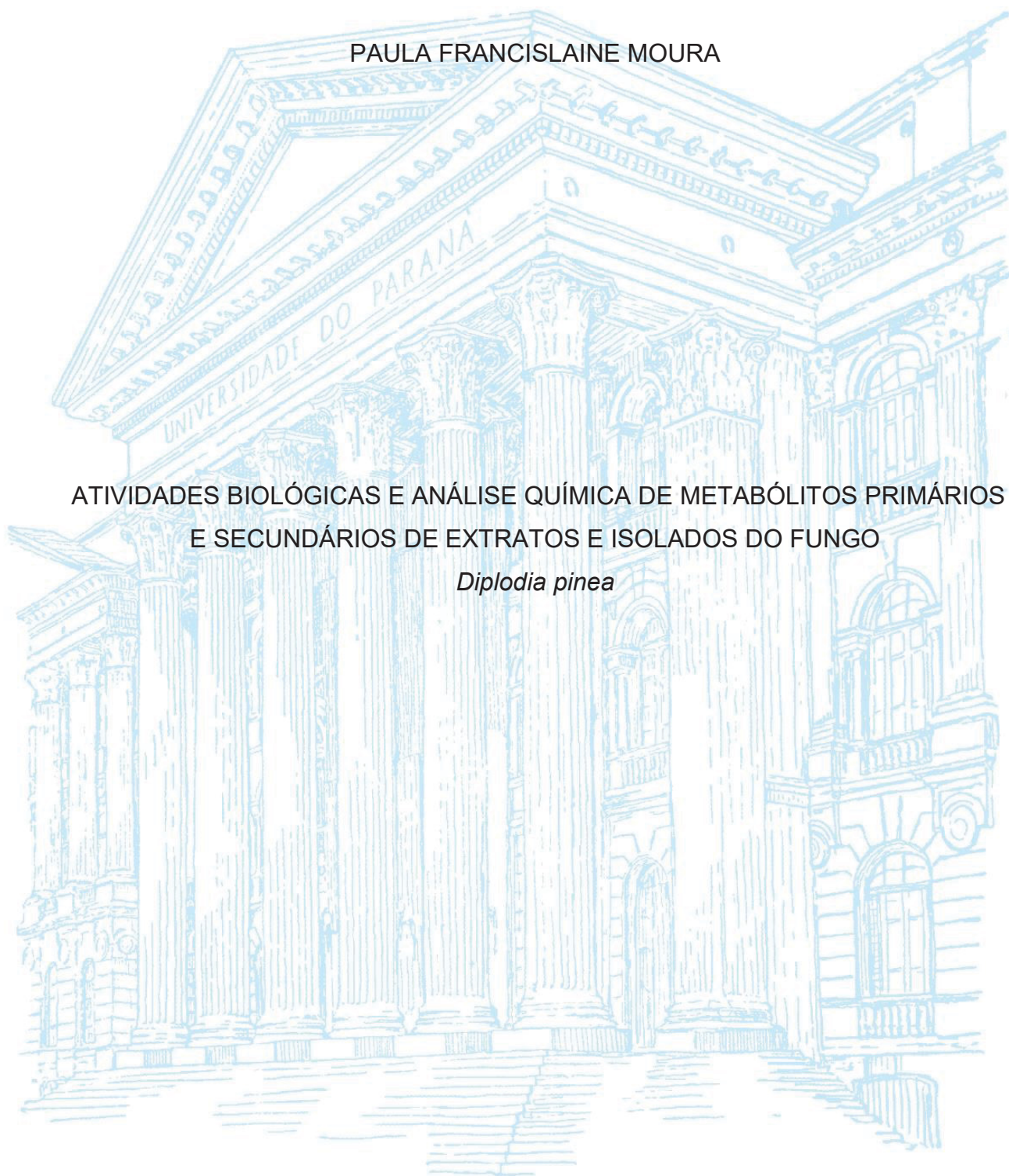


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA FRANCISLAINE MOURA

ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ANÁLISE QUÍMICA DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS
E SECUNDÁRIOS DE EXTRATOS E ISOLADOS DO FUNGO

Diplodia pinea



CURITIBA

2021

PAULA FRANCISLAINE MOURA

ATIVIDADES BIOLÓGICAS E ANÁLISE QUÍMICA DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS
E SECUNDÁRIOS DE EXTRATOS E ISOLADOS DO FUNGO

Diplodia pinea

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Marilis Dallarmi Miguel.
Coorientadores: Prof. Dr. Celso Garcia Auer.
Prof(a). Dr(a). Cristiane da Silva Paula de Oliveira.

CURITIBA

2021

Moura, Paula Francislaine

Atividades biológicas e análise química de metabólitos primários e secundários de extratos e isolados do fungo *Diplodiapinea*[recurso eletrônico] / Paula Francislaine Moura – Curitiba, 2021.

1 arquivo (117 p.): PDF

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2021.

Orientadora: Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Coorientadores: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

Profa. Dra. Cristiane da Silva Paula de Oliveira

1. Análise química. 2. Fungos. 3. Antioxidante. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Auer, Celso Garcia. III. Oliveira, Cristiane da Silva Paula de. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.1901

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PAULA FRANCISLAINE MOURA** intitulada: **Atividades biológicas e análise química de metabólitos primários e secundários de extratos e isolados do fungo *Diplodia pinea***, sob orientação da Profa. Dra. MARILIS DALLARMI MIGUEL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 02 de Dezembro de 2021.

Assinatura Eletrônica

02/12/2021 18:04:32.0

MARILIS DALLARMI MIGUEL

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

03/12/2021 10:50:01.0

JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

15/12/2021 17:37:24.0

CRISTIANE VIEIRA HELM

Avaliador Externo (EMBRAPA FLORESTAS)

Assinatura Eletrônica

03/12/2021 15:14:58.0

CAMILA FREITAS DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)

Assinatura Eletrônica

03/12/2021 09:38:16.0

DEISE PREHS MONTRUCCHIO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Aos amores da minha vida,
Meus pais Maria de Lourdes Moura e Hélio Moura.
Meu esposo, André de Freitas Nunes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido a vida e por me dar forças e perseverança em todos os momentos.

Aos meus pais, Maria de Lourdes Moura e Hélio Moura, os amores da minha vida, pelo apoio incondicional, por secar tantas vezes minhas lágrimas, por se anular para que eu pudesse realizar meus objetivos, não poupar esforços para me ver feliz e me amar tanto.

Ao meu marido, amigo, companheiro e meu grande amor, André Nunes, que esteve comigo em todos os momentos, me amparando e não me deixando desistir, reforçando a cada momento o quanto sou capaz de realizar e concretizar os meus sonhos.

À minha irmã Luanna Moura (*in memoriam*), anjo que passou pela minha vida e que mesmo tão pequenina me ensinou o significado do amor verdadeiro e fortaleza.

À minha irmã Angélica Ponce Moura de Barros e meus sobrinhos Vinícius e Eduardo, por trazerem alegria aos meus dias.

Ao meu querido tio Aristides Ponce, por ser uma das raras pessoas capazes de me fazer sorrir nos momentos mais difíceis, e por fazer parte da minha vida.

À Caroline Gribner, Ana Angélica Rigoni e Larissa Gatto, por serem meu amparo constante durante todo este doutorado. Graças a vocês cheguei até aqui. Agradeço por nunca terem me deixado só.

Aos queridos amigos Fernando César Betim, Katlin Suellen Rech e Camila Freitas de Oliveira, presentes que a pós-graduação me deu para toda a vida.

Aos queridos colegas do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais, por estarem presentes nesta caminhada.

À minha querida orientadora, Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel, a quem tenho profunda estima e que me acompanha desde a graduação, pela oportunidade, ensinamentos e confiança.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Celso Garcia Auer, pela grande oportunidade de formação e aprendizado, constante apoio e confiança em meu trabalho. Obrigada pela sua orientação.

À professora Dra. Cristiane da Silva Paula de Oliveira, minha coorientadora que sempre esteve disponível para me auxiliar e contribuir academicamente para o meu aprendizado.

À Professora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias, pela sua ajuda constante, sorrisos amáveis e conselhos acolhedores. Admiro a senhora profundamente.

Às Professoras Dra. Sandra Maria Warumby Zanin e Dra. Deise Prehs Montrucchio, pela amizade e participação na minha formação desde a Graduação, vocês são grandes exemplos e inspiração.

Ao querido Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel, pela amizade e ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

Aos Professores Dr. Ricardo Wagner, Dra. Beatriz Cristina Konopatzki Hirota, Dra. Maria Eugênia Balbi, a quem tenho muita admiração e estima.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Ciências Farmacêuticas, pela incrível oportunidade de formação.

À EMBRAPA Florestas, pela estrutura laboratorial, apoio e oportunidade.

A Capes, pelo auxílio financeiro, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho.

Aos técnicos Jair, Paulo Sergio Diniz, Maria da Graça e Mauricio, sempre dispostos a ajudar nos experimentos laboratoriais.

Aos Professores Drº Rilton Alves de Freitas e Drº Roberto Pontarolo, Coordenador e Vice Coordenador da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade e incentivo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR.

Ao Departamento de Química e Bioquímica, principalmente aos laboratórios de Cristalografia e Ressonância Magnética Nuclear, pelo apoio nas análises.

A todos que não foram citados, mas de alguma forma participaram positivamente para a realização deste grande sonho.

A todos vocês, sou imensamente grata.

“Deus ajuda quem ajuda a si mesmo.”
Madam C.J Walker

“Yibambe!”

RESUMO

As análises químicas de compostos extraídos de fontes naturais são de extrema importância no campo científico. Os produtos naturais são um amplo reservatório de substâncias com importante atividade farmacológica, como antitumoral, anti-inflamatória e antibiótica. O fungo *Diplodia pinea* é um fitopatógeno, causador de doenças em coníferas como o *Pinus* sp., de alta prevalência pelo mundo. O objetivo deste estudo foi pesquisar substâncias com potencial aplicabilidade na área humana e agrícola avaliando possíveis atividades biológicas de extratos do fungo. A produção de biomassa foi realizada em caldo de cultivo batata dextrose a 16 °C por sete dias, no escuro, sem agitação mecânica, visando a produção de metabólitos. Para as análises realizadas empregaram-se os extratos produzidos a partir de diferentes solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e etanol/água). Para pesquisa e identificação dos metabólitos primários e secundários, foram adotadas as técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Difração de Raios X, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e Espectrometria de Massas. Foi visualizada a presença de esteroides, triterpenos, compostos fenólicos e dos monossacarídeos glicose, arabinose, manose, galactose e xilose nas amostras. Os compostos, ácido palmítico, D-manitol e 1,3 alfa glucana foram caracterizados. Para avaliação da propriedade antioxidante, foram utilizadas as metodologias do DPPH, TBARS, FRAP, Fosfomolibdênio e Folin Ciocalteu. Foi observada alta propriedade antioxidante (acima de 50 mg EAG/g) dos extratos clorofórmio (61,8 mg EAG/g), acetato de etila do meio (70,8 mg EAG/g) e do micélio (119,21 mg EAG/g), bem como do extrato etanol/água (53,2 mg EAG/g) pela metodologia do Folin Ciocalteu. Pela metodologia do TBARS, foram obtidos resultados satisfatórios (propriedade antioxidante superior a 65%) para os extratos hexano (66,49%), acetato de etila do micélio (61,16%), metanol (78,09%) e etanol/água (72,33%). Na análise do fosfomolibedênio, o melhor resultado foi obtido para o extrato hexano quando comparado com o padrão BHT (50,60 AA%). Nos testes de DPPH e FRAP, a propriedade antioxidante foi considerada baixa quando comparada aos padrões utilizados. Não foi observada toxicidade para nenhum dos extratos frente à metodologia de *Artemia salina*, porém quanto ao teste da hemólise, os extratos hexano e clorofórmio apresentaram valores acima de 50% de atividade hemolítica. Na avaliação do potencial antimicrobiano, foram utilizadas diferentes cepas de fungos e bactérias de interesse clínico, foi observada a atividade bacteriostática para o extrato clorofórmio a partir da concentração de 250µg/mL frente à cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Na avaliação antitumoral, foi visualizada uma inibição de crescimento de linhagem tumoral de 10% para os extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila do meio e etanol/água. No caso da atividade alelopática, foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*, observando-se um padrão de inibição de germinação e crescimento de hipocótilo e radícula presente em todos os extratos. Na avaliação do potencial larvicida dos extratos frente ao *Aedes aegypti*, os extratos hexano e clorofórmio apresentaram atividade (LC_{50} de 441,42 e 90,49, respectivamente). Este estudo apresenta grande potencial na descoberta de novos insumos para a indústria farmacêutica, agrícola e veterinária, por dar aplicabilidade benéfica ao fungo fitopatógeno *D.pinea*.

Palavras-chave: fitopatógeno; D-manitol; glucana; antioxidante; alelopática.

ABSTRACT

Chemical analyzes of compounds extracted from natural sources are extremely important in the scientific field. Natural products are a large reservoir of substances with important pharmacological activity, such as antitumor, anti-inflammatory and antibiotic. The fungus *Diplodia pinea* is a phytopathogen that causes diseases in conifers such as *Pinus* sp., with high prevalence around the world. The objective of this study was to investigate substances with potential applicability in the human and agricultural areas, evaluating possible biological activities of extracts of the fungus. Biomass production was carried out in potato dextrose broth at 16 °C for seven days, in the dark, without mechanical agitation, aiming at the production of metabolites. For the performed analyses, extracts produced from different solvents (hexane, chloroform, ethyl acetate, methanol and ethanol/water) were used. For research and identification of primary and secondary metabolites, the techniques of Thin Layer Chromatography (TCD), X-Ray Diffraction, ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance and Mass Spectrometry were adopted. The presence of steroids, triterpenes, phenolic compounds and the monosaccharides glucose, arabinose, mannose, galactose and xylose in the samples was visualized. The compounds, palmitic acid, D-mannitol and 1,3 alpha glucan were characterized. To evaluate the antioxidant property, the methodologies of DPPH, TBARS, FRAP, Phosphomolybdenum and Folin Ciocalteu were used. High antioxidant properties (above 50 mg EAG/g) were observed for the chloroform extracts (61.8 mg EAG/g), ethyl acetate from the medium (70.8 mg EAG/g) and mycelium (119.21 mg EAG /g), as well as the ethanol/water extract (53.2 mg EAG/g) using the Folin Ciocalteu methodology. By the TBARS methodology, satisfactory results were obtained (antioxidant property greater than 65%) for the hexane (66.49%), mycelium ethyl acetate (61.16%), methanol (78.09%) and ethanol/ water (72.33%). In the analysis of phosphomolybdenum, the best result was obtained for the hexane extract when compared to the standard BHT (50.60 AA%). In the DPPH and FRAP tests, the antioxidant property was considered low when compared to the standards used. No toxicity was observed for any of the extracts against the *Artemia salina* methodology, but as for the hemolysis test, the hexane and chloroform extracts showed values above 50% of hemolytic activity. In the evaluation of the antimicrobial potential, different strains of fungi and bacteria of clinical interest were used, the bacteriostatic activity was observed for the chloroform extract from the concentration of 250µg/mL against the strain of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). In the antitumor evaluation, a tumor lineage growth inhibition of 10% was visualized for the hexane, chloroform, ethyl acetate of the medium and ethanol/water extracts. In the case of allelopathic activity, *Lactuca sativa* and *Allium cepa* seeds were used, observing a pattern of inhibition of germination and hypocotyl and radicle growth present in all extracts. In the evaluation of the larvicidal potential of the extracts against *Aedes aegypti*, the hexane and chloroform extracts showed activity (LC₅₀ of 441.42 and 90.49, respectively). This study has great potential in the discovery of new inputs for the pharmaceutical, agricultural and veterinary industries, as it provides beneficial applicability to the phytopathogenic fungus *D.pinea*.

