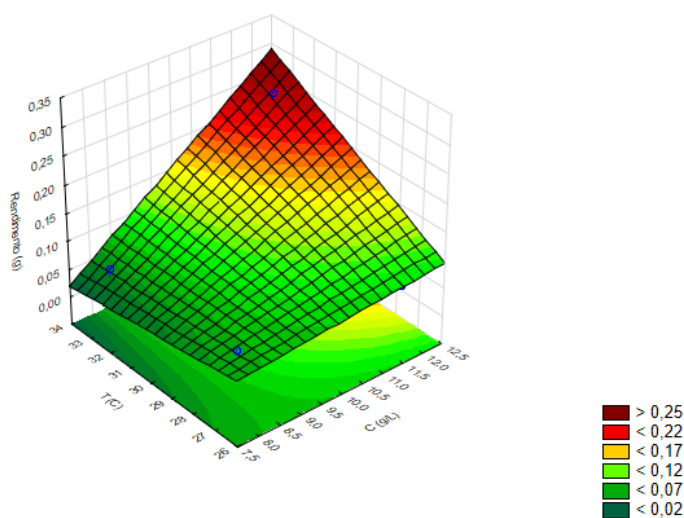
Figura 16 - Diagrama de Pareto obtido no planejamento fatorial para o rendimento de extrato fúngico a partir do cultivo de *B. mamane* em diferentes condições.



(1) C = fonte de carbono (dextrose); (2) N = fonte de nitrogênio (extrato de levedura);  
(3) T = temperatura de cultivo; (4) pH = potencial hidrogeniônico.

A Figura 17 ilustra a superfície de resposta que evidencia o impacto das variáveis C e T no rendimento. Nota-se que a região de alto rendimento é alcançada em temperaturas elevadas e concentrações mais altas de C (dextrose). Portanto, conclui-se que essa combinação deve ser escolhida para a próxima etapa do processo.

Figura 17 - Superfície de resposta obtida pelo planejamento fatorial para o rendimento em função da dextrose (C) e temperatura de cultivo (T).



C = fonte de carbono (dextrose); T = temperatura de cultivo.

Esse resultado vai de acordo com o observado por Leite (2016) que avaliou a influência da fonte de carbono (glicose, amido, lactose e sacarose) (15,0 g/L – 50,0 g/L) para o fungo *Botryosphaeria rhodina* e verificou que concentrações mais altas de carbono, independente da fonte, influenciaram diretamente na maior produção de extrato micelial, além da produção do composto de interesse no estudo.

A fonte de carbono exerce influência significativa na produção de metabólitos e no aumento do rendimento, tendo em vista que o carbono é um dos componentes fundamentais para a formação de biomassa fúngica (BANERJEE, 2016). Assim, o aumento dessa variável pode causar estresse no ambiente de cultivo, estimulando a busca por rotas alternativas que beneficiem a produção de bioativos e aumento de rendimento de extrato fúngico, conforme indicado na superfície de resposta na Figura 17, corroborado pelo resultado de Leite (2016).

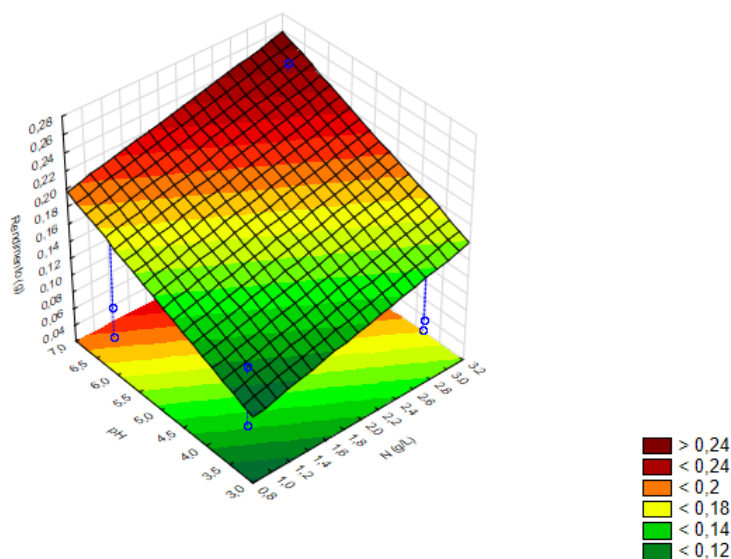
Em ensaio de termotolerância para crescimento de fungos endofíticos isolados da caatinga, Franco (2022) incubou as amostras em temperaturas de 15 – 45°C, observando maior rendimento na faixa de 30 – 35°C, faixa de temperatura semelhante as que proporcionaram maiores rendimentos de extrato neste estudo.

A temperatura afeta diretamente o rendimento de extrato fúngico, já que influencia o crescimento e a produção metabólica do endófito. A grande maioria dos fungos apresenta uma temperatura ótima de crescimento e, geralmente, o aumento da temperatura favorece o desenvolvimento do microrganismo (BANERJEE, 2016).

É importante ressaltar que o efeito dos fatores citados acima pode variar dependendo do tipo de fungo, mas o aumento dessas variáveis combinado com as outras condições de cultivo utilizadas favoreceram a obtenção de maior rendimento para o extrato metabólico de *B. mamane*.

A superfície de resposta mostrada na Figura 18 exhibe a relação entre o rendimento do extrato fúngico e as variáveis N e pH. Embora a influência dessas variáveis não tenha sido estatisticamente comprovada, é possível notar que seus efeitos são positivos, ou seja, maiores concentrações da fonte de nitrogênio e um pH mais elevado parecem favorecer um maior rendimento na produção do extrato.

Figura 18 - Superfície de resposta obtida pelo planejamento fatorial para o rendimento em função do extrato de levedura (N) e pH.



N = fonte de nitrogênio (extrato de levedura); pH = potencial hidrogeniônico.

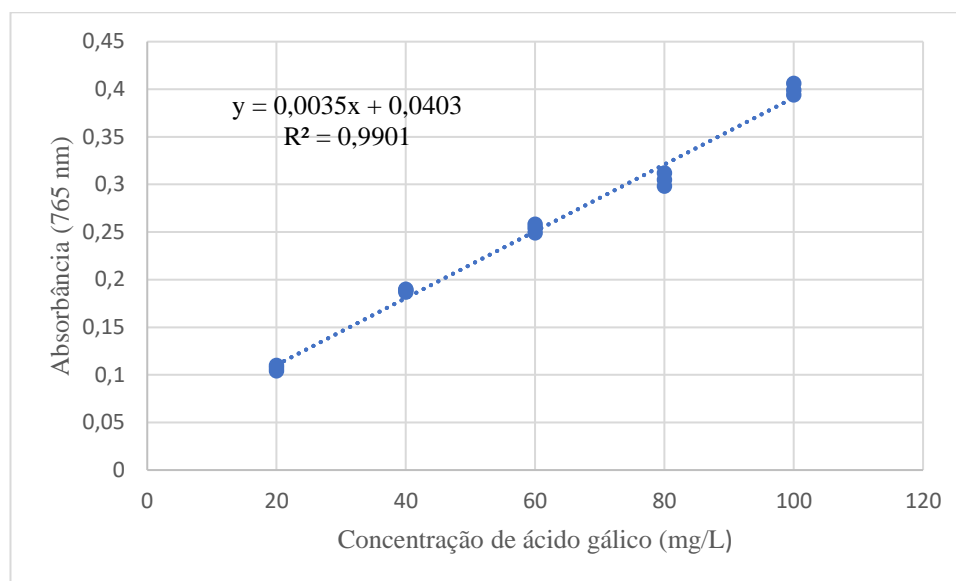
A partir da análise das superfícies de resposta, foi possível definir que a fonte de carbono e a temperatura de cultivo devem ser mantidos em níveis mais altos, visto que essa foi a condição que levou ao aumento do rendimento na referida interação. Além disso, com base no ensaio que apresentou maior rendimento de extrato, é preferível que a fonte de nitrogênio e pH também permaneçam em valores mais altos uma vez que essa condição favoreceu o aumento do rendimento.

#### 4.1.2 Seleção das Variáveis Significativas para Produção de Compostos Fenólicos

##### 4.1.2.1 Obtenção da curva de calibração e da concentração de ácido gálico equivalente dos extratos

A curva de calibração foi construída a partir dos valores de concentração e absorbância das soluções padrão, possibilitando a obtenção dos seguintes parâmetros: coeficiente angular ( $a = 0,0035$ ), coeficiente linear ( $b = 0,0403$ ) e coeficiente de correlação ( $r^2 = 0,99$ ) da reta de regressão, conforme segue na Figura 19.

Figura 19 - Curva de calibração de ácido gálico para quantificação de compostos fenólicos.



A concentração de ácido gálico equivalente nas amostras de extrato foi calculada com base na Equação 1, substituindo os valores de absorbância medidas em espectrofotômetro a 765 nm e dos coeficientes da curva de calibração. A partir disso, a quantificação de fenólicos resultante na primeira etapa do experimento sob diferentes condições foi a média das triplicatas das amostras em concentração de ácido gálico equivalente (mg/L).

#### 4.1.2.2 Influência da condição de cultivo na produção de compostos fenólicos

A partir do PFF  $2^{4-1}$ , observou-se as maiores concentrações de ácido gálico equivalente no ensaio 2 (24,87 mg/L) e no ensaio 3 (24,49 mg/L), cujas condições em comum são temperatura de cultivo (27°C) e pH (6,5). Os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração de AGE nos extratos fúngicos obtidos no planejamento fatorial  $2^{4-1}$  a partir do cultivo do fungo endofítico *B. mamane* em diferentes condições.

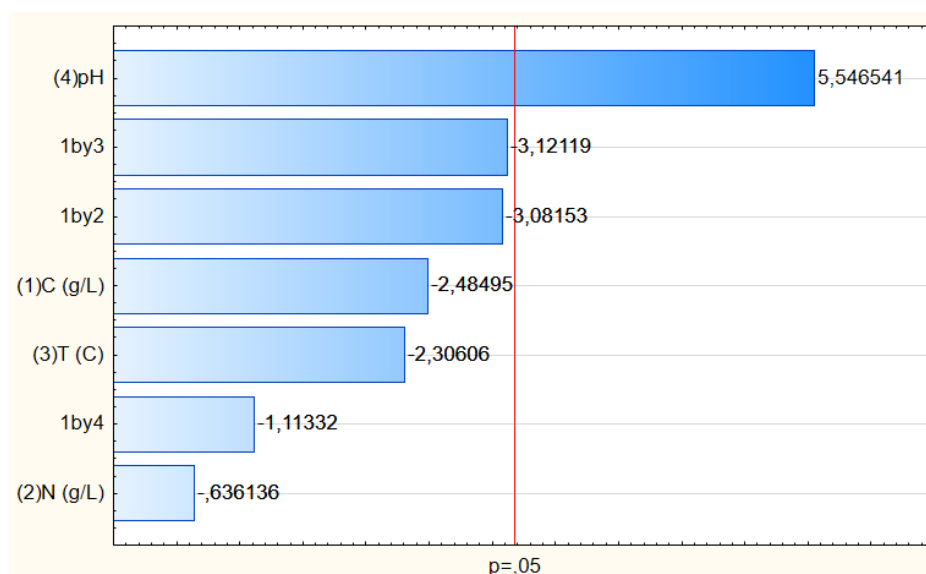
Ensaio	Variáveis				Concentração de AGE (mg/L)
	C (g/L)	N (g/L)	T (°C)	pH	
1	-1	-1	-1	-1	2,676
2	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>24,49</b>
3	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>24,87</b>
4	1	1	-1	-1	5,343
5	-1	-1	1	1	20,58
6	1	-1	1	-1	1,25
7	-1	1	1	-1	10,47
8	1	1	1	1	2,96
9	0	0	0	0	7,44
10	0	0	0	0	9,15
11	0	0	0	0	6,77

C = fonte de carbono (dextrose); N = fonte de nitrogênio (extrato de levedura); T = temperatura de cultivo; pH = potencial hidrogeniônico; AGE = Ácido gálico equivalente.

O fator que apresentou maior influência sobre a produção de compostos fenólicos ( $p = 0,011$ ) foi o pH, com um efeito estimado de 5,54, sendo a única variável estatisticamente significativa observada. O efeito positivo dessa variável indica que, o aumento do valor de pH de 3,5 para 6,5 favoreceu a produção de compostos fenólicos.

A interação entre as variáveis carbono e temperatura se mostrou próxima da significância estatística ( $p = 0,055$ ), com efeito estimado de -3,12 bem como a interação entre as fontes de carbono e nitrogênio ( $p = 0,054$ ) com efeito estimado de -3,08. O efeito negativo dessas interações significa que seus efeitos são opostos quando combinados, ou seja, menor nível de C e maior nível de T levam a melhores resultados de produção de fenólicos pelo fungo, assim como menores concentrações de carbono e maiores de N. Os efeitos das variáveis estudadas e suas interações sobre a produção de compostos fenólicos por *B. mamane* estão demonstradas no diagrama de Pareto na Figura 20.

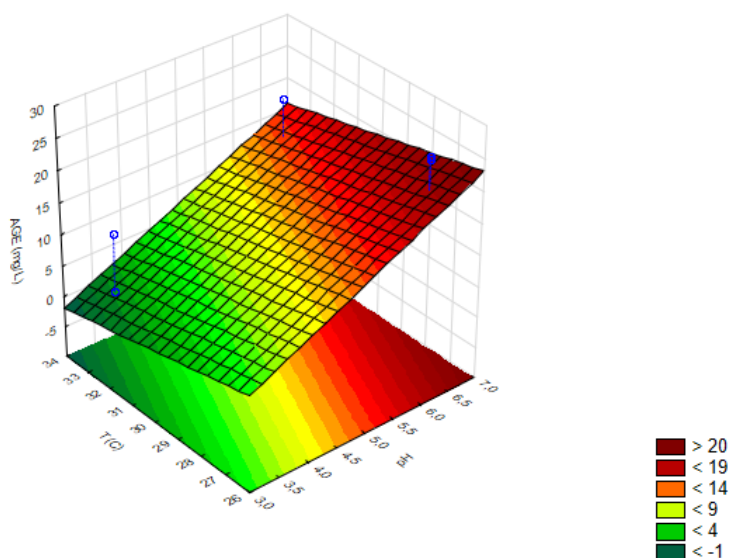
Figura 20 - Diagrama de Pareto obtido pelo planejamento fatorial para produção de compostos fenólicos a partir do cultivo de *B. mamane* em diferentes condições.



(1) C = fonte de carbono (dextrose); (2) N = fonte de nitrogênio (extrato de levedura);  
 (3) T = temperatura de cultivo; (4) pH = potencial hidrogeniônico.

O efeito das variáveis T e pH sobre a produção de compostos fenólicos pode ser observado na Figura 21 contendo a superfície de resposta. Observa-se uma região de mais alta produção de compostos fenólicos, em baixos valores de temperatura e altos valores de pH.

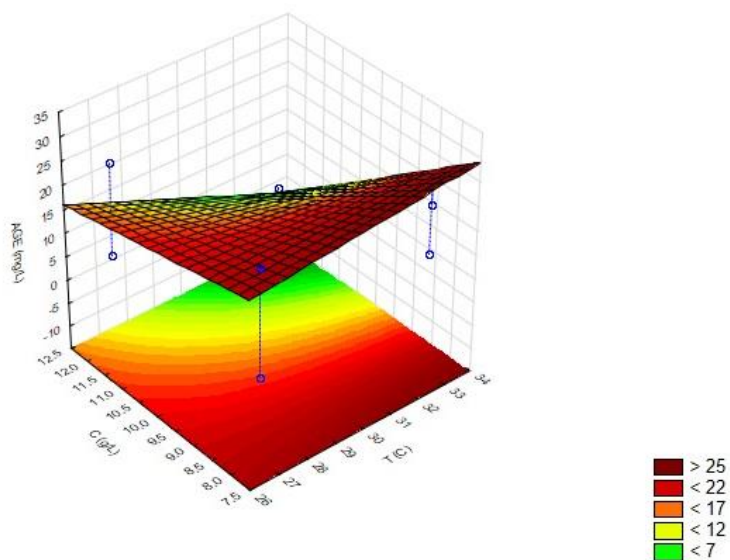
Figura 21 - Superfície de resposta para produção de fenólicos a partir do planejamento fatorial em função temperatura de cultivo (T) e pH.



T = Temperatura de cultivo; pH = potencial hidrogeniônico.

Na Figura 22, observa-se a superfície de resposta em função das variáveis T e C. Visualiza-se que a fonte de carbono variando entre 7,5 e 10,0 g/L quando combinada com temperaturas acima de 26 °C favorecem a produção de compostos fenólicos.

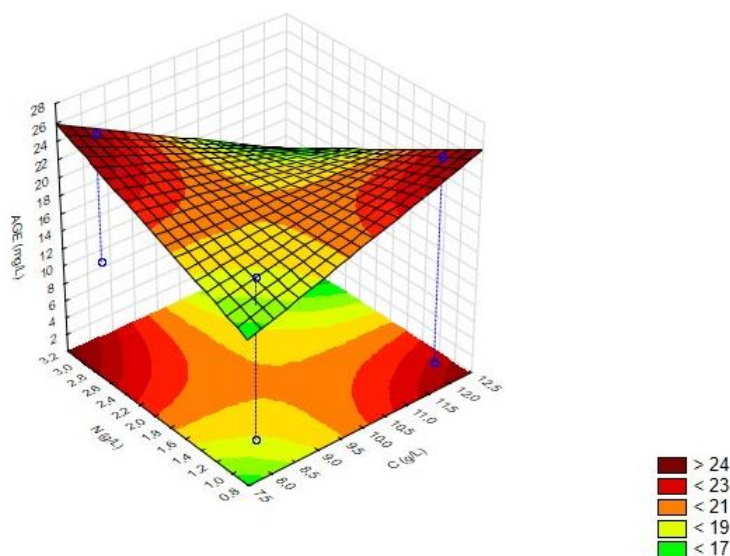
Figura 22 - Superfície de resposta para produção de fenólicos a partir do planejamento fatorial em função temperatura de cultivo (T) e fonte de carbono (C).



T = Temperatura de cultivo; C = fonte de carbono (dextrose).

Por último, observando a superfície de resposta para as fontes de carbono e nitrogênio na Figura 23, observam-se duas condições favoráveis para a produção de fenólicos: uma em altas concentrações de nitrogênio e baixas de carbono e outra em altas concentrações de carbono e baixas de nitrogênio.

Figura 23 - Superfície de resposta para produção de fenólicos a partir do planejamento experimental em função da fonte de carbono (C) e fonte de nitrogênio (N).



N = fonte de nitrogênio (extrato de levedura); C = fonte de carbono (dextrose).