Keywords: phytopathogen; D-mannitol; glucan; antioxidant; allelopathic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	IMAGEM DE <i>Pinus</i> sp. INDICANDO INFECÇÃO POR <i>Diplodia</i> sp.....	35
FIGURA 2 -	FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO <i>in vitro</i> DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i> – ETAPA 1.....	37
FIGURA 3 -	FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE EXTRATOS A PARTIR DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i> – ETAPA 2.....	38
FIGURA 4 -	FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS A PARTIR DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i> – ETAPA 3.....	39
FIGURA 5 -	FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS <i>in vitro</i> REALIZADAS COM EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i> – ETAPA 4.....	39
FIGURA 6 -	FÓRMULA 1: ÍNDICE DO % ANTIOXIDANTE DA AMOSTRA FRENTE AO PADRÃO.....	47
FIGURA 7 -	FÓRMULA 2: % DE INIBIÇÃO DO DPPH.....	48
FIGURA 8 -	FÓRMULA 3: EQUAÇÃO DA RETA PARA CÁLCULO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS.....	49
FIGURA 9 -	EQUAÇÃO DA RETA EMPREGADA NO CÁLCULO DO FRAP.....	50
FIGURA 10 -	FÓRMULA 4: % DE PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO PADRÃO.....	52

FIGURA 11 -	FÓRMULA 5: % DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	54
FIGURA 12 -	CULTURA DE <i>Diplodia pinea</i> EM PLACA CONTENDO MEIO BDA.....	58
FIGURA 13 -	ASPECTOS MACROSCÓPICOS DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	59
FIGURA 14 -	MONOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS PELO FUNGO <i>Diplodia pinea</i> COM BASE EM <i>Screening</i> QUÍMICO REALIZADO.....	68
FIGURA 15 -	EXTRATO HEXANO ANALISADO POR CG-MS.....	69
FIGURA 16 -	PERFIL DO CROMATOGRAMA OBTIDO PARA EXTRATO HEXANO DO MICÉLIO DE <i>Diplodia pinea</i>	69
FIGURA 17 -	FRAGMENTAÇÃO DO PICO 1 – ÁCIDO PALMÍTICO	70
FIGURA 18 -	ÁCIDO PALMÍTICO.....	70
FIGURA 19 -	ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ PARA ISOLADO IS7 (^{13}C : 100,6 MHz; SOLVENTE – ÁGUA DEUTERADA).....	73
FIGURA 20 -	ESTRUTURA DA 1 $\longrightarrow$ 3 ALFA-GLUCANA.....	73
FIGURA 21 -	CRISTAL REFRAATÁVEL (D-MANITOL).....	75
FIGURA 22 -	ESTRUTURA DO COMPOSTO ISOLADO (D-MANITOL).....	75
FIGURA 23 -	PERFIL DE CRESCIMENTO DE HIPOCÓTILO E RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i> FRENTE AOS PADRÕES PARA OS EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i>	91

FIGURA 24 - PERFIL DE CRESCIMENTO DE HIPOCÓTILO E RADÍCULA DE <i>Allium cepa</i> FRENTE AOS PADRÕES PARA OS EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i>	94
FIGURA 25 - AMOSTRAS AVALIADAS QUANTO AO CRESCIMENTO E INIBIÇÃO NO ENSAIO DE ALELOPATIA	96

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (%) PARA EXTRATOS DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	78
GRÁFICO 2 - PORCENTAGEM DE HEMÓLISE DOS EXTRATOS QUE APRESENTARAM RESULTADOS SIGNIFICATIVOS FRENTE AOS CONTROLES.....	87
GRÁFICO 3 - GERMINAÇÃO (%) E DESVIO PADRÃO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> UTILIZANDO DIFERENTES EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i>	89
GRÁFICO 4 - GERMINAÇÃO (%) E DESVIO PADRÃO DE SEMENTES DE <i>Allium cepa</i> UTILIZANDO DIFERENTES EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i>	90

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - COMPOSIÇÃO DO CALDO DE CULTIVO BATATA DEXTROSE (BD).....	40
QUADRO 2 - EXTRAÇÕES EMPREGANDO DIFERENTES SOLVENTES PARA O MICÉLIO DO FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	43
QUADRO 3 - COMPOSIÇÃO DAS FASES MÓVEIS UTILIZADAS NO <i>Screening</i> POR CCD.....	44
QUADRO 4 - DILUIÇÕES UTILIZADAS NA METODOLOGIA DO FRAP.....	50
QUADRO 5 - SOLUÇÕES UTILIZADAS NA METODOLOGIA DO FRAP.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	UMIDADE E CINZAS OBTIDOS PARA MICÉLIO DE <i>Diplodia pinea</i>	60
TABELA 2 -	RESULTADOS OBTIDOS POR EXPERIMENTO DE ANÁLISE TÉRMICA PARA O FUNGO <i>Diplodia pinea</i>	61
TABELA 3 -	RENDIMENTO DOS DIFERENTES EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DO MICÉLIO DE <i>Diplodia pinea</i>	63
TABELA 4 -	RENDIMENTO (mg) PARA OS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DO MEIO E DO MICÉLIO FÚNGICO DE <i>Diplodia pinea</i>	64
TABELA 5 -	CCD DO MICÉLIO E DO MEIO DE CULTIVO DE <i>Diplodia pinea</i>	65
TABELA 6 -	ANÁLISE DE CCD SEGUNDO DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE MICÉLIO DE <i>Diplodia pinea</i>	67
TABELA 7 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AMOSTRA POLISSACARÍDEO DO MICÉLIO EXTRAÇÃO 1.....	71
TABELA 8 -	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AMOSTRA POLISSACARÍDEO DO MEIO.....	72
TABELA 9 -	DADOS DE CÉLULAS UNITÁRIAS OBTIDOS PARA O MONO CRISTAL POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X.....	75
TABELA 10 -	IC ₅₀ E DADOS ESTATÍSTICOS, PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH.....	80

TABELA 11 - CONCENTRAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i>	82
TABELA 12 - POTENCIAL DE REDUÇÃO DO ÍON Fe DOS EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i> FRENTE AOS CONTROLES.....	83
TABELA 13 - AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DOS EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i> AA%.....	84
TABELA 14 - MORTALIDADE DA <i>Artemia salina</i> PARA OS EXTRATOS E CONTROLES.....	86
TABELA 15 - EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i> SOBRE O HIPOCÓTILO DE <i>Lactuca sativa</i>	92
TABELA 16 - EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i> SOBRE A RADÍCULA DE <i>Lactuca sativa</i>	93
TABELA 17 - EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i> SOBRE O HIPOCÓTILO DE <i>Allium cepa</i>	95
TABELA 18 - EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i> SOBRE A RADÍCULA DE <i>Allium cepa</i>	95
TABELA 19 - CLASSIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PARA O TESTE DE CIM.....	98
TABELA 20 - MORTALIDADE DE LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> FRENTE A EXTRATOS DE <i>Diplodia pinea</i>	100

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Abs -	Absorbância
<i>A. Aegypti</i> -	<i>Aedes aegypti</i>
ANOVA -	Análise de variância
<i>A. salina</i> -	<i>Artemia salina</i>
ATCC -	<i>American type culture collection</i>
Atm -	Atmosférica
BD -	Batata dextrose
BDA -	Batata dextrose ágar
BOD -	Estufa incubadora microbiológica Incubadora
^{14}C -	Carbono radioativo
CCD -	Cromatografia em Camada Delgada
C – H	Ligação simples carbono hidrogênio
CIM -	Concentração Inibitória Mínima
C = O -	Ligação dupla carbono oxigênio (função carbonila)
CL ₅₀ -	Concentração letal 50%
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DP -	Desvio Padrão
<i>D. pinea</i> -	<i>Diplodia pinea</i>
DPPH -	2,2- difenil-1-picril-hidrazila
EAG.g ⁻¹	Equivalente de ácido gálico
F -	Fator de conversão
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
G	Gramas
H	Horas
IC de 50% -	Concetração inibitória média de 50%
M -	Molaridade
Min	Minutos
N -	Normalidade
Na ₂ CO ₃ -	Carbonato de sódio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
N – H -	Ligação simples nitrogênio hidrogênio

P -	Peso
Pa -	Peso da amostra
PBS -	Tampão fosfato salino
pH -	Potencial hidrogênico
Ps -	Peso do cadinho mais amostra após a dessecação
<i>P. taeda</i> -	<i>Pinus taeda</i>
Pu -	Peso da amostra mais cadinho antes da dessecação
RL -	Radicais livres
RMN	Ressonância magnética nuclear
Rpm -	Rotação por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TTC -	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UC -	Umidade e cinzas
UV -	Ultravioleta
v -	Volume

LISTA DE SÍMBOLOS

>	Maior que
<	Menor que
+	Positivo ou mais
-	Negativo ou menos
°C	Grau Celsius
%	Porcento
•	Radical
±	Mais ou menos
G	Gramma
Mg	Miligramma
mg.mL ⁻¹	Miligramma por mililitro
ml	Mililitro
Mm	Milímetros
Nm	Nanômetro
m/V	Massa por volume
q.s.p	Quantidade suficiente para
µL	Microlitro
Mg	Microgramma
µg.mL ⁻¹	Microgramma por mililitro
µM -	Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	JUSTIFICATIVA.....	25
1.2	OBJETIVOS	26
1.2.1	Objetivo geral	26
1.2.2	Objetivos específicos.....	26
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1	PRODUTOS NATURAIS	28
2.2	METABÓLITOS PRIMÁRIOS	29
2.3	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	29
2.4	FUNGOS	31
2.4.1	Fungos Fitopatogênicos	33
2.4.2	<i>Diplodia pinea</i>	34
3	METODOLOGIA.....	37
3.1	PRODUÇÃO <i>in vitro</i> DOS FUNGOS	40
3.2	TEOR DE UMIDADE E CINZAS.....	40
3.3	ANÁLISE TÉRMICA	41
3.4	PRODUÇÃO DOS EXTRATOS E DISLIPIDIFICAÇÃO MICELIAL.....	41
3.5	EXTRAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DE CARBOIDRATOS	42
3.6	<i>Screening</i> POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA - CCD.....	43
3.7	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS	44
3.7.1	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas - CGMS	44
3.7.2	Composição monossacarídica por cromatografia gasosa - GCMS	45
3.7.3	Ressonância Magnética Nuclear - RMN.....	45
3.7.4	Difração de Raios X - Cristalografia.....	46
3.8	AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TBARS	46
3.9	AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH	47
3.10	AVALIAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEAU.....	48
3.11	AVALIAÇÃO DO PODER DE REDUÇÃO DO ÍON FERRO - FRAP.....	49

3.12	AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELA METODOLOGIA DO FOSFOMOLIBDÊNIO	51
3.13	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE <i>in vitro</i> DE <i>Diplodia pinea</i>	52
3.13.1	Frente à <i>Artemia salina</i>	52
3.13.2	Atividade Hemolítica	53
3.14	ESTUDO ALELOPÁTICO	53
3.15	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL	54
3.16	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	55
3.17	ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS	56
3.18	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	PRODUÇÃO <i>in vitro</i> DOS FUNGOS	58
4.2	TEOR DE UMIDADE E CINZAS	60
4.3	ANÁLISE TÉRMICA	61
4.4	PRODUÇÃO DOS EXTRATOS E DISLIPIDIFICAÇÃO MICELIAL	62
4.5	EXTRAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DE CARBOIDRATOS	63
4.6	Screening POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA - CCD	65
4.7	IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS	69
4.7.1	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas - CGMS	69
4.7.2	Composição monossacarídica por cromatografia gasosa - GCMS	71
4.7.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	72
4.7.4	Difração de Raios X - Cristalografia	74
4.8	AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TBARS	77
4.9	AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH	79
4.10	AVALIAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEAU	80
4.11	AVALIAÇÃO DO PODER DE REDUÇÃO DO ÍON FERRO - FRAP	83
4.12	AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELA METODOLOGIA DO FOSFOMOLIBDÊNIO	84
4.13	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE <i>in vitro</i> DE <i>Diplodia pinea</i>	85
4.13.1	Frente à <i>Artemia salina</i>	85

4.13.2	Atividade Hemolítica	86
4.14	ESTUDO ALELOPÁTICO	88
4.15	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL	97
4.16	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	98
4.17	ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS	99
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
5.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	104
	REFERÊNCIAS.....	105
	ANEXOS	116
	ANEXO 1 – FLUXOGRAMA COMPLETO DO ESTUDO REALIZADO.....	116
	ANEXO 2 – EXCICATA DEPOSITADA DO MATERIAL DE ESTUDO.....	117

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais podem ser descritos como a fonte mais antiga de uso pela humanidade, seja por sua ação farmacológica ou tóxica. Diversos estudos realizados ao longo do tempo relatam a utilização de produtos naturais pelas civilizações Orientais e Ocidentais, por meio da observação (MCCURDY; SCULLY, 2005). Traçando-se uma linha temporal, estes estudos se desenvolveram desde a época pré-cristã continuando em expansão até os dias atuais, sendo um campo promissor para o estudo de biomoléculas (SOROKINA; STEINBECK, 2020).

Abrangem os estudos em produtos naturais as pesquisas realizadas com microrganismos, plantas e organismos marinhos. Vários princípios ativos foram isolados de fontes naturais, como o alcaloide morfina e o terpeno antimalárico ácido artemisinico (BERDY, 2005).

Os fungos são organismos com relevância ambiental e que possuem ampla diversidade e distribuição na natureza. Os produtos isolados de microrganismos têm importância em outras áreas além do uso medicinal em humanos. Pesquisas mostram usos promissores na indústria de produtos agroquímicos, herbicidas, antifúngicos e inseticidas menos danosos à saúde humana. Na área de medicamentos, substâncias com atividade antibiótica recebem destaque como promissores metabólitos secundários isolados de fungos que contribuem para a melhora da saúde humana, como exemplo cita-se a penicilina e as cefalosporinas utilizadas até hoje em inúmeras patologias (PINTO et al., 2002; SHIN, 2020).

As análises químicas de compostos extraídos de fontes naturais, o conhecimento destas moléculas, a realização de testes biológicos e a comprovada ação de substâncias com importantes atividades biológicas como antitumorais, anti-inflamatórios e antibióticos, justificam a importância das pesquisas na área de produtos naturais (AZAB et al., 2016).

Devido à ampla aplicabilidade dos resultados gerados em um processo de pesquisa envolvendo a busca por novos insumos e moléculas bioativas com aplicabilidade nas áreas de saúde, cada vez mais se busca atentar para a importância da utilização de patentes com intuito de proteção da propriedade intelectual desenvolvida durante a execução de um trabalho científico (CÓSER et al., 2018).

Neste contexto a inovação tecnológica se caracteriza pela introdução no mercado de um produto, bem ou serviço novo baseando-se em resultados de desenvolvimento de novas tecnologias. A fim de garantir, portanto a apropriação dos resultados obtidos pode-se iniciar um pedido de proteção legal temporária, a patente. A patente permitirá o acesso e conhecimento da inovação sendo o seu conteúdo técnico protegido por lei. Dessa forma, o conhecimento tecnológico contido no Documento de Patente e disponibilizado no Banco de Patentes do Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI, é transformado em informação pública, permanecendo disponível para a consulta e pesquisa posterior. Enfim, a posse de uma patente gera estímulos no campo da ciência tornando ainda mais palpável e aplicável os resultados obtidos (CÓSER et al., 2018).

1.1 JUSTIFICATIVA

Os produtos naturais são fontes de obtenção de metabólitos primários e secundários com importante atividade farmacológica relatada, dentre estas a analgésica, antineoplásica e antibiótica.

O presente estudo justifica-se devido ao fato do gênero *Diplodia* sp. apresentar importância ambiental já relata. Observa-se ainda escassez de estudos para a espécie *Diplodia pinea*, enfatizando-se por fim que os fungos estão contemplados no campo de estudos dos produtos naturais, sendo, portanto considerados potenciais reservatórios de moléculas de interesse.

1.2 OBJETIVOS

Pesquisar potenciais substâncias de interesse biotecnológico e na área da saúde humana e veterinária a partir de extratos do fungo *Diplodia pinea*.

1.2.1 Objetivo geral

Realizar a produção *in vitro* do fungo *Diplodia pinea* e de seus extratos, a partir do micélio e caldo de cultivo, identificar a presença de metabólitos primários e secundários e determinar as atividades biológicas e propriedades antioxidantes.

1.2.2 Objetivos específicos

- Produzir por fermentação submersa a biomassa do fungo *D. pinea*;
- Determinar o teor de umidade e cinzas do micélio fúngico;
- Realizar a análise térmica do micélio fúngico;
- Produzir extratos a partir do micélio liofilizado e caldo de cultivo do fungo *D. pinea*;
- Proceder à extração e precipitação dos carboidratos contidos no micélio e caldo de cultivo do fungo *D.pinea*;
- Isolar e determinar os metabólitos primários e secundários produzidos pelo fungo *D. pinea*;
- Caracterizar os metabólitos primários e secundários produzidos pelo fungo *D. pinea*;
- Avaliar a propriedade antioxidante dos extratos pelas metodologias de compostos fenólicos totais, TBARS, DPPH, Fosfomolibdênio e FRAP;
- Avaliar a propriedade antioxidante dos polissacarídeos pelas metodologias de compostos fenólicos totais e Fosfomolibdênio;
- Avaliar a toxicidade *in vitro* dos extratos pelas metodologias de *Artemia salina* e hemólise;
- Avaliar o potencial alelopático dos extratos;

- Avaliar a atividade antitumoral dos extratos *in vitro*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos *in vitro*;
- Avaliar o potencial larvicida dos extratos frente *Aedes aegypti*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PRODUTOS NATURAIS

Após a Segunda Guerra Mundial, as pesquisas evoluíram, graças à disponibilidade do carbono radioativo (^{14}C) que auxiliou nas pesquisas de biossíntese, e na elucidação das primeiras etapas químicas da fotossíntese. No século XX, rotas de biogênese de alcaloides começaram a ser estudadas a fundo, sendo comprovadas anos depois. Posteriormente, técnicas mais refinadas, como a cromatografia, surgiram para contribuir com a elucidação estrutural das moléculas com atividade farmacológica em um menor espaço de tempo (PINTO et al., 2002).

Os fungos fazem parte do grupo de produtos naturais, eles podem parasitar plantas ou realizar associações benéficas com as mesmas, podendo sintetizar compostos secundários com ações farmacológicas de interesse, como atividade analgésica, antineoplásica, antioxidantes, entre outras (SILVA, 2014).

De acordo com Hasan et al. (2013), cerca de seis mil produtos naturais foram isolados de fungos, uma fonte promissora para a obtenção de antibióticos, antivirais, antifúngicos, anti-leveduras, anti-tumorais e anti-inflamatórios. Esses autores também relataram a possibilidade de isolar moléculas químicas de grupos de metabólitos secundários com reconhecida atividade biológica, tais como alcaloides, policetídeos, terpenos, compostos isoprenoides, compostos não isoprenoides e quinonas. Além disso, há relatos de obtenção de metabólitos primários, como carboidratos (HASAN et al., 2013).

A química e a pesquisa de produtos naturais de fungos são um campo em constante crescimento, pois esses microrganismos são fontes de moléculas de interesse medicinal (PINTO et al., 2002; BÉRDY, 2005). Entre os fungos, a capacidade de produção é mais significativa nos ascomicetos e basidiomicetos (BÉRDY, 2005). Algumas substâncias obtidas podem ser citadas, como exemplos: penicilina do fungo *Penicillium chrysogenum* Thom. descoberto em 1928 por Alexander Fleming (LIGON, 2004) de grande potencial antibacteriano. Querellou et al. (2010) em uma revisão sobre fungos isolados de algas marinhas, mencionaram a obtenção do policetídeo asco-sali pirrolidinona-A40, isolado de *Ascochyta salicorniae* com potencial atividade antimalárica; além de** alcaloides com atividade anticâncer isolada de *Penicillium citrinum* Thom., *Fusarium* sp., *Apiospora*

montagnei Sacc.

Há também relatos de sínteses de carboidratos, que atuam como fornecedores de energia para a sobrevivência dos fungos. Muitos estudos indicam que esses metabólitos demonstram atividades biológicas relevantes, como antineoplásica, antiviral e antifúngica. Portanto, pode-se afirmar que essas moléculas são de grande interesse técnico-científico para a indústria de medicamentos e insumos (APPELT et al., 2013).

2.2 METABÓLITOS PRIMÁRIOS

Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Os compostos primários produzidos por fungos apresentam grande diversidade e são essenciais para a vida do organismo, possibilitando sua sobrevivência. Os metabólitos primários de microrganismos apresentam grande importância comercial e são bastante utilizados em âmbito industrial, como exemplo pode-se destacar os carboidratos (manitol, xilose, arabinose), os álcoois (etanol), aminoácidos (lisina, treonina, fenilalanina), nucleotídeos flavorizantes (ácido 5-guanílico, ácido-5-inosínico), ácidos orgânicos (propionico, fumárico, láctico), polissacarídeos (galactomananas) (BRAUN, 2018).

2.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Na natureza encontramos várias fontes de substâncias orgânicas que ao longo do tempo, por meio de estudos, comprovaram ter inúmeras atividades biológicas. Dentre os diversos reinos podem-se citar o Reino Vegetal e o Reino Fungi. A estas fontes naturais são atribuídas o fornecimento de diversos metabólitos secundários de grande relevância pela sua aplicabilidade na área de saúde humana e veterinária (medicamentos), insumos farmacêuticos, cosméticos, alimentos e produtos com aplicabilidade na agricultura. Essas substâncias são em geral defesas de natureza química e componentes do metabolismo destes seres vivos (VIZZOTTO et al., 2010).

Os estudos fitoquímicos são indispensáveis na pesquisa dos metabólitos secundários, pois por meio destes estudam cada grupo de metabólitos, sua rota de biosíntese, estrutura química molecular e suas propriedades biológicas. Após avaliar

esses fatores objetiva-se geralmente o isolamento e identificação destas substâncias (VIZZOTTO et al., 2010).

O metabolismo secundário é resultante de várias reações anabólicas e catabólicas das estruturas celulares; este processo é derivado do metabolismo primário que origina substâncias indispensáveis a vida celular, como já citados, as proteínas, carboidratos, aminoácidos e ácidos nucleicos (CUNHA et al., 2016).

Dentre as principais classes de metabólitos secundários identificados e estudados pode-se citar os compostos nitrogenados, compostos fenólicos e os esteroides e triterpenos, para as plantas. Já para fungos observa-se além destas classes citadas, outras de estrutura química mais complexa, como toxinas, policetídeos, peptídeos não ribossômicos, isocumarinas, quinonas e fenilpropanóides (PAMPHILE et al., 2017).

Destes produtos naturais obtidos a partir de fungos pode-se citar um amplo espectro de atividades biológicas, como ação antimicrobiana, propriedade antioxidante, propriedades imunossupressoras e antivirais (JALGAONWALA et al., 2011). Os microrganismos têm se destacado por serem fontes naturais de produção de metabólitos bioativos. Esses organismos vêm estimulando o interesse da comunidade científica, devido à produção de moléculas com aplicações biotecnológicas em diferentes indústrias, como a farmacêutica (ALY et al., 2010).

Várias técnicas são utilizadas para aprimorar o uso de microrganismos no isolamento de novos princípios ativos, reunindo conhecimentos em química, microbiologia e biologia molecular. Excelente fonte de metabólitos com atividades biológicas, os microrganismos são responsáveis por aproximadamente 10% dos produtos naturais bioativos conhecidos. Contudo, estima-se que somente 1% dos microrganismos existentes é cultivável em laboratório (SPECIAN et al., 2014).

Quando um metabólito fúngico apresenta potencial biológico, sua produção pode ser realizada em larga escala em condições controladas, como temperatura, pH, aeração e emprego de diferentes meios de cultivo, para aperfeiçoar seu rendimento (ALY et al., 2010; SPECIAN et al., 2014).

São várias as vantagens da fermentação de fungos *in vitro*, como a reprodução de uma técnica de cultivo padronizada e segura, pois o fungo cultivado se torna uma fonte potencialmente inesgotável (SPECIAN et al., 2014; MOURA et al., 2020). O aumento na produção micelial ou visando a produção de metabólitos depende de diferentes condições de cultivo. Isso ocorre para se otimizar as vias

biossintéticas que levarão à produção de compostos.

Nesse contexto em diversos campos, como o da indústria farmacêutica, ainda há muito a ser explorado com relação à utilização de microrganismos devido ao fato de serem grandes produtores de substâncias bioativas. Isso torna esses organismos fontes naturais de interesse, pela possibilidade da descoberta de novos princípios ativos, apresentando como vantagem o baixo custo de produção e a facilidade de manipulação das variáveis de cultivo, otimizando e viabilizando a produção dos metabólitos em escala industrial (ALY et al., 2010; SPECIAN et al., 2014; MOURA et al., 2020).

2.4 FUNGOS

Dentre os microrganismos passíveis de pesquisas de substâncias de interesse, podem-se citar os fungos. Estes podem ser descritos como eucariontes, aclorofilados, uni ou pluricelulares, filamentosos, sapróbios, parasitas ou simbiontes. Por anos, foram considerados vegetais, sendo que, a partir de 1969, passaram a ser classificados em um reino próprio, o Reino Fungi (TORTORA, 2012).

Isso se deve ao fato destes organismos terem características próprias. Dentre elas, pode-se citar a incapacidade de sintetizarem clorofila, a ausência de celulose na sua parede celular (exceto alguns fungos aquáticos) e o não armazenamento de amido como substância de reserva. Os fungos são encontrados em diversos habitats (solo, água e ar) e sistemas (vegetais e animais), tendo importância na ciclagem de compostos orgânicos e inorgânicos na natureza (LOBATO, VARGAS; SILVEIRA, 2009).

Taxonomicamente os fungos realizam reprodução assexuada ou sexuada dependendo da sua espécie. A reprodução assexuada pode ocorrer por fragmentação das hifas do micélio ou por esporos assexuados produzidos por mitose nas próprias hifas ou a partir de hifas especializadas (SILVA; MALTA, 2016).

São organismos extremamente importantes e com diversas aplicações no campo biotecnológico. Podem ser utilizados benéficamente na produção de alimentos fermentados e bebidas alcoólicas, contribuindo para a indústria farmacêutica por serem fontes de moléculas bioativas. Além disso, estes organismos estão presentes no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, sendo de grande importância agrícola e ecológica, pois mantém o equilíbrio do

ambiente, decompondo resíduos vegetais, degradando substâncias tóxicas. O número estimado de espécies de fungos é de 1,5 milhão, porém outros autores estimam a existência de cerca de 8,25 milhões de espécies fúngicas (ABREU et al., 2015).

Estes microrganismos podem parasitar diversas plantas, entre elas os pinheiros, dos quais absorvem nutrientes causando doenças graves (CORRÊA et al., 2016). Realizam associações benéficas com a planta (simbiose), transferindo nutrientes, minerais e água do solo, protegendo as raízes do ataque de patógenos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Além da interação fungo-planta, sabe-se que os fungos produzem metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são produzidos durante a fase de crescimento vegetativo dos fungos e são essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento. Já os metabólitos secundários são observados quando os microrganismos estão na fase estacionária de crescimento, sintetizados a partir de produtos ou compostos intermediários gerados pelo metabolismo primário, que geralmente possuem ação biológica (PINTO, 2002).

Como exemplos de metabólitos primários, pode-se citar a vasta classe de carboidratos produzidos por fungos, principalmente polissacarídeos, devido a sua capacidade industrial, tecnológica e biológica (SILVA, et al., 2014). Alguns exemplos de metabólitos secundários já relatados em estudos anteriores são alcaloides indólicos, compostos fenólicos, terpenos, policetídeos (KELLER et al., 2005; BRAKHAGE, 2015).

O cultivo *in vitro* de microrganismos para fins de produção em larga escala e aplicação biotecnológica requer informações básicas para otimizar as condições de seu crescimento – como meio de cultura, temperatura, tempo de incubação, pH, entre outros, como mostrado por Hatvani (2001). Os meios de cultura usados para o crescimento de fungos podem ser líquidos, sólidos ou semissólidos, e devem ter fonte de carbono e nitrogênio, além de sais minerais e fatores de crescimento (HATVANI, 2001).

Existe uma grande variedade de meios de cultura, cuja composição afeta diretamente as características de crescimento dos fungos, influenciando o tipo, a forma e a produtividade. O interesse de estudo de fungos vem do fato de sua capacidade metabólica para produção dessa gama de substâncias biologicamente ativas (PINTO et al., 2002; MONEY, 2016).

2.4.1 Fungos Fitopatogênicos

Os fungos fitopatogênicos, por definição, podem parasitar uma planta absorvendo os nutrientes da célula vegetal para sua utilização. Causam graves doenças que dependendo do patógeno e intensidade ocasionam lesões nos órgãos de reserva, caule, raízes, sistema vascular, podendo culminar na morte da planta (BUENO; FISHER, 2006).

A maior parte dos fungos patogênicos passa parte do seu ciclo de vida no solo e outra parte na planta. A sobrevivência destes fungos depende principalmente de condições de temperatura e umidade do ambiente bem como as relações que os mesmos podem estabelecer com seus hospedeiros (MICHEREFF, 2013).

Para se compreender a patogênese fúngica deve-se visualizar a multiplicidade de interações fungo-hospedeiro e a extensão dos danos que podem ser causados ao mesmo (CASADEVALL, 2007). Como sintomas observados em plantas acometidas por alguns fitopatógenos citam-se a podridão, tombamento, lesões escuras ou avermelhadas, cancrios, seca de ponteiros, folhas murchas e amareladas (BUENO; FISHER, 2006).

Um determinante da patogenicidade é o potencial fator de infecção, pois, pode-se admitir que a estrutura de resposta ao dano está diretamente ligada a um fator de virulência de como um componente microbiano danifica o hospedeiro (CASADEVALL, 2007).

Os fungos que acometem plantas utilizam basicamente três estratégias nutricionais principais durante a sua infecção, a biotrofia, necrotrofia e hemi-biotrofia das plantas (OLIVER; IPCHO, 2004; HOWLETT, 2006).

Os fungos ditos biotróficos dependem de tecido vegetal vivo, enquanto os necrotróficos matam as células vegetais para obter nutrição, já os hemi-biotróficos geralmente têm uma fase biotrófica inicial, depois tornam-se necrotróficos. Fungos como *Leptosphaeria maculans*, o patógeno da canola-preta, têm períodos alternados de biotrofia e necrotrofia. Os fungos necrótrofos, em sua maioria, possuem faixas de hospedeiros mais amplos tendo enzimas e toxinas que degradam a parede celular dos hospedeiros, sendo estes metabólitos de interesse na virulência do fungo. Como exemplo, pode-se observar que um importante fator para a ação destes fungos necrótrofos em muitas doenças fúngicas são as toxinas, o que não foi observado ainda em fungos biotróficos, que por definição necessitam do seu hospedeiro vivo

para sobreviver (ROUXEL; BALESDENT, 2005; HOWLETT, 2006).

Estes fungos fitopatogênicos são capazes de colonizar vegetais lesionando diversas partes da planta (órgãos de reserva, raízes, caule, folhas) podendo levá-las a morte dependendo da extensão da doença (BUENO; FISCHER, 2006). São conhecidas algumas espécies de fungos fitopatogênicos capazes de causar extensas lesões em plantas do gênero *Pinus*, como é o caso do fungo deste estudo *D. pinea*.

2.4.2 *Diplodia pinea*

Diplodia pinea (Desm.) J. Kickx (sinonímia: *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton) é um fungo causador de seca de ponteiros e morte apical em coníferas. Sua reprodução é assexuada, com morfotipos e linhagens clonais, que diferem na patogenicidade ao hospedeiro (CORRÊA et al., 2016).

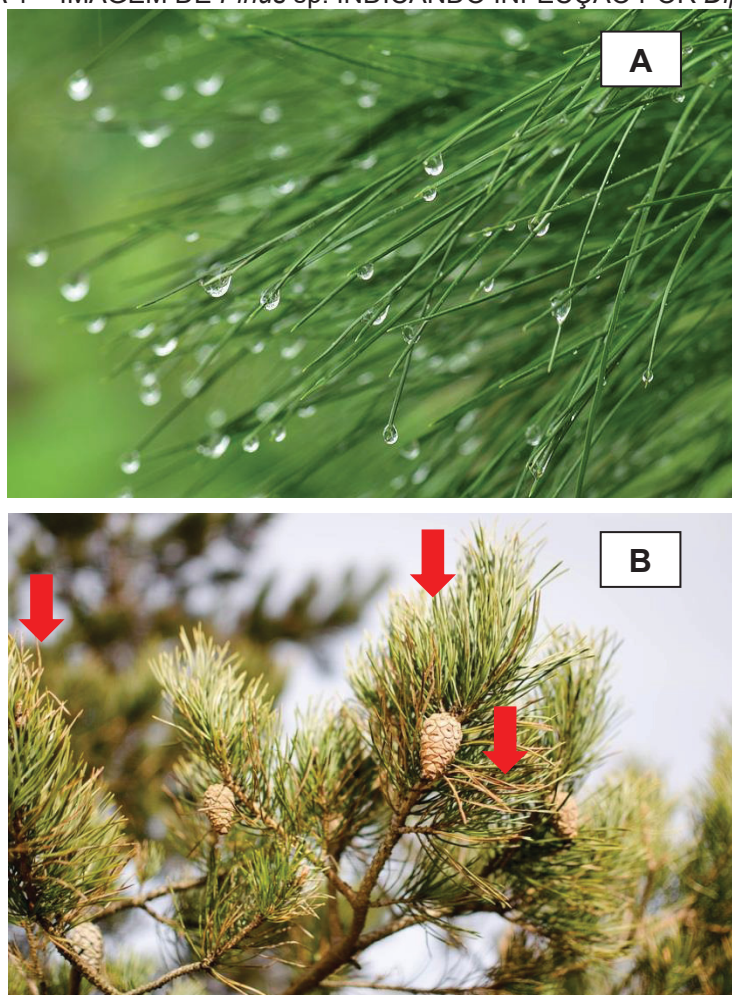
Primeiramente descrito em 1842 como *Sphaeria pinea* Desm., nomeado por Desmazières (WATERMAN, 1943), até chegar ao nome mais comum de *D. pinea*, há registros de que esse fungo tenha sido renomeado por pelo menos dez vezes. No gênero *Diplodia* os fungos jovens possuem conídios lisos, hialinos e asseptados, passando posteriormente para a cor marrom escuro com um septo mediano e presença de células conidiogênicas (HILDEBRAND, 2005; BASILIO, 2013).

As condições mais favoráveis para que haja infecções ocasionadas por *D. pinea* são clima úmido e temperaturas altas (igual ou superior a 25 °C), o que coincide com o crescimento dos botões (SWART et al., 1985). Esta espécie de fungo é amplamente distribuída pelo mundo, ocorrendo tanto em regiões temperadas, quanto em semitropicais e tropicais, podendo contaminar a semente do *Pinus*. Além de apodrecer a semente, ocorre a redução da germinação, a deterioração de radículas emergentes e o tombamento de plântulas (REES; WEBBER, 1988; STANOSZ et al., 1997).