Conseqüentemente, foram escolhidas as combinações mais favoráveis entre os fatores apresentados nas superfícies de respostas, conforme demonstrado nas Figuras 21, 22 e 23. Devido ao pH ser a única variável significativa e apresentar efeito positivo, é aconselhável fixá-lo em níveis mais elevados. Além disso, visto que altas concentrações de nitrogênio propiciaram uma maior produção de extrato fúngico e aumento no teor de fenólicos totais, optou-se por selecionar um valor mais elevado para essa variável.

No estudo de otimização das condições de cultivo para o isolado *Botryosphaeria* sp. AM01, visando obtenção de melhor atividade de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase, Tartarine (2018) observou que a faixa de pH mais próxima da neutralidade (5,5 – 7,0) favoreceu a produção de metabólitos responsáveis pelas maiores atividades enzimáticas, observando-se o mesmo comportamento para maior produção de fenólicos nos ensaios com pH de 6,5 no presente estudo.

A escolha do pH ótimo depende da espécie de fungo estudada, além do tipo de metabólito secundário a ser produzido. Em ensaio visando otimizar a produção de atividade amilolítica pelo fungo endofítico *Paecilomyces* sp. SF 021, Lima Junior (2020) destacou a importância e a influência dessa variável, obtendo os melhores resultados nas faixas de pH 5,0 a 6,0, corroborando o que foi observado na análise da superfície de resposta na Figura 21.

A fonte de nitrogênio é um dos parâmetros essenciais para a produção de compostos fenólicos e fontes orgânicas, como o extrato de levedura, oferecem perfil

nutricional mais completo, auxiliando a promover o crescimento e a produção de metabólitos dos fungos, resultando em aumento da produção de fenólicos totais. Bose, Gowrie e Chathurdevi (2019) comprovaram a eficácia da indução da produção de compostos fenólicos para o fungo *Aspergillus tamaritii* pelo extrato de levedura quando comparado a outras fontes inorgânicas como Nitrato de sódio e Cloreto de amônio, sustentando o impacto dessa fonte nutricional observado na Figura 23.

## 4.2 Otimização das Condições de Cultivo

As variáveis C e T foram selecionadas para estudo em um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), a fim de se obter as condições ótimas para maior rendimento a partir do cultivo de *B. mamane*. Além disso, visando favorecer a produção de compostos fenólicos, fixou-se o pH em 6,5 e a fonte de nitrogênio em 3,0 g/L, valores que favoreceram a obtenção da maior concentração de ácido gálico equivalente (24,87 mg/L) e também o maior rendimento de extrato fúngico (0,2495 g).

### 4.2.1 Otimização das Condições de Cultivo para Rendimento de Extrato

A Tabela 7 exibe os resultados obtidos a partir dos testes realizados no DCCR, incluindo o rendimento de extrato fúngico medido e os valores previstos a partir da Equação 3, definida com base nos coeficientes de regressão obtidos na análise de variância.

$$R(g) = -0,0092C^2 - 0,00339T^2 + 0,2478C + 0,239T - 0,00073TC - 5,4335 \quad (3)$$

Onde:

R = Rendimento de extrato previsto;

C = Fonte de carbono (dextrose);

T = Temperatura de cultivo.

De acordo com Silva (2022), o valor que geralmente é expresso em porcentagem e indica o grau de explicação dos resultados é conhecido como coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e, no modelo obtido experimentalmente, o valor de  $R^2$  foi 85% evidenciando a significância estatística do modelo.

Tabela 7 - Rendimento dos extratos fúngicos obtido no estudo rotacional (DCCR) a partir do cultivo de *B. mamane* em diferentes condições para as variáveis selecionadas.

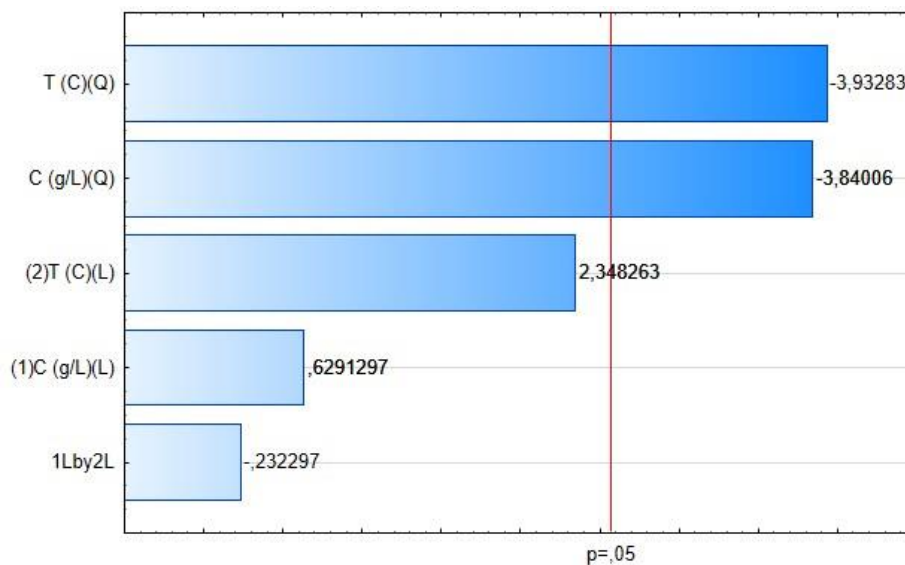
Ensaio	Variáveis		Rendimento de extrato (g)	Rendimento de extrato previsto (g)
	C (g/L)	T (°C)		
1	-1	-1	0,0727	0,0556
2	<b>-1</b>	<b>1</b>	<b>0,1270</b>	<b>0,0932</b>
3	1	-1	0,0719	0,0697
4	1	1	0,1152	0,0963
5	-1,41	0	0,0128	0,0292
6	1,41	0	0,0449	0,0464
7	0	-1,41	0,0031	0,0037
8	0	1,41	0,0506	0,0679
9	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,1081</b>	<b>0,1206</b>
10	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,1105</b>	<b>0,1206</b>
11	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,1073</b>	<b>0,1206</b>

C = fonte de carbono (dextrose); T = temperatura de cultivo.

Percebe-se que os resultados experimentais obtidos são muito próximos dos valores esperados e os 4 primeiros ensaios apresentaram rendimentos superiores aos valores teóricos. Além disso, destaca-se o ensaio 2 nas condições de 10,50 g/L de dextrose e em temperatura de 35,5°C onde o rendimento obtido foi 0,1270 g de extrato, bem como os ensaios realizados em triplicata (9, 10 e 11) onde se obteve rendimento de 0,1081, 0,1105 e 0,1073 g de extrato fúngico, respectivamente.

Através do Diagrama de Pareto gerado pelo DCCR, representado na Figura 24, foi possível identificar que as funções quadráticas das variáveis temperatura e carbono apresentaram relevância estatística ( $p < 0,05$ ), com efeito estimado negativo de -3,93 e -3,84, respectivamente, sobre o rendimento de extrato fúngico.

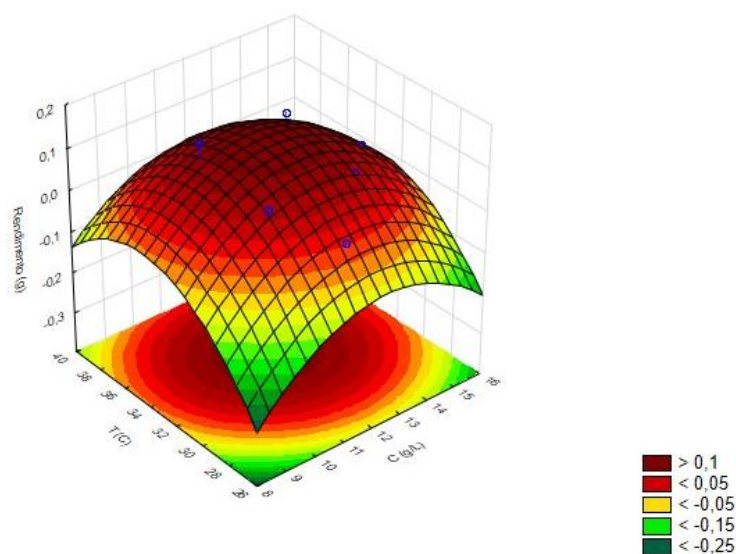
Figura 24 - Diagrama de Pareto para o rendimento de extrato fúngico obtido no delineamento (DCCR) a partir do cultivo de *B. mamane* em diferentes condições para as variáveis selecionadas C e T.



(1) C = fonte de carbono (dextrose); (2) T = temperatura de cultivo.

Através da análise da superfície de resposta (Figura 25), foi constatado que as faixas de carbono e temperatura escolhidas para o ponto central foram favoráveis ao aumento da produção de extrato fúngico pelo *B. mamane*. Esse resultado indica que as faixas selecionadas estão próximas das condições ideais de cultivo para obtenção do maior rendimento.

Figura 25 - Superfície de resposta para aumento do rendimento de extrato fúngico a partir da otimização (DCCR) pelo *B. mamane* em função das variáveis T e C.



C = fonte de carbono (dextrose); T = temperatura de cultivo.

Utilizando o software Statistica 10.0, foram obtidos os valores críticos que proporcionam o maior rendimento de extrato fúngico, ou seja, as condições ótimas de cultivo para maximizar a produção de extrato fúngico. Os valores obtidos foram  $C = 12,119$  g/L e  $T = 33,93$  °C.