Este fitopatógeno atinge o gênero *Pinus*, sendo encontrado em todos os países onde há presença desta espécie de planta lenhosa. O fungo pode sobreviver como endofítico ou saprofítico e está presente em tecido vivo ou morto das acículas, caule e ramos (BASILIO, 2013). Os efeitos mais agressivos do fungo estão ligados aos períodos de estresse da planta, e dentre os fatores podem-se citar temperaturas extremas, déficit hídrico ou alguma lesão na planta. Nos tecidos infectados, *D. pinea*

forma corpos de frutificação. Posteriormente, a infecção se estabelece nos brotos jovens que cessam o seu crescimento e morrem. Como sintomas pode-se citar a necrose, seca e quebra dos ponteiros, podendo ainda levar a formação de cancrios, morte de raízes e murchamento da copa (CHOW, 1978; BASILIO, 2013; REGLINSKI et al., 2013). Na FIGURA 1A, é possível observar o aspecto de uma planta saudável. Já na imagem 1B, nota-se a seca de ponteiros, um dos aspectos da infecção pelo fungo *D. pinea* (FIGURA 1).

FIGURA 1 – IMAGEM DE *Pinus* sp. INDICANDO INFECÇÃO POR *Diplodia* sp.



Legenda: A – Acículas de *Pinus* saudáveis, sem sinais de infecção por *Diplodia pinea*.

B: Ponteiros e ramos de *Pinus* apresentando infecção por *Diplodia pinea*.

Fonte: Banco de imagens gratuito/ Pixabay (2021).

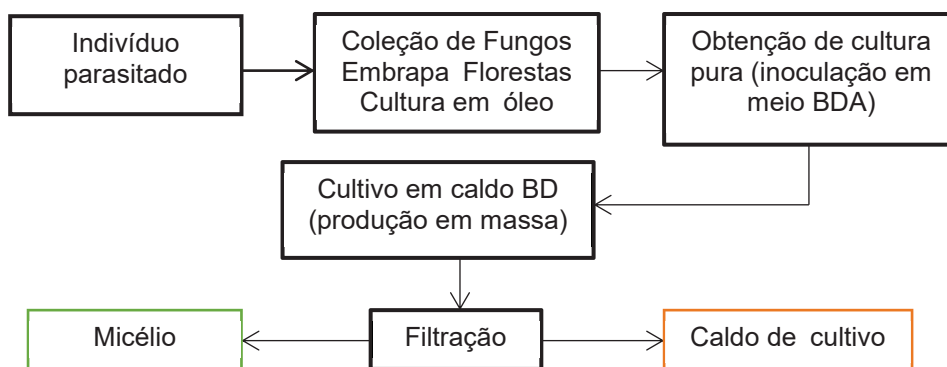
A alta incidência e severidade da infecção por *D. pinea* está associada à disseminação de seus esporos pela ação da chuva e do vento, além da colonização endofítica (condição assintomática) e transmitida por mudas. Além disso, esse fungo se torna mais agressivo em períodos de estresse das plantas (seca, chuva excessiva, granizo ou algum dano à planta) (REGLINSKI et al., 2013; SMITH et al., 2014). Alguns estudos realizados relatam a importância ambiental e econômica deste patógeno (BIHON et al., 2012, LUCHI et al., 2011 e CORRÊA et al., 2016).

3 METODOLOGIA

O presente trabalho científico faz parte do Projeto de pesquisa aprovado pelo edital Capes Embrapa nº 015/2014 intitulado “Aspectos de cultivo e abordagem química de fungos patogênicos e micorrízicos de *Pinus* e sua aplicação na área farmacêutica, veterinária e agrícola”. Este estudo possui autorização de acesso ao material genético concedida pelo Sisgen (nº A80029B) e o fungo pesquisado foi depositado no Herbário da Universidade do Oeste do Paraná (exsicata sob o número UNOP 4242) e foi a sequência gênica depositada no GenBank, sob o código MF161413.

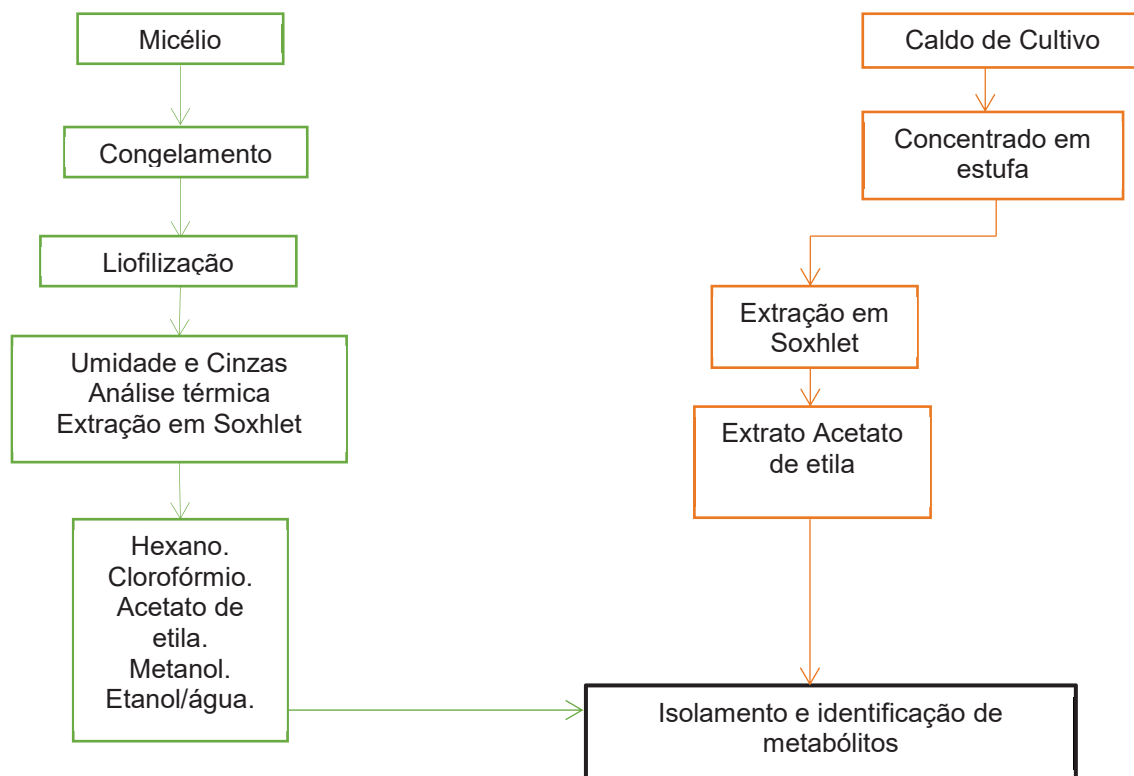
Didaticamente, o presente estudo foi dividido em etapas (produção *in vitro*; obtenção dos extratos a partir do micélio e caldo de cultivo; extração de carboidratos a partir do micélio e caldo de cultivo; extração de polissacarídeos do micélio e do meio de cultivo; atividades biológicas realizadas) do fungo, cada uma pode ser observada nos fluxogramas indicados pelas FIGURA 2, FIGURA 3, FIGURA 4 e FIGURA 5.

FIGURA 2 – FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO *in vitro* DO FUNGO *Diplodia pinea* – ETAPA 1



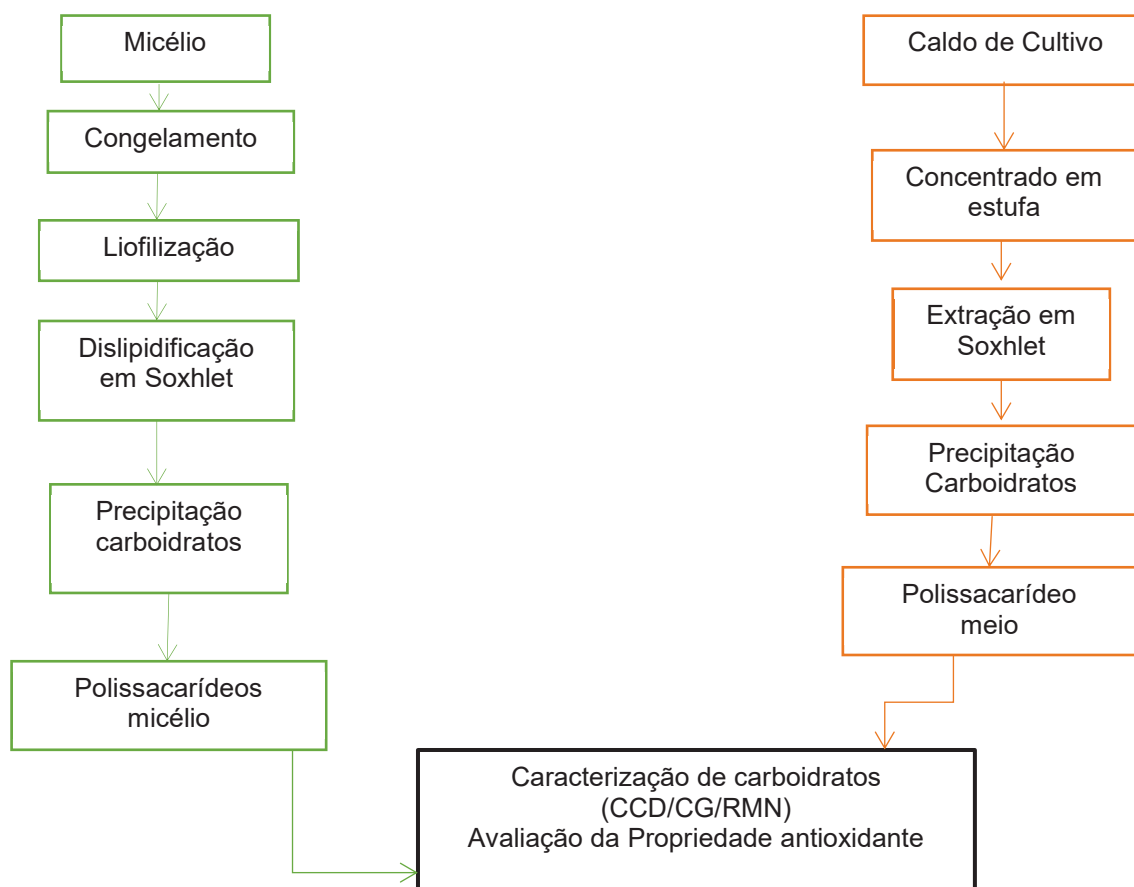
Fonte: A autora, 2021.

FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DE EXTRATOS A PARTIR DO FUNGO *Diplodia pinea* – ETAPA 2



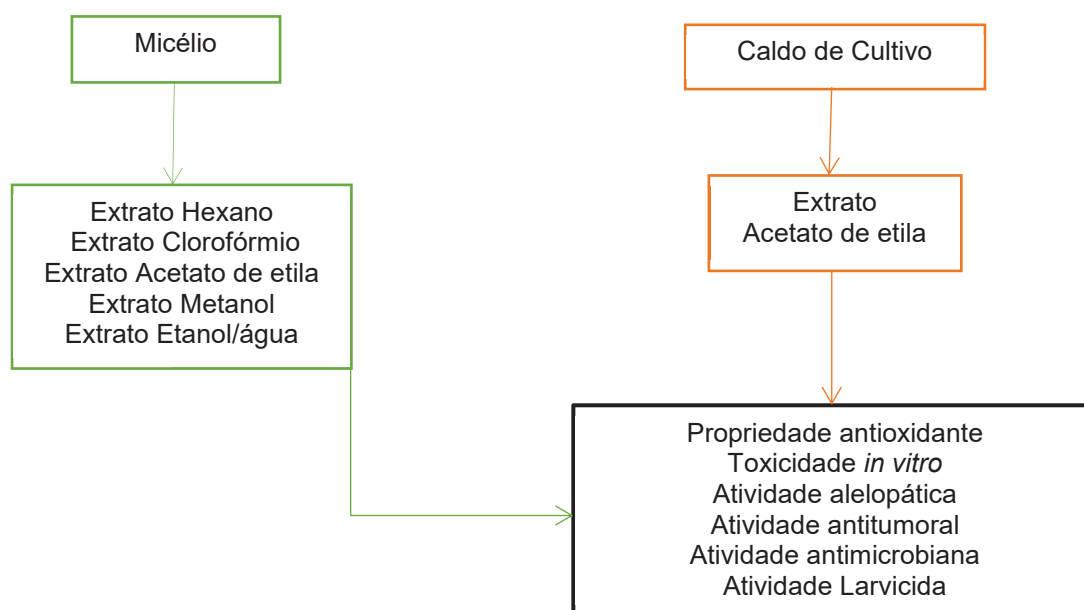
Fonte: A autora (2021).

FIGURA 4 – FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS A PARTIR DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DO FUNGO *Diplodia pinea* – ETAPA 3



Fonte: A autora (2021).

FIGURA 5 – FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS *in vitro* REALIZADAS COM EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DO MICÉLIO E CALDO DE CULTIVO DO FUNGO *Diplodia pinea* – ETAPA 4



Fonte: A autora (2021).

3.1 PRODUÇÃO *in vitro* DOS FUNGOS

A produção do fungo em massa foi realizada em meio de cultivo líquido batata dextrose (BD – QUADRO 1) com as condições otimizadas de temperatura (16 °C) e tempo de incubação (7 dias) para maior produção de metabólitos secundários de interesse. Foram utilizados frascos de vidro com tampa de plástico e tampão de algodão, contendo 50 mL do meio BD previamente autoclavado por 40 min a 121 °C e 1 atm. Em fluxo laminar, com furador padronizado de 5 mm, previamente flambado, foram inoculados 2 discos de micélio-ágar por frasco. Estes foram mantidos em BOD (estufa demanda bioquímica de oxigênio) pelo período de tempo estipulado (SILVA et al., 2018a adaptado).

Ao fim desse processo a massa micelial foi separada do meio de cultivo por filtração em fluxo laminar com auxílio de uma peneira e espátula. A massa fúngica foi congelada em freezer sendo posteriormente liofilizada por 5 dias a - 80 °C. O caldo de cultivo foi concentrado em estufa a 50 °C, até diminuição de 80% do seu volume, aproximadamente. As temperaturas de cultivo foram anteriormente estabelecidas por Moura (2017), objetivando-se a melhor produção de metabólitos primários e secundários.

QUADRO 1 – COMPOSIÇÃO DO CALDO DE CULTIVO BATATA DEXTROSE (BD)

Constituintes	Quantidade
Infusão de batata	200 g
Glicose	20 g
Água ultra purificada q.s.p	1000 mL
Ph	5,1

Fonte: Kasvi[®] (2019).

3.2 TEOR DE UMIDADE E CINZAS

O teor de umidade e cinzas foi obtido utilizando a metodologia da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019) - com modificações. As análises foram realizadas em triplicata a partir do micélio *in natura* do fungo, após a retirada do cultivo *in vitro*.

Para obtenção do teor de umidade, cadinhos de porcelana foram postos na estufa a 100 °C por 2 h, estes foram transferidos para dessecador até resfriamento,

o peso individual de cada um foi anotado. Posteriormente foram adicionados 3 g de amostra em cada, sendo os cadinhos postos novamente em estufa a 105 °C por 3 h. Foram realizadas pesagens sucessivas até obtenção de peso constante. O valor da umidade foi obtido aplicando-se o seguinte cálculo: $P_u - P_s / P_a \times 100$, em que: P_a é o peso da amostra, P_u o peso da amostra + cadinho vazio, e P_s o peso do cadinho + amostra após dessecação.

Para obtenção do teor de cinzas, cadinhos de peso conhecido contendo 3 g de micélio fúngico, foram mantidos por 6 h em mufla à temperatura de 660 °C até incineração completa da matéria orgânica, após resfriamento os mesmos foram pesados novamente e o teor de cinzas foi obtido seguindo o seguinte cálculo: $100 \times N/P$, em que: N é o peso em gramas de cinzas e P é o peso em gramas de amostra.

3.3 ANÁLISE TÉRMICA

A análise termogravimétrica foi realizada utilizando o equipamento TGA-50 Shimadzu®. Após a calibração do equipamento, de acordo com as especificações do fabricante (emprego de peso padrão e verificação com oxalato de cálcio monohidratado) o experimento ocorreu sob as seguintes condições: 8 mg da amostra foram acondicionadas em cadinhos de α alumina, sendo empregada uma taxa de fluxo de ar de 150 mL min^{-1} , uma taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} de 30 °C a 650 °C. Por fim, as perdas de massa foram calculadas utilizando software de análise de dados TA 60 WS.