Quando comparado ao maior valor obtido no planejamento fatorial fracionado (0,2495 g), a otimização das condições de cultivo resultou em diminuição de 0,1225 g, uma vez que o melhor resultado do DCCR foi de 0,1270 g. Por outro lado, quando comparado ao valor da média da triplicata do ponto central, condições de partida do estudo (0,0588 g), a otimização das condições resultou em um aumento de rendimento de aproximadamente 2,16 vezes, demonstrando o impacto das condições otimizadas, levando em consideração o quão desafiador é aumentar o rendimento de extratos fúngicos.

Além disso, o ponto crítico encontrado a partir da otimização é extremamente próximo das condições que proporcionaram o maior rendimento obtido no PFF, confirmando que o máximo rendimento será obtido nessas condições. Sendo um processo interativo e influenciado por vários fatores como quantidade de inóculo, técnica de extração e idade do micélio, a otimização das condições de cultivo requer ajustes e testes repetidos para atingir a máxima produção de extrato fúngico.

#### 4.2.2 Otimização das Condições de Cultivo para Produção de Compostos Fenólicos

Os resultados dos ensaios realizados para quantificação de fenólicos totais no DCCR seguem na Tabela 8, onde são apresentados tanto os valores de concentração AGE (mg/L) medidos quanto os valores previstos com base na equação 4 derivada dos coeficientes ANOVA. O coeficiente de determinação ( $R^2 = 0,94$ ) indica que o modelo obtido apresentou ótimo ajuste aos dados experimentais.

$$AGE \left( \frac{mg}{L} \right) = 6,209C^2 - 2,988T^2 - 263,449C + 137,626T + 3,524TC - 50,934 \quad (4)$$

Onde:

AGE = Concentração de ácido gálico equivalente previsto;

C = Fonte de carbono (dextrose);

T = Temperatura de cultivo.

Tabela 8 - Quantidade de fenólicos totais obtido no estudo DCCR a partir do cultivo de *B. mamane* em diferentes condições para as variáveis selecionadas C e T.

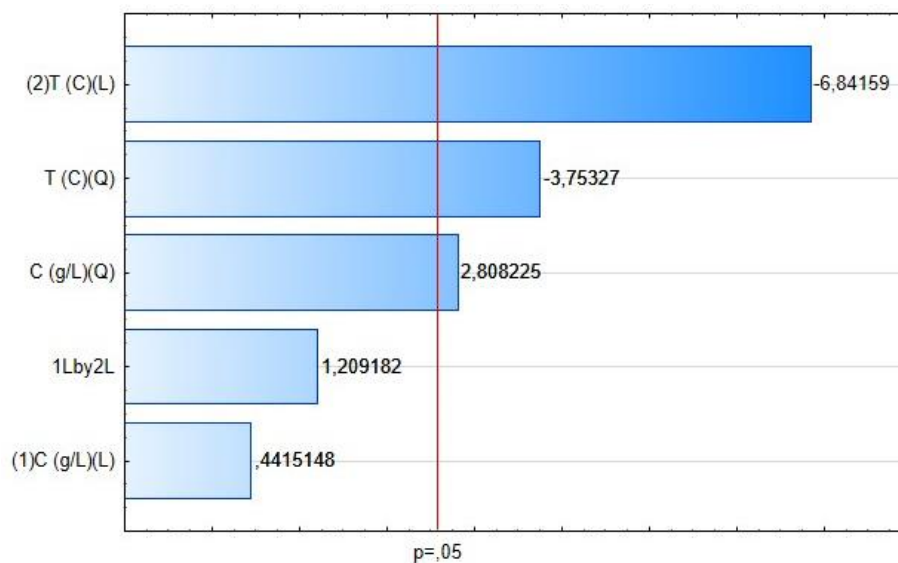
Ensaio	Variáveis		Concentração de AGE (mg/L)	Concentração de AGE previsto (mg/L)
	C (g/L)	T (°C)		
<b>1</b>	<b>-1</b>	<b>-1</b>	<b>448,20</b>	<b>414,33</b>
2	-1	1	313,34	301,57
3	1	-1	400,48	393,477
4	1	1	318,48	333,57
5	-1,41	0	397,62	415,75
6	1,41	0	435,62	426,89
7	0	-1,41	361,34	377,08
8	0	1,41	210,77	204,41
9	0	0	356,77	365,44
10	0	0	362,28	365,44
11	0	0	358,48	365,44

C = fonte de carbono (dextrose); T = temperatura de cultivo; AGE = Ácido gálico equivalente.

Observa-se que os resultados experimentais alcançados são próximos dos valores esperados, destacando-se o ensaio 1 que apresentou maior concentração de AGE (448,2000 mg/L), em quantidade superior ao previsto, nas condições de 10,50 g/L de fonte de carbono e temperatura de cultivo de 30,50 °C.

Foi possível identificar, por meio do Diagrama de Pareto gerado pelo DCCR e apresentado na Figura 26, que as funções linear e quadrática da temperatura de cultivo tiveram relevância estatística ( $p < 0,05$ ) com efeito negativo estimado de -6,84 e -3,75, respectivamente. Por outro lado, a função quadrática da fonte de carbono também apresentou significância estatística, com um efeito positivo estimado de 2,80.

Figura 26 - Diagrama de Pareto para quantidade de fenólicos totais obtido no delineamento (DCCR) a partir do cultivo do fungo endofítico *B. mamane* em diferentes condições para as variáveis selecionadas C e T.



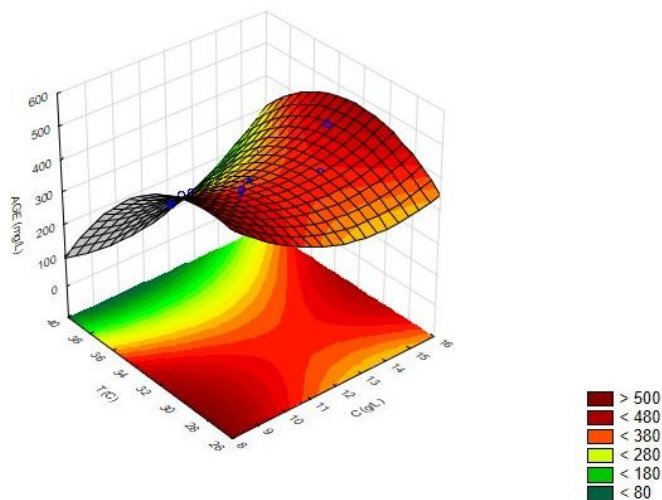
(1) C = fonte de carbono (dextrose); (2) T = temperatura de cultivo.

Por meio da avaliação da superfície de resposta das variáveis C e T (conforme Figura 27), foi observado que os valores adotados para a temperatura de cultivo foram determinantes para a produção de fenólicos totais, obtendo-se altas concentrações na faixa intermediária de 30 – 33°C. Apesar disso, para que o experimento se aproximasse ainda mais das condições ótimas de cultivo para obtenção dos pontos críticos, seria necessário realizar mais ensaios com valores mais baixos de temperatura.

A produção de compostos fenólicos por fungos endofíticos é altamente dependente da temperatura, sendo que cada espécie de fungo possui uma temperatura ideal para a síntese desses compostos. Nesse estudo, os resultados se assemelham aos obtidos por Costa (2016) onde temperaturas mais altas (33 °C) favoreceram a produção de metabólitos fenólicos pelo fungo *Phomopsis* sp. extraído da *Bauhinia variegata*.

Similarmente, Liyana-Pathirana e Shahidi (2005) reportaram descobertas que sugerem que a produção de compostos fenólicos é favorecida em temperaturas elevadas, o que aumenta a chance de produção de metabólitos fenólicos em maior quantidade.

Figura 27 - Superfície de resposta a partir da otimização (DCCR) para quantidade de fenólicos totais pelo *B. mamane* em função das variáveis T e C.



C = fonte de carbono (dextrose); T = temperatura de cultivo.

Comparado ao maior valor de concentração de fenólicos totais alcançado no planejamento fatorial fracionado, conforme demonstrado na Tabela 6 (24,87 mg/L), a otimização das condições de cultivo resultou em um aumento de cerca de 18 vezes na quantidade de fenólicos totais (448,20 mg/L), o que demonstra a relevância do uso do planejamento experimental como ferramenta para a otimização de bioprocessos.

### 4.3 Avaliação das Atividades Biológicas

A avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante foi realizada com o extrato fúngico obtido do ensaio 1 (Tabela 8) que apresentou maior concentração de ácido gálico equivalente (448,20 mg/L) a partir do estudo das condições de cultivo com o DCCR, nas condições de 10,50 g/L de fonte de carbono, 3,0 g/L de fonte de nitrogênio, temperatura de cultivo de 30,50 °C e pH 6,5.

#### 4.3.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

O extrato da amostra com maior concentração de compostos fenólicos foi submetido para determinação da CIM, que representa a menor quantidade de amostra necessária para a inibição do microrganismo testado, conforme segue na Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato rico em compostos fenólicos produzido pelo fungo endofítico *B. mamane* para diferentes bactérias.

Bactérias	CIM (mg/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,5
<i>Escherichia coli</i>	5,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,5

Segundo Holetz e colaboradores (2022), a ação antibacteriana segue os seguintes critérios: uma CIM > 10 mg/mL demonstra falta de atividade; uma CIM de 5 a 10 mg/mL indica baixa atividade; CIM de 1 a 5 mg/mL demonstra atividade moderada e uma CIM inferior a 1 mg/mL apresenta alta ação antimicrobiana. Dessa maneira, pode-se afirmar que o extrato do fungo endofítico *B. mamane* rico em compostos fenólicos apresentou atividade antibacteriana moderada frente à bactéria gram-positiva *S. aureus* e frente às bactérias gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Silva, Polonio e Bulla (2021) realizaram ensaio de atividade antimicrobiana para o extrato do fungo endofítico *Botryosphaeria fabicerciana* isolado de *Morus nigra*, encontrando resultados inibitórios contra cepas gram-positivas (CIM de 0,0156 mg/mL), porém não encontraram atividade contra cepas gram-negativas, diferente deste estudo onde os metabólitos de *B. mamane* apresentaram atividade contra cepas gram-positiva e gram-negativa.