3.4 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS E DISLIPIDIFICAÇÃO MICELIAL

Os extratos foram produzidos separadamente, utilizando o aparato de Soxhlet modificado (Patente INPI 0601703-7 A). Para o micélio (30 g) foram utilizados em sequência os solventes, em polaridade crescente, hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e uma mistura de etanol/H₂O 1:1 (v/v). A extração foi realizada por 72 h para cada solvente, obtendo-se no final o extrato correspondente.

O extrato do meio de cultivo foi obtido: com o caldo concentrado em rotaevaporador a 50 °C até diminuição de 80% do seu volume. Posteriormente 200 mL de meio de cultivo concentrado, foram submetidos ao aparato de Soxhlet modificado (Patente INPI 0601703-7 A) para extração com o solvente acetato de

etila por 72 h (CARVALHO et al., 2009).

Além da produção destes extratos, 15 g de micélio liofilizado foi dislipidificado em Soxhlet modificado (Patente INPI 0601703-7 A) utilizando uma mistura de solventes na proporção 80:20 (clorofórmio:metanol) por 72 h para posterior extração de carboidratos (CARBONERO, 2005 adaptado).

3.5 EXTRAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Para obtenção da porção de carboidratos foram realizadas sucessivas extrações separadamente a partir do micélio fúngico (15 g) e do caldo de cultivo (700 mL concentrado).

O micélio dislipidificado foi extraído com os solventes água à 25 °C (ambiente), água quente a 65 °C, solução de KOH a 1% (m/v), solução de KOH a 2% (m/v), solução de KOH a 10% (m/v) e DMSO, sempre na proporção de 1:3 (amostra:solvente) por 24 h com auxílio de agitador magnético para as extrações aquosas e alcalinas, e maceração por 72 h no caso do DMSO (QUADRO 2). Ainda, para a extração aquosa a temperatura ambiente (extração 1), a cada 1 hora de extração o solvente foi trocado e armazenado em geladeira. A amostra foi concentrada com auxílio de rotaevaporador a 50 °C até redução de 1/3 de seu volume, posteriormente o carboidrato foi precipitado com álcool etílico (PA) na proporção de 1:3 (v/v). Para as demais extrações (extrações 2 a 6) e para o caldo de cultivo (extração 7), foi realizada a precipitação direta com álcool etílico 96 °GL gelado na proporção 1:3 (v/v). As amostras foram mantidas em repouso em overnight por 24 h a 8 °C (CARBONERO, 2005 adaptado).

Ao final do processo realizou-se a centrifugação por 20 min a 8000 rpm a 8 °C, obtendo-se o carboidrato precipitado que foi submetido a diálise aberta por 24 h e fechada por mais 24 h, trocando-se, no caso da diálise fechada, a água destilada a cada 30 min. Para todas as diálises foram utilizadas membranas de diálise. Por fim as amostras foram liofilizadas por 10 dias ininterruptamente a temperatura de - 80 °C e purificadas por técnica de gelo e degelo.

QUADRO 2 – EXTRAÇÕES EMPREGANDO DIFERENTES SOLVENTES PARA O MICÉLIO DO FUNGO *Diplodia pinea*

Nº da extração	Solvente	Temperatura
1	H ₂ O	25 °C
2	H ₂ O	65 °C
3	KOH 1%	25 °C
4	KOH 2%	25 °C
5	KOH 10%	25 °C
6	DMSO PA	25 °C
7	Etanol 96 Glº	25 °C

Fonte: A autora (2021).

3.6 Screening POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA - CCD

A CCD é uma técnica de separação que compreende uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase estacionária consistiu em cromatoplasas de sílica gel Whatman® (MIGUEL, 2003) e as fases móveis utilizadas foram específicas para diferentes grupos de metabólitos primários e secundários.

As amostras provenientes dos extratos (hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol, e etanol/água, todos obtidos a partir do micélio, e acetato de etila do meio) foram solubilizadas em metanol e aplicadas sobre a cromatoplasa com o auxílio de um capilar, posteriormente, foram submetidas à eluição por meio de fases móveis. Ao final do experimento as cromatoplasas foram reveladas, para a identificação de diferentes grupos de metabólitos secundários (esteroides e triterpenos, compostos fenólicos, alcaloides) (QUADRO 3).

Para a avaliação da presença de carboidratos nas amostras derivadas das extrações de 1 a 7 estas foram previamente hidrolisadas. Em um vial colocou-se 2 mg da amostra e a este foi adicionado 500 µL de TFA (ácido trifluoracético) e 500 µL de água destilada. O mesmo foi homogeneizado e colocado em estufa a 100 °C por 2 h, posteriormente a amostra foi aplicada em placa de sílica gel Whatman® com auxílio de capilar. Utilizou-se para comparação os padrões comerciais glicose, arabinose, manose, maltose, galactose, xilose, trealose e ramnose. As placas foram eluídas com fase móvel e posteriormente reveladas (QUADRO 3).

QUADRO 3 – COMPOSIÇÃO DAS FASES MÓVEIS UTILIZADAS NO *Screening* POR CCD

Metabólito	Fase Móvel	Revelador	Metodologia
Esteroides	Tolueno:acetato de etila	Vanilina sulfúrica 1%	Wagner, 1996
Triterpenos	93:7		
Compostos fenólicos	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água	NEU Cloreto férrico	Wagner, 1996
	100:11:11:26		
Alcaloides	Clorofórmio:metanol	Dragendorff	Wagner, 1996
	95:5		
Carboidratos	Acetato de etila:propanol:ácido acético:água	Orcinol 1%	Andrade, 2010
	4:2:2:1		

Fonte: A autora (2021).

3.7 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS

3.7.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de Massas - CGMS

A metodologia de cromatografia gasosa foi utilizada para identificação de substâncias voláteis presentes no extrato hexano do micélio fúngico. Para tanto 1 mg de amostra foi posta em um tubo de ensaio e neste 1 mL de metanol/HCl 3 M foi adicionada, aquecendo-se a mistura a 80 °C por 1 h e 30 min. Posteriormente acrescentou-se 0,5 mL de água e 1 mL de hexano. Sendo a fase hexânica analisada em equipamento CG2010 Plus (GC) acoplado ao analisador de massas triplo quadrupolo TQ8040 Shimadzu com amostrador automático AO5000. O ensaio cromatográfico foi desenvolvido em coluna capilar SH-RTX MS 30 m por 0,25 mm x µm, utilizando hélio 5,0 a um caudal com fluxo de 1mL/min como gás transportador. A temperatura inicial da estufa foi de 100 °C, sendo esta após 3 min aquecida a 250 °C, a temperatura do injetor e da fonte de íons MS foi de 250 °C e a de linha de transferência de 300 °C. O espectro de massas foi obtido utilizando modo de varredura total em faixa de massa m/z 40 a 400 por ionização de elétrons a 70 eV.

3.7.2 Composição monossacarídica por cromatografia gasosa - CGMS

As análises de composição monossacarídica foram realizadas para os polissacarídeos extraídos com água do micélio e do caldo de cultivo seguindo a técnica de microensaio: 1 mg de amostra foi colocada em um vial e hidrolisada adicionando-se 200 μL de TFA a 2M por 1 hora a 100 °C. Em seguida foi realizada a etapa de redução que consistiu em adição de 50 μL de NH_4OH a 2 M e 20 μL NaBD_4 à amostra hidrolisada. Após foi agitada e sonicada, permanecendo incubada à temperatura ambiente (20 °C) por 2,5 h. Posteriormente, adicionou-se 50 μL de ácido acético glacial, agitando a mistura levemente. Após secagem com nitrogênio seguida de adição de 250 μL de ácido acético a 5% em MEOH secou-se novamente a amostra com nitrogênio. Seguiu-se com a etapa de acetilação em que 250 μL de anidrido acético foram adicionados a tubos de vidro contendo as amostras reduzidas, estes foram agitados e incubados em estufa a 100 °C por 2,5 h, após este tempo adicionou-se 2 mL de água destilada, deixando o tubo em repouso por 10 min. Em seguida adicionou-se 1 mL de clorofórmio à mistura sendo realizadas posteriormente 2 lavagens com água destilada. Por fim, a fase orgânica foi transferida para vial e seca com nitrogênio para análise em equipamento de CG (SASSAKI et al., 2005).

3.7.3 Ressonância Magnética Nuclear - RMN

Para as amostras provenientes dos extratos do micélio e do meio de cultivo foram realizados experimentos unidimensionais (espectro de ^1H e ^{13}C) e, os experimentos bidimensionais de correlação homonuclear como COSY (correlação homonuclear ^1H - ^1H) e heteronuclear, como HSQC (correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a uma ligação) e HMBC (correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C a longa distância). Foram utilizados os equipamentos espectrofotômetro Bruker AVANCE III 600 de campo magnético de 14,1 Tesla (600 MHz) equipado com sonda quadrinuclear (^1H , ^{13}C , ^{15}N e ^{31}P) de detecção inversa de 5 mm e com gradiente de campo no eixo z; Além do equipamento Bruker AVANCE III 400 de campo magnético de 9,4 Tesla (400 MHz) equipado com uma sonda multinuclear de detecção direta (X-núcleo e ^1H) de 5 mm com gradiente de campo no eixo z ou com sonda multinuclear de detecção direta (^1H e X-núcleo) de 10 mm e o equipamento Bruker DPX 200 de 4,7 Tesla (200 MHz),

equipado com uma sonda quadrinuclear de observação direta (^1H , ^{13}C , ^{19}F e ^{31}P) de 5 mm.

Os deslocamentos químicos de ^1H e de ^{13}C foram expressos em ppm e referenciados em relação ao sinal do tetrametilsilano (TMS), como referência interna, em 0,00 ppm. Os dados obtidos foram comparados com os dados de literatura.

3.7.4 Difração de Raios X – Cristalografia

Para a identificação pela técnica de Difractometria de Raios X de Monocristal (DRXM) os dados de difração de cada cristal obtido a partir dos extratos do micélio, para análise de cela unitária, foram coletados empregando um difratômetro Bruker – D8 Venture equipado com detector de área Photon 100 CMOS, duas fontes de radiação monocromática de Mo-K α ($\lambda = 0,7107 \text{ \AA}$) e Cu-K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), e dispositivo Kryoflex II, para realização de coletas à baixa temperatura. A análise foi realizada a 300 K utilizando-se a fonte de Cu-Kalfa. Para a realização da análise foi selecionado um fragmento cristalino de uma porção de cristais imersos em óleo mineral, o qual foi transferido cuidadosamente para um *micro-mount* que foi fixado no goniômetro do difratômetro. Os dados foram processados utilizando o programa APEX3¹. Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura utilizando a base de dados do CCDC (*Cambridge Crystallographic Data Centre*).

3.8 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TBARS

O método do TBARS pode ser definido como uma análise da lipoperoxidação lipídica, medindo o malondialdeído (MDA) presente na amostra. Inicialmente 3 mg das amostras (extratos dos fungos, os mesmos utilizados no teste anterior) e padrão BHT foram pesados e diluídos em 1 mL de etanol. Posteriormente, 0,5 mL de gema do ovo homogeneizada (5% *m/v*) e 0,1 mL das amostras (concentração de 5 mg/mL) e controle foram transferidas para tubos de ensaio em triplicata. Foram adicionados aos tubos de ensaio 0,05 mL de ABAP 0,035%, 1,5 mL de ácido acético a 20%, 1,5 mL de TBA (0,4% *m/v*) em solução de SDS (0,55% *m/v*) e 400 μL de água destilada. A mistura foi levada a banho

termostatizado a 95 °C por 1 hora. Após resfriamento, cada tubo recebeu 1,5 mL de butanol, sendo centrifugado por 3 min a 3000 rpm.

Foi realizada a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro a 532 nm, como branco utilizou-se o butanol. O índice antioxidante da amostra foi obtido empregando a FÓRMULA 1 (FIGURA 6) (DAWN-LINSLEY et al., 2005). As médias obtidas ao final do teste foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o Software Sisvar.

FIGURA 6 - FÓRMULA 1: ÍNDICE DO % ANTIOXIDANTE DA AMOSTRA FRENTE AO PADRÃO

$$IA\% = (1 - A/C) \times 100$$

Nota: C é a absorbância do controle; A é a média aritmética das absorbâncias da amostra testada.

Fonte: Dawn-Linsley et al., (2005).

3.9 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH

O ensaio foi realizado com amostras (extratos hexano do micélio, clorofórmio do micélio, acetato de etila do micélio, metanol do micélio, etanol/água do micélio e acetato de etila do meio) em triplicata e teve como objetivo, avaliar a capacidade dos extratos de reduzirem o radical livre 2,2 -difênil-1-picril-hidrazila (DPPH•), o resultado da reação é a mudança de cor que pode ser medida por diferença de absorbância por espectrofotometria. Inicialmente foi realizado um *screening* com todos os extratos nas concentrações de 100, 300 e 500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente.

A partir dessa avaliação foram estabelecidas curvas nas concentrações em que se observou atividade para cada extrato. Foram adotadas as concentrações de 50, 250, 300, 350 e 400 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para o extrato clorofórmio; 50, 150, 300 e 400 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para o acetato de etila da massa fúngica; 50, 100, 200, 250 e 300 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para o acetato de etila do meio, e 150, 200, 300, 350 e 400 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para o etanol/água 1:1 (v/v).

Na avaliação dos resultados foram calculados os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (IC_{50}), estes estão representados graficamente, sendo que a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico ($y = ax + b$) foi utilizada como base para a

determinação da IC₅₀.

As amostras foram diluídas em metanol absoluto e nos tubos de ensaio foram pipetados a amostra e 1 mL de solução de DPPH a 0,03 mmol.mL⁻¹ preparada no momento da análise em metanol. Como padrões foram utilizadas a rutina (4 a 8 µg.mL⁻¹), a vitamina C (5 a 10 µg.mL⁻¹), BHT (12 a 20 µg.mL⁻¹), e como branco o metanol e a amostra pura, sendo a absorbância da coloração posteriormente descontada. As amostras foram incubadas no escuro a temperatura ambiente e lidas após 30 min, onde a absorbância foi medida em 518 nm, e a atividade antioxidante calculada de acordo com a FÓRMULA 2 (FIGURA 7). A reação de positividade é indicada pela mudança de cor de púrpura para amarela, o que leva a diminuição da absorção quando realizada a leitura em espectrofotômetro. A análise estatística para verificação da variância (ANOVA) foi aplicada com teste de Tukey (MENSOR et al., 2001).

FIGURA 7 - FÓRMULA 2: % DE INIBIÇÃO DO DPPH

$$\% \text{ inibição do DPPH} = \frac{100 - (\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco}) \times 100}{\text{Abs. Controle}}$$

Fonte: Mensor et al., (2001).

3.10 AVALIAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEAU

Este método baseia-se no fato de que, devido à presença dos ânions heteopoli-fosfotungstatos-molibdatos, em meio básico são capazes de reagir com compostos fenólicos formando o ânion fenolato. Este ânion tem a capacidade de reduzir o reagente de molibdato em óxido de molibdênio formando um complexo de cor azul intensa chamado complexo molibdênio-tungstênio (ROGINSKY; LISSI, 2005). Consideram-se altas as concentrações de fenóis acima de 50 mg.EAG.g⁻¹ e média-alta de 50-30 mg.EAG.g⁻¹.

A metodologia adotada para este teste foi a de Singleton (1999) com modificações. As amostras de extratos (hexano do micélio, clorofórmio do micélio, acetato de etila do micélio, metanol do micélio, etanol/água do micélio e acetato de etila do meio) e polissacarídeos foram diluídas em metanol e água purificada, respectivamente, na concentração de 1mg.mL⁻¹. Inicialmente as amostras, a água e o Folin-Ciocalteu foram misturados e agitados. Após 10 min em repouso, adicionou-

se carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 10% por 30 min em repouso. Transcorrido este tempo foi realizada a leitura em 760 nm. Foi realizada durante a análise uma curva com ácido gálico como controle nas concentrações: 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Os teores de fenóis totais obtidos foram determinados em miligramas de ácido gálico por grama de amostra. Para a curva de calibração foi utilizada a equação da FÓRMULA 3 (FIGURA 8), em que y é a absorbância e x a concentração final de equivalentes de ácido gálico pela concentração utilizada de extrato. Foi medida a coloração da amostra pura, sendo esta posteriormente descontada. As médias obtidas ao final do teste foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o Software Sisvar.

FIGURA 8 - FÓRMULA 3: EQUAÇÃO DA RETA PARA CÁLCULO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

$$y = 0,0392 x - 0,0583 \quad (R^2 = 0,9964)$$

Fonte: Singleton (1999).

3.11 AVALIAÇÃO DO PODER DE REDUÇÃO DO ÍON FERRO – FRAP

Os autores Pulido et al., (2000) descrevem o método FRAP - Poder Antioxidante de Redução do íon Ferro, como uma alternativa desenvolvida para determinar a redução do ferro em diversos materiais como fluidos biológicos, soluções aquosas de compostos puros, podendo esta técnica, segundo Thaipong et al. (2006), ser aplicada para extratos.