Em estudo realizado por Machado (2009), o fungo *Botryosphaeria rhodina* isolado de *Caesalpinia echinata* não apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, porém foi capaz de inibir o crescimento dos fungos fitopatógenos *Phytoththora palmivora* e *Pythium debaryanum*. Diferente do *B. rhodina*, a amostra utilizada neste ensaio apresentou atividade antimicrobiana moderada contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, mas não foi testada frente a fungos.

Araújo (2018) realizou ensaios antimicrobianos utilizando metabólitos de fungos endofíticos isolados de *Mimosa tenuiflora* e *Poincianella pyramidalis* frente as cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*. O autor afirmou que os extratos avaliados não demonstraram ação inibitória. Extratos de um fungo endofítico isolado de *Croton cajucara* também não apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *P. aeruginosa* em ensaio realizado por Souza (2017).

As bactérias gram-negativas geralmente apresentam maior resistência aos antimicrobianos do que as gram-positivas, devido à existência de uma barreira de

permeabilidade na membrana externa que limita o acesso dos agentes antimicrobianos aos seus alvos dentro da célula bacteriana. Além disso, fatores como as condições de cultivo e gênero do endófito podem influenciar a produção de compostos bioativos com ação antimicrobiana (SOUZA, 2017).

A pesquisa sobre as atividades biológicas de fungos endofíticos do gênero *Botryosphaeria* ainda é escassa. No entanto, a comparação dos resultados com os estudos mencionados anteriormente indica que esse gênero é eficaz como agente antimicrobiano contra bactérias gram-positivas.

É importante salientar que encontrar agentes eficazes contra bactérias gram-negativas é uma tarefa desafiadora e a otimização das condições de cultivo *do B. mamane* para a produção de compostos fenólicos pode ter influenciado a produção de metabólitos que apresentam atividade contra *E. coli* e *P. aeruginosa*.

#### **4.3.2 Avaliação da Atividade Antioxidante**

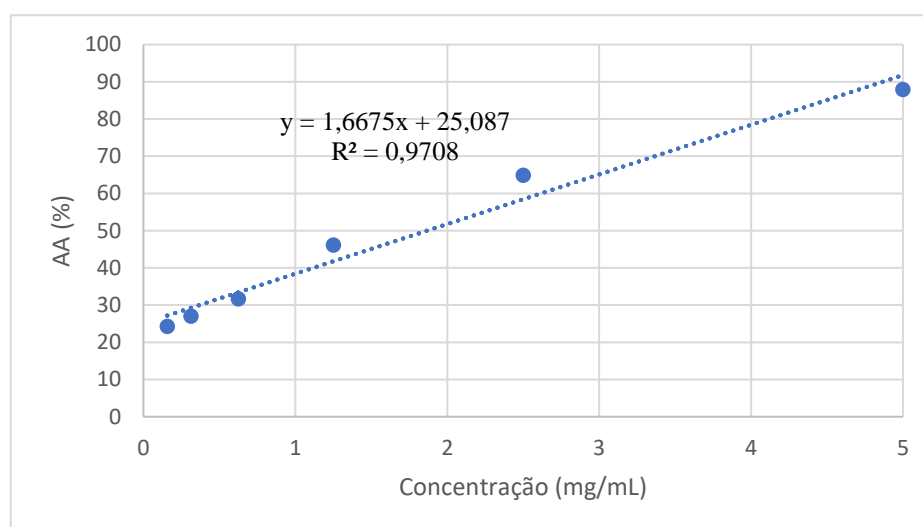
Foi realizado ensaio para verificar a atividade antioxidante do extrato que apresentou maior concentração de fenólicos. Após leitura em espectrofotômetro a 517 nm e utilizando a Equação 2, os dados de absorbância e porcentagem de sequestro dos radicais livres DPPH foram obtidos (conforme apresentado na Tabela 10) para elaboração do gráfico de regressão linear através das diluições sucessivas e obtenção da CE<sub>50</sub>, ilustrado na Figura 28.

Tabela 10 - Resultados de absorvância e porcentagem de sequestro de radicais livres DPPH do extrato rico em compostos fenólicos, obtido após otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *B. mamane*.

Concentração (mg/mL)	Absorvância (517 nm)	AA (%)
0,15625	0,2113	24,25
0,3125	0,2037	27,00
0,625	0,1907	31,66
1,25	0,1537	44,92
2,5	0,0980	64,87
5,0	0,0337	87,93

AA (%) = Porcentagem de sequestro dos radicais livres DPPH.

Figura 28 - Gráfico de regressão linear do percentual de atividade antioxidante do extrato rico em compostos fenólicos produzido pelo fungo endofítico *B. mamane*.



AA (%) = Porcentagem de sequestro dos radicais livres DPPH.

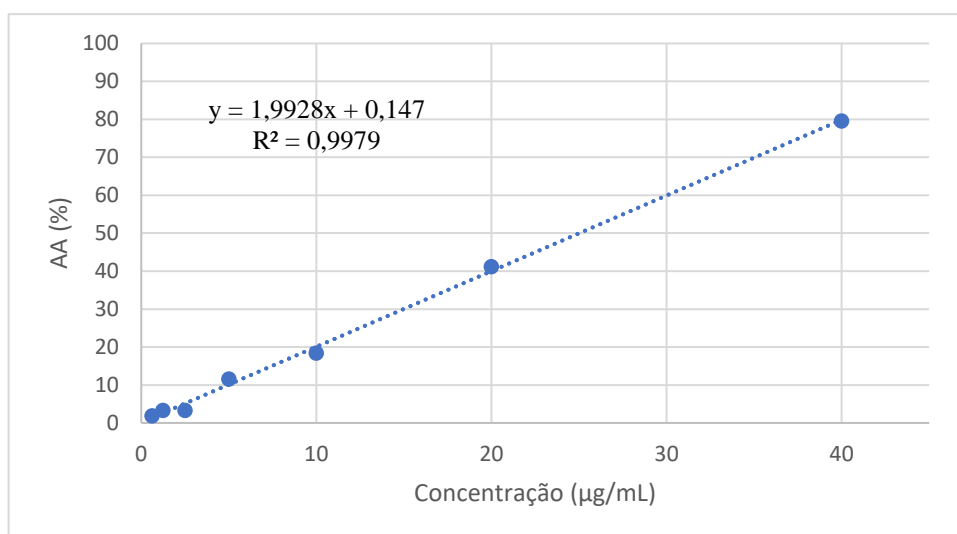
Para construção da curva de regressão linear (Figura 29) e obtenção da CE50 do padrão quercetina, utilizaram-se os dados apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados de absorvância e porcentagem de sequestro de radicais livres DPPH para o padrão antioxidante quercetina.

Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorvância ( $\mu\text{g/mL}$ )	AA (%)
0,625	0,543	1,87
1,25	0,535	3,31
2,5	0,535	3,31
5	0,490	11,55
10	0,452	18,41
20	0,326	41,16
40	0,113	79,60

AA (%) = Porcentagem de sequestro dos radicais livres DPPH.

Figura 29 - Gráfico de regressão linear do percentual de atividade antioxidante obtido através de diluições sucessivas do padrão quercetina.



AA (%) = Porcentagem de sequestro dos radicais livres DPPH.

Através da equação gerada pelos gráficos de regressão linear foi possível encontrar a concentração eficiente para o sequestro de 50% dos radicais livres DPPH. Substituindo o valor de y para 50%, tem-se que a  $CE_{50}$  é de 14,94 mg/mL para o extrato de *B. mamane* e de 0,025 mg/mL para a quercetina.

Observa-se que o extrato fúngico apresenta capacidade de sequestro dos radicais DPPH e, levando em conta a alta concentração de ácido gálico equivalente da amostra, é possível que a atividade antioxidante identificada esteja associada à presença de

compostos fenólicos, tendo em vista a ampla discussão na literatura acerca da atividade antioxidante de moléculas fenólicas (ALVES, 2020).

Vários estudos têm demonstrado o potencial dos fungos endofíticos como fonte de substâncias antioxidantes. Gracioso (2019) analisou o potencial antioxidante de fungos isolados a partir da mandioca, onde o microrganismo identificado como *Cladosporium sp.* produziu moléculas com atividade antioxidante de 84,88%, o que se aproxima ao encontrado neste ensaio, tendo em vista que o extrato metabólico produzido por *B. mamane* a 5,0 mg/mL capturou 87,93% dos radicais DPPH.

Em sua pesquisa sobre a atividade antioxidante do *Botryosphaeria dothidea* isolado da Mata Atlântica, Druzian (2016) descobriu um grande potencial de inibição dos radicais DPPH e hidroxil. Através da otimização das condições de cultivo, foi possível obter uma inibição de 95,35% e 89,2% para os radicais mencionados, respectivamente. Esses valores são semelhantes aos encontrados neste estudo, o que sugere que o gênero *Botryosphaeria* tem grande aptidão para a produção de metabólitos antioxidantes quando cultivado em condições adequadas, sendo um achado de grande relevância para desenvolvimento de novos antioxidantes naturais com potencial aplicações em diversas áreas industriais.