A partir dos extratos hexano do micélio, clorofórmio do micélio, acetato de etila do micélio, metanol do micélio, etanol/água do micélio e acetato de etila do meio, foram preparados tubos de ensaio, em triplicata, com diluições diferentes para cada extrato, levando em consideração a linearidade da curva obtida. Em ambiente escuro, 90 μL de cada diluição (QUADRO 4) de cada extrato foram transferidos para microplacas de 96 poços, a cada poço foi acrescentado 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Em seguida foram homogeneizados os conteúdos das placas e os mesmos foram mantidos em incubação a 37 °C por 30 min. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm.

A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, foi plotada a absorbância no eixo Y e a diluição (mg/L) no eixo X determinando-se a equação da reta (FIGURA 9). Para a determinação da atividade antioxidante total

substituiu-se na equação da reta a absorbância equivalente a 1.000 µM do padrão sulfato ferroso. O valor obtido para o termo x da equação abaixo corresponde à diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de sulfato ferroso.

As soluções empregadas nesta análise podem ser observadas no QUADRO 5 (RUFINO et al, 2006 com modificações).

FIGURA 9 – EQUAÇÃO DA RETA EMPREGADA NO CÁLCULO DO FRAP

$$y = ax + b$$

Nota: y = Absorbância correspondente a 1.000 µM de sulfato ferroso.
x = Diluição da amostra (mg/L) equivalente a 1.000 µM de sulfato ferroso.
Fonte: Rufino et al., (2006), com modificações.

O resultado encontrado (x) na equação anterior foi dividido por 1.000 para obtenção do seu valor em gramas. O resultado final (Z) é calculado pela divisão de 1.000 (µM) pelo valor de X (g) e multiplicado por 1 (g) que é expresso em µM sulfato ferroso/g de extrato. As médias obtidas ao final do teste foram comparadas pelo teste de Tukey (p < 0,05), utilizando o Software Sisvar.

QUADRO 4 – DILUIÇÕES UTILIZADAS NA METODOLOGIA DO FRAP

Extrato	Diluições
Hexano micélio	700; 750; 800; 900; 950
Clorofórmio micélio	300; 400; 500; 700; 800
Acetato de etila micélio	100; 200; 500; 550; 600
Metanol micélio	1000; 1100; 1300; 1400; 1500
Etanol/água micélio	400; 450; 500; 700; 850
Acetato de etila meio	400; 450; 600; 650; 700

Fonte: A autora (2021).

QUADRO 5 – SOLUÇÕES UTILIZADAS NA METODOLOGIA DO FRAP

Solução	Constituintes e Preparo
Solução de TPTZ 10 Mm	Dissolveu-se 3,12 g de TPTZ em, aproximadamente, 5 mL de HCl 40 mM completando-se o volume para 1 L em um balão volumétrico com HCl 40 mM
Solução de Cloreto Férrico 20 mM	5,4 g de cloreto férrico foi dissolvido em água destilada, Completando-se o volume para 1 L em um balão volumétrico com o mesmo solvente
Tampão Acetato 0,3 M, pH 3,6	Dissolveu-se 3,1g de acetato de sódio em 16 mL de ácido acético glacial, completando-se o volume para 1 L em um balão volumétrico com água destilada
Solução do Reagente FRAP	Obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM
Solução Padrão de Sulfato Ferroso 2 Mm	27,8 mg de sulfato ferroso foi dissolvido em água destilada completando volume para 50 mL em um balão volumétrico com o mesmo solvente

Fonte: A autora (2021).

3.12 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELA METODOLOGIA DO FOSFOMOLIBDÊNIO

Este ensaio foi realizado para avaliar a atividade de compostos lipofílicos e hidrofílicos e baseia-se na redução do molibdênio VI em molibdênio V na presença de substâncias com atividade antioxidante, levando a formação de um complexo verde fosfato/molibdênio. Como padrões empregou-se a Vitamina C, BHT e a Rutina por apresentarem conhecidas capacidades antioxidantes já descritas na literatura (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Em um tubo de ensaio foram depositados 0,3 mL das amostras de extratos (hexano do micélio, clorofórmio do micélio, acetato de etila do micélio, metanol do micélio, etanol/água do micélio e acetato de etila do meio) e polissacarídeos na concentração de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol) foram pipetadas, sendo adicionadas a estas 1 mL de reativo (28 mL de solução de fosfato de sódio 0,1M; 12 mL de molibdato de amônio 0,03M; 20 mL de ácido sulfúrico 3M; e , água destilada qsp 100 mL). Os tubos foram levados ao banho termostaticado, a 95 °C, por 90 min, sendo posteriormente, resfriados a temperatura ambiente. As amostras foram pipetadas em placa de Elisa de 96 poços e em espectrofotômetro realizou-se a leitura da absorbância em comprimento de onda de 695 nm (BIANCO, 2003). Como padrões foram empregados à vitamina C, BHT e a rutina. A absorbância da amostra pura foi medida sendo o valor da sua coloração descontado.

A propriedade antioxidante dos extratos e polissacarídeos foi avaliada com

base na FÓRMULA 4 (FIGURA 10) e a análise estatística foi realizada aplicando o teste de Tukey.

FIGURA 10 – FÓRMULA 4: % DE PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE FRENTE AO PADRÃO

$$\text{AA\% em relação ao padrão} = \frac{\text{Absorbância (amostra)} - \text{Absorbância (branco)}}{\text{Absorbância (padrão)} - \text{absorbância (branco)}} \times 100$$

Fonte: Bianco (2003).

3.13 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in vitro* DE *Diplodia pinea*

3.13.1 Frente à *Artemia salina*

Inicialmente, foi preparada uma solução de água salina com 38 g de sal marinho obtido comercialmente (marca Blue Greasure®) em 1000 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 9,0 com uma solução de Na₂CO₃ mantendo-o pH na faixa de 6 a 10,5 (LEWAN et al., 1992). Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados na água salina durante 48 h, em BOD com fotoperíodo de 12 h ligado, sob aeração contínua e temperatura controlada entre 27 e 30 °C, para eclosão dos ovos. Os extratos do micélio e do meio foram diluídos em metanol, sendo o solvente evaporado em estufa a 40 °C por 24 h. Como controle positivo, foi utilizado SDS, nas mesmas concentrações das amostras e como controle negativo o metanol, sendo que todos os testes foram realizados em triplicata.

Após a eclosão dos ovos, 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para eppendorfs, sendo adicionados os extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol, etanol/água 1:1 (v/v) e o extrato acetato de etila bruto do meio, nas concentrações de 10, 100, 250, 500 e 1000 µg.mL⁻¹. Foram realizados os mesmos procedimentos com os controles positivo e negativo. Após 24 h foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas. Os dados foram analisados com o método estatístico IBM SPSS 22 sendo que foi possível determinar os valores de CL₅₀ com 95% de intervalo de confiança. Os extratos considerados ativos foram os que apresentaram um valor de CL₅₀ inferior a 1000 ppm (MEYER et al., 1982).

3.13.2 Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica dos extratos foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Banerjee et al. (2008) com adaptações, o ensaio foi realizado em triplicata. Inicialmente o sangue de carneiro (Newprov[®]) foi levemente homogeneizado, sendo que 5 mL foram transferidos para um tubo Falcon de vidro, sendo este centrifugado por 5 min a 3000 rpm. Posteriormente foi realizada a lavagem com tampão fosfato-salino (PBS) até que o sobrenadante ficasse totalmente incolor, para isso foram adicionados 3 mL da solução de PBS (tampão fosfato salino) e realizada a centrifugação por 50 min a 3000 rpm. Por fim a papa de eritrócitos obtida foi diluída com PBS para obtenção de uma suspensão com concentração de 2%.

Neste ensaio foram utilizados os extratos nas concentrações de 1000, 750, 500, 250 e 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. A diluição das amostras foi realizada com 10% de metanol e PBS. Como controles foram utilizados 200 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ de PBS em 200 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ de solução de eritrócito a 2% (controle negativo), 200 μL de água destilada (controle positivo) e 200 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ de metanol (branco). Dentro de eppendorfs foram pipetados 200 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ das amostras e 200 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$ de solução de eritrócitos a 2%. Estes foram homogeneizados manualmente (sob agitação suave) e incubados, destampados, em estufa por 3 h a 37 °C. Posteriormente realizou-se a centrifugação dos mesmos a 3000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi pipetado em placa de Elisa de 96 poços sendo por fim realizada a leitura em espectrofotômetro marca Multiskan FC Thermo Scientific[®] com comprimento de onda em 540 nm. A absorbância da amostra pura foi lida no mesmo comprimento de onda sendo seu valor posteriormente descontado. Para a quantificação da hemólise, o valor foi calculado em porcentagem, considerando como valor de 100% a absorbância lida no tubo de hemólise total. Os resultados obtidos foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o Software Sisvar.

3.14 ESTUDO ALELOPÁTICO

A alelopatia mede a influência, direta ou indireta, de metabólitos produzidos por um organismo para estimular ou inibir o crescimento e germinação do organismo testado. O potencial alelopático foi testado com os extratos hexano, clorofórmio,

acetato de etila, metanol, etanol/H₂O e meio. Foram testados o crescimento e a germinação, empregando-se sementes de *Lactuca sativa* (fabricante Agristar do Brasil LTDA lote 042016, 99% de pureza e 95% de germinação) e *Allium cepa* (fabricante Isla Pak lote 111132-002-S2, 80% de pureza e 99,9% de germinação). Gerbox contendo papel de filtro Whatman® foram preparadas em quadruplicata com cada extrato nas concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg.mL⁻¹. Como controle foram empregados água e metanol. Posteriormente, 6 mL de amostra foram pipetados em cada gerbox, após evaporação dos solventes, cinco sementes de *L. sativa* e *A. cepa* foram semeadas por quadrante. As gerbox foram colocadas em BOD com condições controladas de luz 160 W, umidade de ± 80% e temperatura de 25 °C. Foram realizados os testes de germinação e crescimento. O experimento foi realizado com material previamente autoclavado e em fluxo laminar (MACIAS et al., 2000; CHON et al., 2005; DIAS et al., 2005).

No teste de germinação foi realizada a leitura diária de todas as amostras testadas, no mesmo horário durante 7 dias para *Lactuca sativa* e 12 dias para *Allium cepa*. As sementes germinadas foram retiradas a cada leitura, foi calculada a velocidade de germinação segundo Maguiare (1962) utilizando a fórmula 4: $IVG = (G_1/N_1) + (G_2/N_2) + (G_3/N_3) \dots + (G_n/N_n)$. No qual N é o número de dias e G é o número de plântulas computadas por dia a cada contagem. O teste do crescimento foi realizado no último dia medindo-se o crescimento do hipocótilo e da radícula com auxílio de papel milimetrado. O nível de atividade foi expresso em porcentagem de inibição/estímulo de acordo com a FÓRMULA 5 (FIGURA 11) e a análise estatística foi realizada com auxílio do teste de Scott Knot utilizando o Software Sisvar.

FIGURA 11 – FÓRMULA 5: % DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA

$$\% \text{ atividade} = MT - MC \times 100\%$$

Nota: MT é a média de alongamento dos tratamentos e MC a média de alongamento do controle.

Fonte: Macias et al., (2000); Chon et al., (2005); Dias et al., (2005).

3.15 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL

Em uma placa de 96 poços foram semeadas $1,0 \times 10^4$ células/poço da linhagem H460 ou $1,5 \times 10^4$ células/poço da linhagem HeLa. As células foram mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C por 24 h para adesão. Depois, as células foram

tratadas com os extratos em concentrações de 10 e 50 µg/mL e deixadas sob tratamento por 72 h 5% de CO₂ e 37 °C. Após esse tempo, o tratamento foi removido e adicionou-se 100 µL de solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazólio) a 0,5 mg/mL em PBS por 4 h. Depois a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan foram eluídos com solução de DMSO/Etanol (1:1). A placa foi lida em leitor de microplaca MultiScan FC (Thermo Scientific) em 570 nm. O resultado foi expresso em porcentagem de inibição de crescimento de células tumorais em relação ao controle (0,1% de DMSO v/v) (MOSMANN, 1983).

3.16 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para teste do potencial microbiológico dos extratos obtidos do fungo *D. pinea* adotou-se a metodologia de Veiga et al. (2019). Foram testados os extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol, etanol/água do micélio e acetato de etila do meio, frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8738 e *Candida albicans* ATCC 10231.

Inicialmente foram preparados inóculos para cada um dos microrganismos com salina a 0,9%, na concentração 0,5 µL na escala de McFarland. Após crescimento dos mesmos nos meios TSA (para bactérias) e Sabouraud (para *Candida albicans*) por 24 h os mesmos foram reservados. Os extratos foram diluídos utilizando água destilada e uma mistura de água destilada com DMSO a 10%, devido ao perfil de solubilidade de alguns extratos, nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,6 e 7,8 µg/mL. Como controles negativos foram empregados o cloranfenicol 250 µg/mL e cetoconazol 500 µg/mL, como controle positivo foi utilizado o microrganismo e caldo de cultivo, e o branco foi feito somente com as amostras e salina 0,9%.

Em microplacas de 96 poços as análises foram realizadas em triplicata, 100 µg/mL de caldo Mueller Hinton (bactérias) e Sabouraud (fungo) foram pipetados, em seguida, adicionou-se 100 µg/mL de cada amostra nas diferentes concentrações testadas, sendo por último adicionado o inóculo. As placas foram incubadas a 35 °C por 22 h. Transcorrido esse tempo adicionou-se a todos os poços 20 µg/mL de TTC a 0,125%. As placas foram incubadas novamente por 2 h a 35 °C. Posteriormente foi realizada a leitura visual de ausência ou presença de crescimento. Em caso de

ausência de crescimento, com auxílio de alça a amostra foi retirada do poço e plaqueada em meio ágar Mueller Hinton (bactérias) e ágar Sabouraud (fungo), as quais permaneceram por 20 h em estufa a 35 °C sendo observada ausência (bactericida) ou presença de crescimento (bacteriostático) (VEIGA et al., 2019).

3.17 ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS

Para a avaliação da atividade larvicida, foram testados os extratos obtidos do micélio fúngico (hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e etanol/água) e caldo de cultivo (acetato de etila).

A metodologia empregada para avaliação quantitativa da atividade larvicida foi adaptada de Garcez et al. (2013) e Betim et al. (2019). Para a avaliação da atividade dos extratos, ovos de *Aedes aegypti* (cepa Rockefeller cedida pela Fundação Oswaldo Cruz) foram eclodidos em laboratório a 25 ± 3 °C, umidade relativa de 80%, em estufa BOD, e alimentados com ração para peixes (Alcon basic, complexo MEP 200) até o terceiro estágio de desenvolvimento larval. Os extratos (amostras) foram diluídos em 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e foram empregadas concentrações de 1000, 100 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após a eclosão, 10 larvas foram tratadas com água, DMSO e com os extratos de *D. pinea* por 24h. Posteriormente, as larvas vivas e mortas foram contadas para cada tratamento. O teste foi conduzido em triplicata (30 larvas para cada concentração de amostra).

O método Probit foi usado para determinar os valores da concentração letal (LC_{50}), que corresponde a intervalos de confiança de 95%. O teste do qui-quadrado também foi realizado para o ensaio. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando IBM SPSS Statistics versão 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA)

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as atividades da avaliação da propriedade antioxidante e atividade hemolítica os resultados foram apresentados com média $\pm$ desvio padrão (DP) e o valor de $p < 0,05$ foi empregado para indicar as diferenças significativas entre os valores médios obtidos que foram determinados pela análise de variância com a assistência do software IBM SPSS Statistics versão 20.0. Os resultados obtidos foram comparados usando a análise de variância unidirecional e multivariada

(ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. O método de Probitos foi utilizado para determinar os valores de CL_{50} no ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* com auxílio do software IBM SPSS Statistics versão 20.0. Os dados obtidos no estudo alelopático foram submetidos a análise de variância, e as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Scott Knot ($p < 0,05$), utilizando o software Sisvar. No ensaio de avaliação da atividade larvicida o método Probito foi usado para determinar os valores da concentração letal (LC_{50}) e o teste do qui-quadrado também foi realizado para o ensaio, as análises estatísticas foram realizadas usando o software IBM SPSS Statistics versão 20.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO *in vitro* DOS FUNGOS

A produção do fungo foi realizada na Embrapa Florestas como descrito previamente em metodologia a partir de uma cultura em placa do fungo *D. pinea* (FIGURA 12).

Obteve-se rendimento de aproximadamente 0,9 g de micélio antes da secagem, 0,4 g após secagem e 50mL de meio para cada frasco de cultivo incubado.

Depois da retirada de todos os cultivos foram observadas as características da colônia do fungo puro, o meio de cultivo foi observado quanto a suas características de odor, cor e turbidez, para garantia da pureza do inóculo. O fungo *D. pinea* apresenta colônias de coloração clara com 7 dias, coloração essa que muda ao longo do cultivo se enegrecendo. O fungo não causa turbidez nem alteração no odor do meio de cultivo pós seu crescimento. A FIGURA 13 mostra o aspecto do meio de cultivo após filtração (A), o aspecto característico do micélio do fungo (B) e o aspecto da cultura com o aumento em lupa (C).

FIGURA 12 – CULTURA DE *Diplodia pinea* EM PLACA CONTENDO MEIO BDA



Fonte: A autora (2021).

FIGURA 13 – ASPECTOS MACROSCÓPICOS DO FUNGO *Diplodia pinea*

Fonte: A autora (2021).

O *D. pinea* apresentou micélio de cor clara aos 7 dias de cultivo em caldo BD. O fungo não causou turvação nem alteração de odor do meio de cultura. A metodologia utilizada no cultivo do fungo indicou uma menor produção de biomassa devido ao curto tempo de incubação. A ausência de aeração e do uso de biorreatores, assim como a baixa temperatura, são fatores estressantes, que também diminuíram a produção micelial, entretanto esses fatores são responsáveis pela maior produção de metabólitos primários e secundários pelo fungo, justamente por ele estar em condições de cultivo desfavorável (ANDRADE et al., 2010).

A família *Botryosphaeriaceae*, dentro da qual se encontra a espécie *D. pinea*, está entre os patógenos fúngicos que causam grande impacto às culturas agrícolas, ecossistemas florestais urbanos e naturais. As espécies de *Diplodia* são consideradas como patógenos bastante agressivos que causam murcha de copa, cancro e morte do caule, em coníferas. Como exemplos de diferentes espécies do gênero *Diplodia* pode-se citar o *D. pinea*, *D. corticola*, *D. quercivora*, *D. scrobiculata* e *D. seriata* (HLAIEM et al., 2021).

Diplodia pinea é um patógeno oportunista que causa doenças quando as árvores estão submetidas a estresse biótico ou abiótico, sendo que a diversidade genética, distribuição e abundância em uma árvore individual saudável são desconhecidas (BIHON et al., 2011). Com ampla distribuição mundial, estudada pela capacidade de infectar em todos os estágios de desenvolvimento da planta (STANOSZ et al., 1999) há relatos em que o fungo causa defesas metabólicas especializadas na mesma, isso se observa pela maior presença de metabólitos em vegetais infectados (SHERWOOD; BONELLO, 2013).

No entanto, estudos relacionados à busca de metabólitos secundários e atividades biológicas com o fungo e a partir de extratos do mesmo, ainda são escassos. Wada e Ishida (1979) caracterizaram moléculas pertencentes à classe

dos pentacetídeos para a espécie *D. pinea*, enquanto que Liu et al. (2019) encontraram dois novos terpenóides (pentanortriterpenóide, 23,24,25,26,27-pentanorlanost-7,9 (11) -dien-3 β , 22-diol e triterpenóide, lanost-8-en -3 β , 22S, 23S-triol), caracterizados na espécie *Diplodia cupressi*, com inibição sensível do crescimento de células tumorais *in vitro*.

A escassez de relatos de moléculas oriundas do metabolismo fúngico do gênero *Diplodia* está possivelmente ligada à complexidade da estrutura molecular, condições de obtenção e, consequentemente, elucidação estrutural (BRADY; CLARDY 2000).

4.2 TEOR DE UMIDADE E CINZAS

O teor de umidade e cinzas encontrado para o micélio fúngico foi de 94,4% e 2,17%, respectivamente (TABELA 1). Com base nesses resultados constata-se uma grande porcentagem de água retida no micélio possivelmente ligada a metodologia de cultivo utilizada que foi em meio líquido. Em comparação com estudos publicados para outros fungos como o *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus spp.*, o teor de cinzas é mais elevado, variando de 5,44 a 12% (FURLANI E GODOY, 2007; KALAC, 2009). Para o teor de umidade, Barber (2019) observou valor de 85% de umidade em um alimento parasitado por um fungo.

TABELA 1 – UMIDADE E CINZAS OBTIDOS PARA MICÉLIO DE *Diplodia pinea*

Amostra	Umidade %	Cinzas %
Micélio <i>in natura</i>	94,4 $\pm$ 0,04	2,17 $\pm$ 0,09

Fonte: A autora (2021).

A análise de umidade e cinzas é útil para o controle de qualidade de uma amostra, indicação de impurezas na mesma, comparação com a literatura de resultados obtidos anteriormente, ou descrição desses dois conteúdos físico-químicos quando ainda não incluídos em determinada amostra (ARAÚJO et al., 2006). Esses parâmetros são usados como controle de qualidade para plantas comestíveis e fungos. Ao avaliar o uso desse teste para microrganismos fitopatogênicos, observa-se uma grande ausência de relatos e estudos publicados a respeito, sendo que alguns estudos relatam um aumento no teor de umidade de uma

planta, dada a presença de um fungo conforme descrito por Ullah et. al. (2016). Portanto, este teste foi realizado para colaborar com a descrição físico-química de fungos fitopatogênicos, sugerindo ser um parâmetro simples e padronizado para o controle da pureza da cultura. Ressalta-se que nenhuma referência de valor foi encontrada para fungos fitopatogênicos produzidos *in vitro* em condições de estresse.

4.3 ANÁLISE TÉRMICA

É um conjunto de técnicas de análise na qual a variação da massa da amostra (perda ou ganho) é determinada em função da temperatura e/ou tempo, enquanto a amostra é submetida a uma programação controlada de temperatura. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa de substâncias como metabólitos primários e secundários, permitindo estabelecer a faixa de temperatura em que elas decompõem (CANEVALORO, 2004).

Pode-se estabelecer, portanto, que há diversas aplicações de análise térmica podendo-se citar a evaporação de líquidos de uma amostra, o estudo da decomposição térmica de compostos orgânicos, inorgânicos ou de substâncias poliméricas, o que propicia uma grande aplicabilidade dessa técnica em indústrias como a química, de alimentos e farmacêutica (CREMASCO; NAZARENO, 2011).

Os dados obtidos para análise térmica do micélio de *D. pinea* estão dispostos na TABELA 2.

TABELA 2 – RESULTADOS OBTIDOS POR EXPERIMENTO DE ANÁLISE TÉRMICA PARA O FUNGO *Diplodia pinea*

Resultados			
Etapas	$\Delta m/\%$	$\Delta T/^{\circ}\text{C}$	$T_p/^{\circ}\text{C}$
1	8,96	30-125,6	64,9
2	56,63	125,6 - 400,6	298,4
3	27,27	400,6 - 649,8	474,1

Nota: 1 – corresponde a perda de massa por umidade; 2 – corresponde a decomposição de compostos metabólitos secundários, flavonoides, taninos, terpenos; 3 – decomposição lenta de resíduos carbonados e polímeros e carbonização da matéria orgânica já que foi feito em atmosfera de ar sintético. $\Delta m/\%$ = perda de massa degradada em cada etapa. $\Delta T/^{\circ}\text{C}$ = variação de temperatura em cada etapa. $T_p/^{\circ}\text{C}$ = temperatura de pico em cada etapa.

Fonte: A autora (2021).

Na análise térmica consegue-se observar um perfil de degradação dos metabólitos primários e secundário em virtude do aumento da temperatura, dessa maneira na faixa de 30 °C a 125 °C tem-se a perda de umidade pela amostra, seguida da degradação de metabólitos secundários (126 °C a 400 °C), finalizando-se com a decomposição de polímeros e moléculas carbonadas (HAZRA et al., 2002; PRICE; HAWKINS, 1998, CREMASCO; NAZARENO, 2011).

Observando os dados obtidos (TABELA 2), pôde-se constatar que a maior quantidade de moléculas presentes na amostra, são os metabólitos secundários, observando-se uma perda de massa superior a 50% (56,6% da massa total). Em seguida, é possível observar a degradação de resíduos carbonados e polímeros pelo declínio de 27,3% da massa micelial restante.

Esses resultados são importantes por indicar de forma qualitativa a composição do micélio, além disso, os dados encontrados corroboram com o *screening* químico que indicou a presença de diferentes classes de metabólitos primários e secundários, os quais apresentam características biológicas de interesse (CREMASCO; NAZARENO, 2011).

4.4 PRODUÇÃO DOS EXTRATOS E DISLIPIDIFICAÇÃO MICELIAL

A produção dos extratos foi realizada em Soxhlet com 30 g de micélio liofilizado de *D. pinea* e 200 mL de meio concentrado (obtido a partir de 2,5 L de meio de cultivo). Estes extratos foram utilizados em todos os testes e a partir dos mesmos foram realizados o isolamento de metabólitos. O rendimento obtido está descrito na TABELA 3.

TABELA 3 – RENDIMENTO DOS DIFERENTES EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DO MICÉLIO DE *Diplodia pinea*

Extratos	Massa	Rendimento
Hexano (micélio)	0,82 g	2,73%
Clorofórmio (micélio)	0,90 g	3%
Acetato de Etila (micélio)	0,50 g	1,67%
Metanol (micélio)	14,2 g	47,33%
50%Etanol/50%H ₂ O (micélio)	2,75 g	9,16%
Acetato de Etila (meio)	0,50 g	1,67%

Fonte: A autora (2021).

Com base nos resultados apresentados pode-se observar um alto rendimento para o extrato obtido com o solvente metanol.

O método de extração escolhido que partiu de solventes de menor para maior polaridade por Soxhlet modificado permite uma extração de maior qualidade, pois o solvente passa exaustivamente pela amostra, além disso, é sustentável do ponto de vista ambiental por não utilizar grandes volumes de solvente. Além disso, o emprego de diferentes solventes separa/fraciona previamente os extratos por ligar as moléculas químicas de cada extrato por afinidade química (CARVALHO et al., 2009).

Observa-se que o álcool metílico, devido a sua polaridade, tem a capacidade de se ligar a moléculas de diferentes grupos de metabólitos como ácidos graxos, compostos fenólicos e antocianinas, por exemplo, o que explica o melhor rendimento para este extrato (PEREIRA; ANDRADE, 1998; RODRIGUES et al., 2016).

4.5 EXTRAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DE CARBOIDRATOS

Os valores de rendimentos foram superiores para o polissacarídeo extraído do caldo de cultivo. Isso se dá pelo fato da metodologia de cultivo do fungo ser privada em partes de suporte de oxigênio, em temperatura mais baixa e um curto período de tempo. Neste cenário observou-se que o fungo em crescimento consumiu

a fonte de carbono do meio para crescer e se manter vivo, estando seu metabolismo muito ativo nesta fase, pois o mesmo ainda não alcançou o platô. Quanto aos valores menores encontrados para os endopolissacarídeos (TABELA 4), isso ocorre possivelmente, pois o fungo consumiu a fonte de carbono do meio (glicose) e gerou um metabólito que é excretado para o meio de cultivo. Como os valores encontrados para o polissacarídeo do meio foram demasiadamente altos se comparados com os da literatura foi realizado um teste com iodo para observar se este alto rendimento não era na realidade glicose advinda do meio de cultivo.

Após a prova do iodo comprovou-se que a amostra 7 era composta basicamente do carboidrato glicose, possivelmente advinda do meio de cultivo, essa amostra foi desconsiderada sendo processadas nos testes de *screening* químico e propriedade antioxidante, somente as amostras com rendimento de extração satisfatório (acima de 20 mg).

Observou-se ainda que após algumas extrações no processo de purificação por gelo e degelo, cada amostra gerou 2 subprodutos, um solúvel e outro insolúvel. Ambos foram separados após centrifugação, como já descrito, e quantificados separadamente (TABELA 4).

TABELA 4 – RENDIMENTO (mg) PARA OS POLISSACARÍDEOS EXTRAÍDOS DO MEIO E MICÉLIO FÚNGICO DE *Diplodia pinea*

Material de partida	Amostra Nº extração	Quantidade obtida	Rendimento
Micélio	1a	34 mg (a)	2,3%
	1b	96 mg (b)	6,4%
Micélio	2a	127 mg (a)	8,5%
	2b	10 mg (b)	0,7%
Micélio	3 ^a	26 mg (a)	1,7%
	3b	21 mg (b)	1,4%
Micélio	4a	108 mg (a)	7,2%
	4b	22 mg (b)	1,5%
Micélio	5a	44 mg (a)	2,9%
	5b	10 mg (b)	0,7%
Micélio	6a*	0 mg (a)	0%
	6b*	0 mg (b)	0%
Meio de cultivo	7b	5,34 g	76 %

Nota: a) Fração solúvel em água; b) Fração insolúvel em água. * Para essa amostra não foi observada precipitação de polissacarídeos.

Fonte: A autora (2021).

4.6 Screening POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA - CCD

Após *screening* realizado por CCD, constatou-se positividade para possível presença de esteroides, triterpenos e compostos fenólicos (TABELA 5), estes metabólitos são importantes devido à sua atividade biológica já relatada e amplamente estudada.

Quanto ao *screening* de carboidratos, o mesmo foi realizado para as amostras oriundas da extração aquosa do micélio e meio de cultivo comparando-se os resultados da amostra com diferentes padrões comerciais com o objetivo de identificar carboidratos de interesse biológico, direcionando as análises posteriores realizadas. Estes resultados estão mostrados na TABELA 6.

TABELA 5 – ANÁLISE DE CCD DO MICÉLIO E DO MEIO DE CULTIVO DE *Diplodia pinea*

	Esteroides e Triterpenos	Compostos Fenólicos	Alcaloides e Cumarinas
Hexano (micélio)	+	+	-
Clorofórmio (micélio)	+	+	-
Acetato De Etila (micélio)	+	+	-
Metanol (micélio)	+	+	-
Etanol/H ₂ O (micélio)	-	+	-
Acetato De Etila (meio)	+	+	-

Fonte: A autora (2021).

Metabólitos secundários podem ser descritos como compostos naturais de estruturas químicas polares ou apolares, que podem apresentar propriedades biológicas de interesse. Esses compostos podem ser didaticamente divididos em três grupos principais: os da classe dos terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. As rotas biossintéticas para produção de metabólitos secundários diferem dependendo do grupo químico, pode-se citar como exemplo a biossíntese a partir de metabólitos primários ou a pela via do ácido chiquímico (BORGES &

AMORIM, 2020).

Terpenos são hidrocarbonetos naturais que servem de base para muitas estruturas com diferentes funções no metabolismo especializado e primário, variando de moléculas bastante pequenas e voláteis (por exemplo, mono e sesquiterpenos) a hormônios como ácido abscísico e giberelinas. Diversos papéis funcionais dos terpenoides são estudados. São considerados compostos bioativos tendo ações relatadas na literatura como o seu potencial aleloquímico e inseticida (RODRIGUES et al., 2016; KORTBEEK et al., 2019).

Os compostos fenólicos são provenientes da via do acetato e da rota do ácido chiquímico. Possuem ações biológicas de amplo interesse como a função antisséptica e anestésica (RODRIGUES et al., 2016). Como exemplo de componentes desse grupo de metabólitos pode-se citar os taninos, que são compostos fenólicos de alto peso molecular, solúveis em água e álcool e se destacam como antissépticos, e os flavonoides que possuem propriedades bactericida, fungicida, adstringente e anti-inflamatória, por exemplo (BORGES; AMORIM, 2020).

Os carboidratos são conhecidamente fornecedores de energia para a sobrevivência dos fungos, têm interesse científico e técnico para a indústria farmacêutica e de insumos. Os monossacarídeos podem ser definidos como unidades de carboidratos simples. Esses compostos não são polarizados, não sofrem hidrólise e possuem um grupo funcional que os classifica como cetose ou aldoses. Vários estudos indicam que esses metabólitos têm demonstrado atividades biológicas importantes, como antineoplásica, antiviral e antifúngica (APPELT et al., 2013). Seguem-se os resultados qualitativos de análise de CCD dos carboidratos obtidos se micélio (TABELA 6).

TABELA 6 – ANÁLISE DE CCD SEGUNDO DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE MICÉLIO DE *Diplodia pinea*

Padrões	Extração 1	Extração 2	Extração 3	Extração 4	Extração 5	Extração 7
Glicose	+	-	-	+	-	+
Arabinose	-	+	+	-	-	-
Manose	+	+	+	-	-	+
Maltose	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	-	-	-	+	-
Xilose	-	-	-	+	+	-
Trealose	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-

Nota: Para a extração 6 como não houve precipitação, não se obteve amostra.

Fonte: A autora (2021).

A glicose (FIGURA 14A) é um cristal sólido, de sabor adocicado, encontrado na natureza na forma livre ou combinada. É um monossacarídeo e contém seis átomos de carbono e um grupo aldeído o que a caracteriza como uma hexose ($C_6H_{12}O_6$). No metabolismo é considerada uma das principais fontes de energia sendo armazenada na célula em forma de ATP. Quando consumida em alimentos é rapidamente absorvida, utilizada como fonte de energia imediata ou armazenada no fígado e no músculo na forma de glicogênio muscular (PINHEIRO et al., 2005).

Arabinose (FIGURA 14B) é um monossacarídeo do tipo aldopentose de fórmula molecular $C_5H_{10}O_5$. É considerada a segunda pentose mais abundante da natureza sendo encontrada nos polissacarídeos vegetais hemicelulose e pectina. Estudos anteriores mostram que essa molécula é considerada um ponto de partida promissor para o desenvolvimento e produção de biocombustíveis e outros bioprodutos, sendo já relatada sua produção por fungos como o *Aspergillus niger* e *Trichoderma reesei*, e bactérias como a *Escherichia coli* (BETTER, 1999; SEIBOTH; METZ, 2011).