## 5 CONCLUSÕES

A partir dos testes realizados, foi possível concluir que o pH é o fator mais influente na obtenção de extratos ricos em compostos fenólicos dentre as variáveis testadas durante o cultivo de *B. mamane*. Além disso, verificou-se que, com pH fixo em 6,5 e fonte de nitrogênio de 3,0 g/L, a temperatura de cultivo em faixas mais altas é crucial para a produção de compostos fenólicos em maior concentração.

Ao otimizar as condições de cultivo, selecionando as variáveis carbono e temperatura com valores mais altos, observou-se um grande impacto no rendimento do extrato fúngico, sendo possível alcançar uma condição ótima de cultivo com 12,12 g/L de fonte de carbono e 33,93°C.

Os ensaios de atividade biológica demonstraram que o extrato de *B. mamane* apresenta ação antimicrobiana frente às bactérias testadas, e que a otimização das condições de cultivo fúngico pode ter favorecido sua atividade contra *E. coli* e *P. aeruginosa*. Ademais, o estudo da atividade antioxidante evidenciou que o extrato rico em compostos fenólicos foi capaz de sequestrar o radical livre DPPH, o que o torna um agente antioxidante promissor para futuros estudos.

Assim, os resultados deste estudo demonstram que foi possível otimizar as condições de cultivo do endofítico *Botryosphaeria mamane* possibilitando a seleção das variáveis que favoreceram a obtenção de maior quantidade de extrato fúngico rico em compostos fenólicos.

## 6 PERSPECTIVAS

O presente trabalho tem como perspectivas:

- ✓ Realizar o cultivo do *B. mamane* adotando os pontos críticos obtidos no DCCR para validar a maximização do rendimento através das condições ótimas;
- ✓ Para a otimização de compostos fenólicos, incluir ensaios com menores concentrações de carbono e temperatura, visando encontrar o ponto crítico contendo as condições ótimas;
- ✓ Realizar ensaios de atividade antimicrobiana com leveduras e fungos filamentosos, uma vez que Machado (2009) encontrou inibição frente a fungos fitopatogênicos utilizando os metabólitos de *Botryosphaeria rhodina*;
- ✓ Investigar o potencial do *B. mamane* frente a outras bactérias patogênicas;
- ✓ Realizar ensaios de atividade biológica para os outros extratos obtidos a partir do cultivo do fungo em outras condições, de maneira a verificar se a concentração de ácido gálico equivalente produzida favorece melhores resultados de CIM e de CE50.

## REFERÊNCIAS

- AGOUR, M.A.; HAMED, A.A.; GHAREEB, M.A.; ABDEL-HAMID, E.A.; IBRAHIM, M.K. Bioactive secondary metabolites from marine *Actinomyces* sp. AW6 with an evaluation of ADME-related physicochemical properties. **Arch Microbiol**, v. 204, n. 8, 2022.
- ALARCÓN-FLORES, M.I.; ROMERO-GONZÁLEZ, R.; VIDAL, J.L.M.; FRENICH, A.G. Multiclass determination of phytochemicals in vegetables and fruits by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 141, p. 1120-1129, 2013.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, 2010.
- ALVES, D. R.; SILVA, W.M.; SANTOS, D.L.; FREIRE, F.C.; VASCONCELOS, F.R.; MORAIS, S.M. Antioxidant, anticolinesterasic and cytotoxic activities of endophytic fungus metabolites. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 3684-73691, 2020.
- ALVES, M. J.; FERREIRA, I.C.; FROUFE, H..J.C.; ABREU, R.M.V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, 2013.
- ALY, A.H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Divers**, v. 41, n. 1-16, 2010.
- AMID, A. Observation of antioxidant activity of leaves, callus and suspension culture of *Justicia gendarusa*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 81, 2013.
- ANDRADE, L. K. Avaliação in vitro da atividade citotóxica e antioxidante de extratos de fungos isolados de esponjas marinhas. Vitória de Santo Antão. 2017.
- ARAÚJO, J. F. O. Antibacterial, cytotoxic and healing activity in vitro of endophytic fungi isolated from medicinal plants: *Mimosa Tenuiflora* (Willd.) Poir., *Poincianella Pyramidalis Tul.* and *Acrocomia Aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. **Programa de Pós-Graduação em Enfermagem**, Universidade Federal de Alagoas., 2018.
- BACO, S. B. Design of experiments used in computer trials: A supportive method for product development. **Pesquisa Operacional**, v. 39, n. 2, p. 295-316, 2019.
- BANERJEE, C.; DUBEY, K.K.; SHUKLA, P. Metabolic Engineering of Microalgal Based Biofuel Production: Prospects and Challenges. **Frontiers Microbiology**, v. 7, n. 432, 2016.
- BANG, K.H.; KIM, Y.K.; MIN, B.S.; NA, M.K.; RHEE, Y.H.; LEE, J.P. Antifungal activity of magnolol and honokiol. **Arch Pharm Res**, v. 23, p. 46-49, 2000.
- BARBI, R. C. Extração e quantificação de compostos fenólicos e antioxidantes da chia (*Salvia hispânica*) usando diferentes concentrações de solventes. Campos Mourão. 2016.

- BARRON, D.; IBAHIM, R. K. Isoprenylated flavonoids—a survey. **Journal Article: Phytochemistry**, v. 43, p. 921-982, 1996.
- BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Porto Alegre: **Bookman**, v. 4, 2010.
- BENETTI, C. Optimization of Phenolic Compounds Extraction in an Apple Pomace Flour Enriched With *Agaricus brasiliensis*. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 15, n. 2, 2013.
- BHALODIA, N. R.; SHUKLA, V. J. Antibacterial and antifungal activities from leaf extracts of *Cassia fistula* l.: An ethnomedicinal plant. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 2, p. 104-109, 2011.
- BOSE, P.; GOWRIE, S. U.; CHATHURDEVI, G. Optimization of culture conditions of growth and production of bioactive metabolites by endophytic fungus – *Aspergillus tamarii*. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 2, p. 469-478, 2019.
- BRAGA, F. Brazilian traditional medicine: Historical basis, features and potentialities for pharmaceutical development., Belo Horizonte, p. 104-170., 2020. **Faculty of Pharmacy**, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Campus Pampulha.
- CARROL, G. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials., Cambridge: **Cambridge University Press**, p. 205-222, 1986.
- CASTELLANI, A. The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **Oxford**, v. 42, n. 3, p.225-226., 1939.
- CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 95, . p. 47-59, 2012.
- CHAPMAN, E.; PERKIN, A. G.; ROBINSON, R. The colouring matters of Carajura. **Journal of the Chemical Society**, London, p. 3015–3041, 1927.
- CHATTERJEE, S.; GHOSH, S.; MANDAL, N.C. Potential of an endophytic fungus *Alternaria tenuissima* PE2 isolated from *Psidium guajava* L. for the production of bioactive compounds. **South African Journal of Botany**, v. 150, 658-670, 2022.
- CHAVES NETO, J.R.; ANDRADE, M.G.; SCHUNEMANN, A.P.; SILVA, S.M. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em frutos de cajá-manga. **Digital Library of Journals**, v. 36, n. 1, 2018.
- CHEN, L.; TENG, H.; XIE, Z.; CAO, H.; CHEANG, W.S.; GEORGIEV, M.; SKALICKA-WONIAK, K.; XIAO, J. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure–activity relationship. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 58, n. 4, 2018.
- CHITHRA, S.; JASIM, B.; SACHIDANANDAN, P.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E. K. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloesporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 534-540, 2014.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4. ed. [S.l.]: **M27**, 2017.

CORY, H.; PASSARELLI, S.; SZETO, J.; TAMEZ, M.; MATTEI, J. The role of polyphenols in human health and food systems: A mini-review. **Sec Food Chemistry**, v. 5, n. 87, 2018.

COSTA, K. O. Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Phomopsis sp.* Extraído da *Bauhinia variegata* para produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante. Brasília. 2016.

CUNHA, A.L.; MOURA, K.L.; BARBOSA, J.C., SANTOS, A.F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, v. 1, n. 2, p. 175-181, 2016.

CUNICO, M. W. M. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Digital Library of Journals**, v. 9, n. 1, 2008.

CUSHNIE, T. P. T., LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int J Antimicrob Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DALBOSCO, M.; ANDRADE, C.; DUARTE, V. *Botryosphaeria dothidea* on *Dragon Fruit* (Pitaya). **Agrônômica: Laboratório Diagnóstico Fitossanitário**, 2019.

DELBONE, C. A. C.; LANDO, R. L. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais, Jacarezinho, n. 10°, 2010.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 Years of progress. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 62, p. 5-16, 2009.

DRUZIAN, S. P. Produção de metabólitos antioxidantes a partir da fermentação submersa de fungos isolados do biomas pampa e mata atlântica. **Pós-graduação em Engenharia Química**, UFSM., Santa Maria, 2016.

ESTEVINHO, L. M. et al. Biological activities of endophytic fungi isolated from *Annona muricata* Linnaeus: a systematic review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, 2022.

FAZOLIN, M. et al. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. D. C., *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebriomolitos* L. **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 1, p. 113-120, 2007.

FORNI, C.; FACCHIANO, F.; BARTOLI, M.; PIERETTI, S.; FACCHIANO, A.; D'ARCANGELO, D.; JADEJA, R. N. Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases. **Biomed Res Int**, 2019.

FRANCO, M. A. T. Influência da temperatura, salinidade e pH no crescimento de fungos da caatinga com potencial para promoção de crescimento vegetal. **Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas)** – Centro de Ciências., Fortaleza, 2022.

- FUCK, W. F. Seleção de Biocorantes de Fungos Filamentosos para Tingimento de Couro e Cultivo Submerso de *M. purpureus* com Substrato de Pelo Hidrolisado. Porto Alegre. 2018.
- GIL-MARTIN, E. Influence of the extraction method on the recovery of bioactive phenolic compounds from food industry by-products. **Food Chemistry**, v. 378, 2022.
- GRACIOSO, P. Produção de compostos antioxidantes por fungos endofíticos a partir da mandioca. **IX Simpósio de Iniciação Científica, Didática e de Ações Sociais da FEI.**, São Bernardo do Campo, 2019.
- GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 509-526, 2006.
- GURGEL, R.S.; RODRIGUES, J.C.; MATIAS, R.R.; BATISTA, B.N.; OLIVEIRA, R.L.; ALBUQUERQUE, P.M. Biological activity and production of metabolites from Amazon endophytic fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 14, n. 2, 2020.
- GUTTERRES, M.; FUCK, W. F.; JESUS, M. A. Desenvolvimento de biocorantes aplicados na produção de couro. Rio Grande do Sul. 2011.
- HAO, D. C.; XIAO, P. G. Pharmaceutical resource discovery from traditional medicinal plants: Pharmacophylogeny and pharmacophylogenomics. **Chinese Herbal Medicines**, v. 12, p. 104-117, 2020.
- HAYES, A. J.; MARKOVIC, B. Toxicity of Australian essential oil *Backhousia citrodora* (Lemon myrtle). Part 1. *Antimicrobila activity and in vitro cytotoxicity*. **Food Chem Toxicol**, v. 40, p. 535-543, 2002.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J Nutr Biochem**, p. 572-584, 2002.
- HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.G.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P.D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.
- HORAK, I. Microbial metabolomics: essential definitions and the importance of cultivation conditions for utilizing *Bacillus* species as bionematicides., **J Appl Microbiol**, v. 127, n. 2, p. 326-343, 2019.
- HURTADO-FERNÁNDEZ, E.; GÓMEZ-ROMERO, M.; CARRASCO-PANCORBO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. **J Pharm Biomed Anal.**, v. 53, n. 15, p. 1130-1160, 2010.
- INPA — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2012. Disponível em: <<https://pesquisa.inpa.gov.br/copos/index.php/projetos-pesquisa>>. Acesso em: 31 Julho 2022.

JORGE, A. J. The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. **Asian pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 6, 2013.

JORGE, M.P.; MADJAROF, C.; RUIZ, A.L.T.; FERNADES, A.T.; RODRIGUES, R.A. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract., **Fio Cruz**, v. 118, p. 361–366, 2008.

KUMAR, S. N. Molecular characterization of forest soil based *Paenibacillus elgii* and optimization of various culture conditions for its improved antimicrobial activity. **Front Microbiol.**, v. 6, 2015.

LAWAL, B.; SHITTU, O.K.; KABIRU, A.Y.; JIGAM, A.A.; UMAR, M.B.; BERINYUY, E.B.; ALOZIEUWA, B.U. Potential antimalaris from African natural products: a review. **J Intercult Ethnopharmacol**, v. 4, p. 318-343., 2015.

LEITE, V. L. Otimização da produção de ácido jasmônico pela linhagem kifn 3.1 de *Botryosphaeria rhodina*. **Mestrado em Biotecnologia** - UNAERP., Ribeirão Preto, 2016. 53-87.

LI, J.Y.; HARPER, J.K.; GRANT, D.M.; TOMBE, B.O.; BASHYAL, B.; HESS, W.M.; STROBEL, G.A. Ambuic Acid, a Highly Functionalized Cyclohexenone with Antifungal Activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. **Phytochem**, p. 463-468, 2001.

LIMA JUNIOR, D. Amylases of the endophytic fungus *Paecilomyces* sp SF 021: studies of production, characterization and application in starch hydrolysis. **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, Araraquara, 2020.

LIMA, C. Extração de compostos antioxidantes da decocção do rizoma de gengibre, influência do tempo de preparo e do material vegetal. **Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão**. Cruz Alta, 2015.

LIU, R. H. Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. **J Food Sci**, v. 78 - S1., p. A18-A25, 2013.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food chemistry**, v. 93, n. 1, p. 47-56. 2005.

LOURENÇO, S. C.; MARTINS, M. M.; ALVES, V. D. Antioxidants of natural plant origins: from sources to food industry applications. **Molecules**, v. 24, p. 1-25., 2019.

LU, H.; ZOU, W.C.; MENG, J.C.; HU, J.; TAN, R.X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**, p. 67-73. 2000.

MA, Y.M.; LI, Y.; LIU, J.Y.; SONG, Y.C.; TAN, R.X. Anti-Helicobacter pylori metabolites from *Rhizoctonia* sp. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. **Fitoterapia**, 2004.

MACHADO, M. A. B. L. Isolation, characterization and evaluation of the antimicrobial activity of endophytic fungi of *Caesalpinia echinata* Lam. (*Leguminosae caesalpinioideae*). Doutorado em Química e Biotecnologia, **Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia**, Universidade Federal de Alagoas., 2009.

MAGALHÃES, A. S. M. Estudo do efeito protector da espécie *Cydonia oblonga* Miller na danificação oxidativa em eritrócitos humanos. Porto, 2009.

MAMED, A. C. P. Atividade biológica do fungo *Pisolithus*. Florianópolis. 2015.

MASUDA, T.Y.; INABA, T.; MAEKAWA, Y.; TAKEDA, H.; YAMAGUCHI, N.K. Simple detection method of powerful antiradical compounds in the raw extract of plants and its application for the identification of antiradical plant constituents. **J Agric Food Chem**, v. 51, p. 1831-1838, 2003.

MELLO, J. Plants in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol*, v. 2, p. 49-55., 1980. ISSN 0378-8741.

MICHEL, A.F.; MELO, M.M.; CAMPOS, P.P.; OLIVEIRA, M.S.; OLIVEIRA, F.A.; CASSALI, G.D. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 165, p. 29-38, 2015.

MONFARDINI, J. D. Diterpenos tetranorlabdanos e isocumarinas produzidos por *Botryosphaeria parva*, um fungo endofítico em *Eugenia jambolana* Lam. (Myrtaceae). [S.l.]. 2016.

MORAIS, J. F.; YOSHIMOTO, M.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Bioprospecção de micro-organismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **Uningá Review**, v. 17, n. 1, p. 27-34., 2014.

MORCEAU, F.; CHATEAUVIEUX, S.; ORSINI, M.; TRÉCUL, A.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Natural compounds and pharmaceuticals reprogram leukemia cell differentiation pathways. **Biotechnol Adv**, v. 33, n. 6, p. 785-797., 2015.

MOREIRA, D. M., Otimização das condições de cultivo submerso DO FUNGO *Lasiodiplodia sp.* para produção de **extratos com atividade antimicrobiana**. **Mestrado em Biotecnologia** - Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2021.

MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 2231-2234, 1987.

NARENDERAN, S. T.; MEYYANATHAN, S. N.; KARRI, V. V. S. R. Experimental design in pesticide extraction methods: A review., Tamil Nadu, 289, 2019.

NERI, P. M. Extração de compostos fenólicos de *Maytenus rigida* mart. Planejamento fatorial e atividade antimicrobiana. Recife. 2016.

NEVES, P. D. Importância dos compostos fenólicos dos frutos na promoção da saúde. Fernando Pessoa. 2015.

NOMURA, T. Biological activities of phenolic constituents of mulberry tree and related plants. Springer, Verlag, **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe**, v. 33, 1988.

OLIVEIRA, K. M.; BOAS, E. V.; BONETT, L. P.; JUNIOR, E. L. C.; WENZEL, J. B. Isolamento e atividade antibacteriana de fungos endofíticos de *Piper glabratum* Kunth. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, v. 19, n. 1, p. 3-9., 2015.

ORAK, H. H. Total antioxidant activities, phenolics, anthocyanins, polyphenoloxidase activities of selected red grape cultivars and their correlations. **Scientia Horticulturae**, v. 111, p. 235-241., 2007.

PAGLIARULO, C.; DE VITO, V.; PICARIELLO, G.; COLICCHIO, R.; PASTORE, G.; SALVATORE, P.; VOLPE, M. G. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Food Chem**, v. 190, p. 824-831, 2016.

PARK, J.; CHOI, G.; LEE, S.; LEE, H.; KIM, K.; JUNG, H.; JANG, K.; CHO, K.; KIM, J. Griseofulvin from *Xylaria* sp. Strain F0010, an Endophytic Fungus of *Abies holophylla* and its Antifungal Activity Against Plant Pathogenic Fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, v. 1, p. 112-117, 2005.

PAULA, J. T.; PAVIANI, L. C.; FOGLIO, M. A.; SOUSA, I. M. O.; CABRAL, F. A. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>/ethanol/water mixtures as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 81, p. 33-41, 2013.

PEIXOTO, N. P.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biotecnologia**, v. 29, p. 62-76., 2002.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves., New York. **Microbial Ecology of Leaves**, p. 179-197., 1991.

RAI, M. Fungal growth promotor endophytes: A pragmatic approach towards sustainable food and agriculture., Campinas, **Symbiosis**, v.62, n. 2, 2014.

RAMOS, H. P. Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Arthrimum state* of *Apiospora montagnei* Sacc. para produção de metabólitos secundários com atividades biológicas. São Paulo. 2008.

RAVINDRAN, C.; NAVEENAN, T.; VARATHARAJAN, G.R.; RAJASABAPATHY, R.; MEENA, R.M. Antioxidant in mangroveplants and endophytic fungal associations. **Botanica Marina**, v. 55, p. 269-279., 2012.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Experimental design and process optimization. New York, **Engineering & Technology, Food Science & Technology**, p. 1-304. 2014.

RUFINO, J. L. Bioprospecção de Fungos Filamentosos Amazônicos e Prospecção Química como estratégia sustentável para descoberta de novos fármacos na Amazônia. Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Itacoatiara. 2022.

SANTOKE, H.; COOPER, W. J. Environmental photochemical fate of selected pharmaceutical compounds in natural and reconstituted Suwannee River water: Role of reactive species in indirect photolysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 580, p. 626-631, 2017.

- SCHNARR, L.; SEGATTO, M.L.; OLSSON, O.; ZUIN, V.G.; KUMMERER, K. Flavonoids as biopesticides – Systematic assessment of sources, structures, activities and environmental fate. **Science of The Total Environment**, v. 824, 2022.
- SCHWARZ, M.; KOPCKE, B.; WEBER, R. W. S.; STERNER, O.; ANKE, H. 3-Hydroxypropionic acid as a nematocidal principle in endophytic fungi. **Phytochemistry**, p. 2239–2245, 2004.
- SHARMA, D.; PRAMANIK, A.; AGRAWAL, P. K. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D.Don. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 2016
- SHEN, Y.; FATEMEH, T.; TANG, L.; CAI, Z. Quantitative metabolic network profiling of *Escherichia coli*: an overview of analytical methods for measurement of intracellular metabolites. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 75, p. 141-150., 2016.
- SILVA, A.A.; POLONIO, J.C.; BULLA, A.M. Antimicrobial and antioxidant activities of secondary metabolites from endophytic fungus *Botryosphaeria fabicerciana* (MGN23-3) associated to *Morus nigra* L. **Natural Product Research**, v. 32, n. 12, p. 3158-3162., 2021.
- SILVA, A.D.; KOWALSKI, L.; PAGNO, A.R.; PIANA, M. Antimicrobial activity of flavonoids: a literature review. **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 4, n. 1, p. 51-65., 2020.
- SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012–1018, 2007.
- SILVA, E. O. Otimização das condições de cultivo e investigação das atividades citotóxicas e antimicrobiana de metabólitos secundários do fungo endofítico *Drechslera ravenelii*., Ribeirão Preto., 2010.
- SILVA, G.; ARAÚJO, A.R.; TELESA, H.L.; TREVISANA, H.C.; BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; PFENNING, L.H.; EBERLIND, M.C.; HADDAD, R.; COSTA-NETO, C.M. New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1463-1466, 2005.
- SILVA, G. F. A. Influência dos macronutrientes no crescimento de *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em cultivo submerso. São José do Rio Preto. 2017.
- SILVA, I. P. Fungos endofíticos: Fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 3888-3905., 2014.
- SILVA, M.L.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products., Londrina, **Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-681, 2010.
- SILVA, R. V. Application of factorial design for chemical and biological study of *Hypoxylon monticulosum*, an endophytic fungus of the seaweed *Acanthophora spicifera*. **Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA)**., Maranhão, 2022.

SILVA, S. G.; BIESK, I. G. A importância medicinal dos flavonóides na saúde humana, com ênfase na espécie *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl., Mato Grosso, **Revista Saúde Viva Multidisciplinar da AJES**, v. 1, n. 1, 2018.

SIMONELLI, G. Uso das técnicas de planejamento experimental e otimização de processos na nitreção a plasma em gaiola catódica do aço ferramenta aisi d2. Vitória. 2013.

SINGH, V. Strategies for fermentation medium optimization: An in-depth review., Lucknow, 7, 2017. 2087.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American journal of enology and viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158. 1965.

SIRAICHI, J. T. et al. Antioxidant capacity of the leaf extract obtained from *Arrabidaea chica* cultivated in Southern Brazil. *PLoS One*, v. 8, 2013.

SKALICKA-WOŹNIAK, K., Implication of coumarins towards central nervous system disorders. *Pharmacol Res*, v. 103, 2016.

SOHN, H.Y.; SON, K.H.; KWON, C.S.; KWON, G.S.; KANG, S.S. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. **Phytomedicine**, v. 11, p. 666–672, 2004.

SONG, Y.C.; HUANG, W.Y.; SUN, C.; WANG, F.W.; TAN, R.X. Characterization of graphisactone A as the antioxidant and free radicalscavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFBE001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, p. 506–509, 2005.

SOUZA, A. A. M. Estudo de quantificação dos compostos fenólicos, avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana da casca do caule do *Croton cajucara* benth.. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais., 2017.

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R.C.; FELBER, A.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. Secondary Metabolites Produced by Endophytic Fungi of Pharmaceutical Interest. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

SPIPELLER, P. Chemical ecology of fungi. **Natural Product Reports**, v. 32, p. 971-993, 2015.

STEFANELLO, S. T. Avaliação da capacidade antioxidante in vitro de novos compostos mono e disseleneto., Santa Maria, 2013.

STIERLE, A. A.; STROBEL, G. A.; STIERLE, D. B. Investigation of fungi associated with the pacific yew tree *taxus-brevifolia*. **J. Nat Prod**, v. 205:8., 1993.

TABARAIE, B. Comparative evaluation of cephalosporin-c production in solid state fermentation and submerged liquid culture., v. 9, n. 5, p. 83-94. 2020.

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; SCHILCHER, H. Electron Microscopic and Microcalorimetric Investigations of the Possible Mechanism of the Antibacterial Action

of a Defined Propolis Provenance. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 60, n. 3, p. 222-227, 1994.

TARTARINE, N. Endophytic fungal cellulases: study of the production by submerged fermentation and application in saccharification of sugarcane straw. **Programa de pós-graduação em biotecnologia** - UNESP., Araraquara, 2018.

TULADHAR, P.; SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Role of phenols and polyphenols in plant defense response to biotic and abiotic stresses. **Biocontrol Agents and Secondary Metabolites**, p. 419-441., 2021.

VALENTE, I. L. Otimização da produção e extração de metabólitos com atividade antioxidante a partir do fungo *Botryosphaeria dothidea* isolado do bioma pampa. Santa Maria. 2017.

VANDENBERGHE, L. P. S. Production and application of citric acid. In: Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products., Amsterdam, 2017.

VANDERMOLEN, K. M.; RAJA, H. A.; EL-ELIMAT, T.; OBERLIES, N. H. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, v. 3, n. 1, 2013. 1-7.

VERMA, A.; JOHRI, B. N.; PRAKASH, A. Antagonistic evaluation of bioactive metabolite from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* KF671231. **Journal of Mycology**, v. 5, p. 1-5, 2014.

WEBER, D.; STERNER, O.; ANKE, T.; GORZALCZANCY, S.; MARTINO, V.; ACEVEDO, C. Phomol, a New Antiinflammatory Metabolite from an Endophyte of the Medicinal Plant *Erythrina crista-galli*. **The Journal of Antibiotics**, p. 559-563, 2004.

WU, Z. Antioxidative phenolic compounds from a marine-derived fungus. **Tetrahedron**, v. 72, n.1, p. 50-57, 2016.

XIAO, J.; ZHANG, Q.; GAO, Y.; TANG, J.; ZHANG, A.; GAO, J. Secondary Metabolites from the Endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and Their Antifunga, Antibacterial, Antioxidante and Cytotoxic Activities. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 62, p. 3584-3590, 2014.

YAGI, A.; FUKUNAGA, M.; OKUZAKO, N.; MIFUCHI, I.; KAWAMOTO, F. Antifungal substances from *Sophora flavescens*. **Natural Products with Antiviral, Anti-inflammatory and Immunomodulatory Activies**, v. 43, p. 343-347, 1989.

YUN, T. Y. Optimization of fermentation conditions through response surface methodology for enhanced antibacterial metabolite production by *Streptomyces* sp.1-14 from cassava rhizosphere., Haikou, **PLoS One**, v. 13, n. 11, 2018.

ZANCHETTA, A. Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido e submersa utilizando biomassa lignocelulósica. São José do Rio Preto. 2012.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

ZHANG, X. Y.; LI, X.; HAN, M. M.; CAI, Z. Y.; GAO, X.; PANG, M. X.; QI, J. H.; WANG, F. Separating and Purifying of Endophytic Fungi from Ginkgo Biloba and Screening of Flavonoid-Producing Strains. **OP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.**, v. 371, p. 2-5., 2019.

ZHAO, W.Y.; YI, J.; CHANG, Y.; SUN, C.; MA, X. Recent studies on terpenoids in *Aspergillus* fungi: Chemical diversity, biosynthesis, and bioactivity. **Phytochemistry**, v. 193, 2022.

ZHU, X. Penochalasin K, a new unusual chaetoglobosin from the mangrove endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* V11 and its effective semi-synthesis., Guangzhou, **Fitoterapia**, p. 23-28, 2017.

**APÊNDICE**

APÊNDICE A - Valores de concentração e absorvância das amostras padrão para construção da curva de calibração com ácido gálico.

Padrão	Concentração (mg/L)	Absorvância
1	20	0,107
2	20	0,104
3	20	0,110
4	40	0,187
5	40	0,189
6	40	0,190
7	60	0,249
8	60	0,258
9	60	0,254
10	80	0,305
11	80	0,298
12	80	0,312
13	100	0,394
14	100	0,399
15	100	0,406