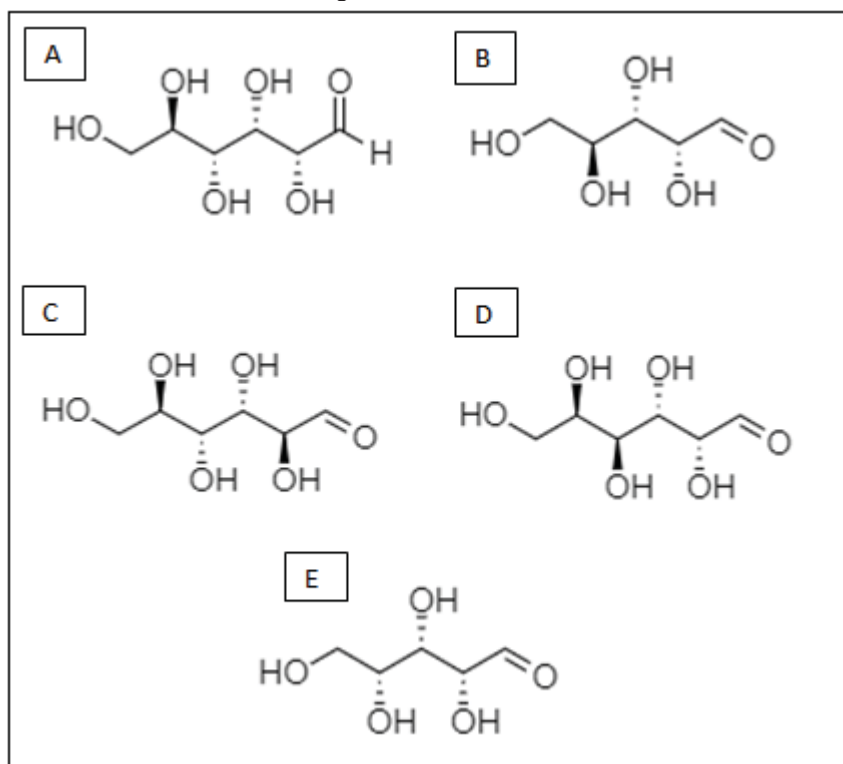
A manose (FIGURA 14C) é um monossacarídeo considerado uma hexose devido à sua fórmula estrutural $C_6H_{12}O_6$. Esse carboidrato é encontrado na natureza e apresenta aplicabilidade na área médica, devido a relatos da sua efetividade na prevenção de infecção do trato urinário (ITU), atuando também de maneira efetiva no tratamento da ITU. Essas propriedades biológicas são consideradas importantes bem como alternativas para um menor uso de antibióticos (MILANDRI, 2019).

A galactose (FIGURA 14D) é considerada um açúcar simples de fórmula $C_6H_{12}O_6$. É encontrada naturalmente no leite, em leveduras e em outras fontes vegetais. Pertence quimicamente ao grupo das aldo-hexoses e se forma por dissociação eletrolítica da lactose (JURADO et al., 2002; SANTIAGO, et al., 2004).

A xilose (FIGURA 14E) é um monossacarídeo do tipo aldopentose ($C_5H_{10}O_6$) obtida majoritariamente pela hidrólise dos xilanos que compõe a hemicelulose. As xilanases são enzimas hemicelulolíticas que podem ser encontradas em fungos e agem na degradação da hemicelulose, liberando pentoses como a xilose, esse fato é importante, pois, do ponto de vista biotecnológico, essas enzimas são importantes para a produção do bioetanol de segunda geração (LARA, 2013).

Dessa maneira, é possível visualizar as diferentes e importantes aplicabilidades dos monossacarídeos produzidos pelo fungo *D. pinea* em diversas áreas.

FIGURA 14 – MONOSSACARÍDEOS PRODUZIDOS PELO FUNGO *Diplodia pinea* COM BASE EM *Screening* QUÍMICO REALIZADO



Fonte: A autora (2021).

4.7 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS

4.7.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas - CGMS

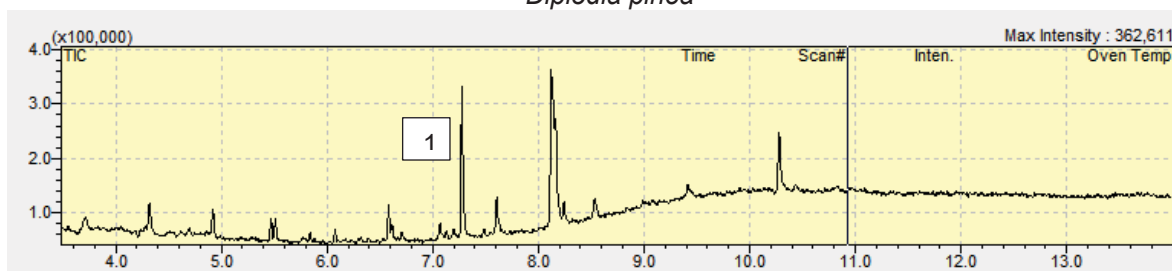
Essa metodologia foi realizada para o extrato hexano (FIGURA 15) sendo o cromatograma obtido observado na FIGURA 16. Foram predominantemente observados 3 picos, podendo-se sugerir a identificação do composto ácido palmítico de acordo com a fragmentação espectral de cada pico e comparação direta com a biblioteca espectral de massa NIST14.

FIGURA 15 – EXTRATO HEXANO ANALISADO POR CG-MS



Fonte: A autora (2021).

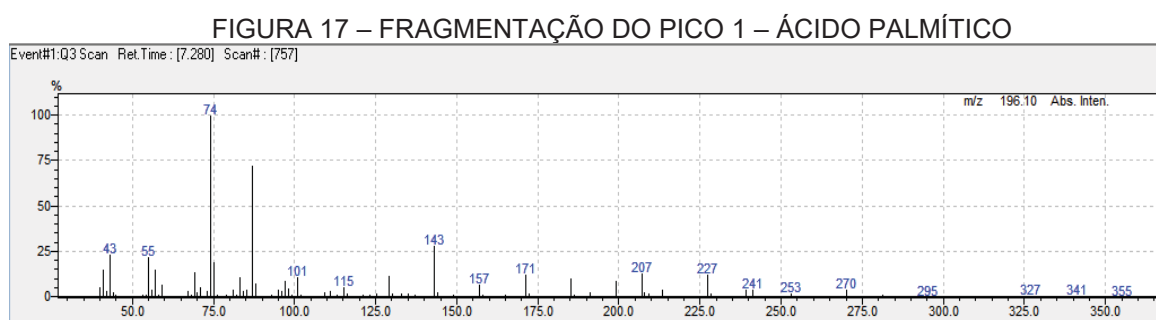
FIGURA 16 – PERFIL DO CROMATOGRAMA OBTIDO PARA EXTRATO HEXANO DO MICÉLIO DE *Diplodia pinea*



Nota: 1 – pico com a fragmentação identificada.

Fonte: A autora (2021).

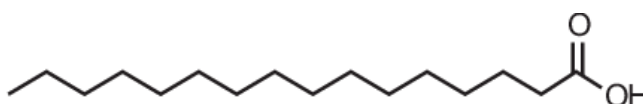
O espectro do éster metílico do ácido palmítico (FIGURA 17) apresentou o íon molecular m/z 270 e pico base de m/z 74 que corresponde ao íon $[\text{CH}_2\text{C}(\text{OH})\text{OCH}_3]^+$ característico da quebra da ligação β em relação ao grupo $\text{C}=\text{O}$. Ainda, de acordo com a literatura outros fragmentos de quebras sucessivas de ligações C-C que podem ser encontrados neste espectro como o pico de m/z 43, além dos fragmentos com oxigênio como os representados pelos picos m/z 101, 143, 157 e 171, por exemplo. Observa-se ainda que o perfil de fragmentação apresenta intervalo de 14 unidades de massas o que corresponde a perda dos grupos CH_2 , caracteristicamente encontrados em hidrocarbonetos e ácidos graxos (SILVERSTEIN et al., 2007; OLIVEIRA, 2019).



Fonte: A autora (2021).

O ácido palmítico ($\text{C}_{16:0}$) - $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ (FIGURA 18) é um ácido graxo saturado, de cadeia longa e encontrado em diferentes fontes. Nos fungos esse ácido já foi descrito em diversas espécies como no *Rhizopus arrhizus*, *Cunninghamella echinulata*, *Mucor hiemalis*. São sintetizados de forma bastante simples, para o armazenamento de substâncias de reserva do microrganismo. Observa-se também que o microrganismo é capaz de alterar a quantidade de ácido produzido em função das condições de cultivo, como fonte de oxigênio, carboidratos e pH (SORGER; DAUM, 2003; CONCEIÇÃO, 2015).

FIGURA 18 – ÁCIDO PALMÍTICO



Fonte: A autora (2021).

Várias espécies de leveduras e fungos filamentosos têm a capacidade de sintetizar e acumular grandes quantidades de triacilgliceróis dentro das suas células, fator promissor para a produção de biodiesel de terceira geração. Sendo assim, microrganismos que acumulem altos teores de lipídios, em particular ácidos graxos insaturados, são um caminho biotecnológico promissor para o desenvolvimento sustentável de processos e produtos economicamente mais viáveis (MENG et al., 2009; CONCEIÇÃO, 2015).

Por fim esse ácido também já demonstrou atividades biológicas satisfatórias como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antitumoral e alelopática (OLIVEIRA, 2015).

4.7.2 Composição monossacarídica por cromatografia gasosa – CGMS

Nesta metodologia foi possível observar a composição monossacarídica das amostras (TABELA 7 e TABELA 8) do polissacarídeo extraído do micélio (extração 1 com água em temperatura ambiente 25 °C) e do meio.

Inicialmente essas amostras foram testadas e sua composição monossacarídica definida em virtude da elucidação estrutural do polissacarídeo obtido na extração 1. Realizando esta pesquisa e a prova com iodo observou-se que a amostra precipitada do meio de cultivo em grande quantidade correspondia ao amido contido no meio de cultivo, por esse motivo a amostra foi arquivada.

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AMOSTRA POLISSACARÍDEO DO MICÉLIO EXTRAÇÃO 1

Carboidratos	Porcentagem
Galactose	57%
Glicose	33%
Manose	3,5%
Xilose	2,1%
Arabinose	2%
Fucose	1,3%
Ramnose	1,2%

Nota: extração 1 realizada com solvente H₂O a 25 °C a partir do micélio.
Fonte: A autora (2021).

TABELA 8 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA AMOSTRA POLISSACARÍDEO DO MEIO

Carboidratos	Porcentagem
Glicose	97%
Galactose	1%
Manose	1%
Xilose	0,5%
Fucose	0,5%

Fonte: a autora, 2021.

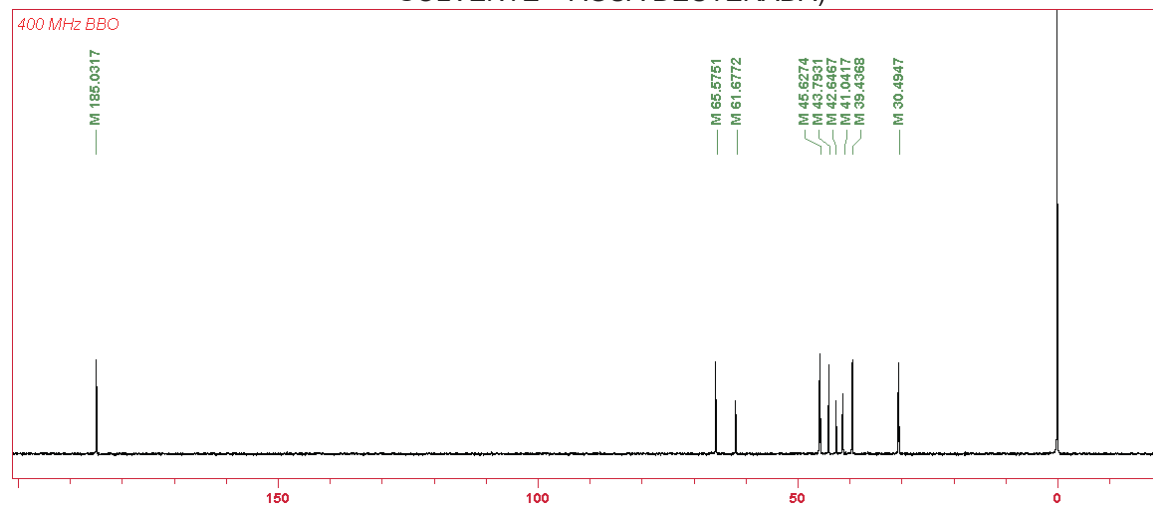
Este teste foi empregado como um norteador para avaliação das amostras, empregado no sentido de elencar quais delas são mais promissoras, incluindo este critério para estudos futuros, bem quais podem ser arquivadas otimizando o tempo de experimentação, equipamentos e reagentes de modo a não desperdiçar os mesmos.

4.7.3 Ressonância Magnética Nuclear - RMN

Essa técnica foi utilizada para avaliação de substâncias consideradas puras após realização de *screening* por CCD e para a análise de um polissacarídeo que se mostrou mais promissor durante as análises.

Ao longo da pesquisa foram isolados por coluna cinco compostos, porém devido à complexidade estrutural os mesmos não foram elucidados. Para um desses isolados o IS7, extraído durante o processo de dislipidificação do micélio fúngico (com os solventes metanol e clorofórmio), sugere-se fortemente à fórmula molecular $C_{12}H_{20}O_3$. Com base no espectro de RMN (FIGURA 19), concluiu-se que a estrutura química do IS7 não apresenta dupla ligação, não apresenta hidrogênio ácido e possivelmente não é um carboidrato. No espectro de ^{13}C é possível observar um sinal em δ 185 ppm que indicou a presença de um grupo carbonila e o sinal de dois carbonos oxigenados em δ 61,67 e δ 65,57 ppm.

FIGURA 19 – ESPECTRO DE $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ PARA ISOLADO IS7 (^{13}C : 100,6 MHz)
SOLVENTE – ÁGUA DEUTERADA)

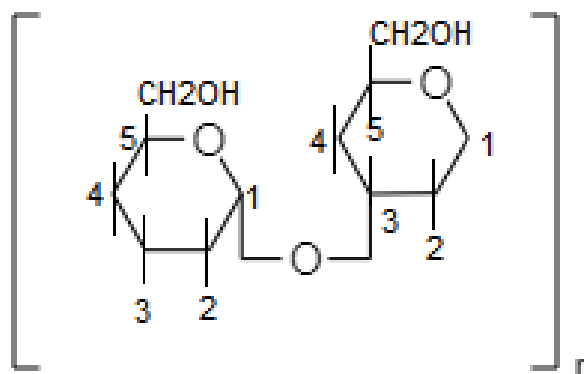


Fonte: A autora (2021).

Posteriormente se realizou a análise de RMN para o isolado polissacarídeo obtido a partir da extração com água a 25 °C.

Este isolado foi caracterizado como uma 1 $\rightarrow$ 3 alfa-Glucana (FIGURA 20). Os sinais correspondentes à mesma foram observados no espectro de RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ e ^1H . O mapa de correlação (experimentos 2D – HMBC e HMQC) apresentou na região anomérica os sinais em δ 100.4 e δ 5.10, correspondentes a ligação C1/H1 da α -Glc; δ 81.78 e δ 3.89 os sinais da ligação C3/H3 da α -Glc; em δ 71.67 e δ 3.602 observa-se a ligação C5/H5 da α -Glc; seguidos dos sinais em δ 70.03 e δ 3.506, e os sinais δ 61.29 e δ 3.48/3.49, que representam as ligações C2/H2 e C6/H6 da α -Glc, respectivamente (SMIDERLE, 2008, SHI et al., 2019).

FIGURA 20 – ESTRUTURA DA 1 $\rightarrow$ 3 ALFA-GLUCANA



Fonte: A autora (2021).

Devido ao seu alto potencial de aplicabilidade, os polissacarídeos são objeto de intensa pesquisa em setores variados. Os biopolímeros de origem fúngica apresentam propriedades similares ou superiores aos tradicionais. Além disso, não estão expostos às alterações climáticas, de colheita ou contaminação marinha, que costumam prejudicar sua oferta e alterar o custo da produção. Com controle cuidadoso, esses polissacarídeos também são menos susceptíveis à variação das propriedades físico-químicas em sua produção, mantendo o padrão de qualidade. Além disso, sua recuperação e purificação apresentam menos dificuldades se comparadas aos vegetais, devido às técnicas de genética molecular que permitem a obtenção de polissacarídeos fúngicos com propriedades específicas (SILVA et al., 2006, SHI et al., 2019).

Há uma vasta ausência de estudos enfocando polissacarídeos do fungo *D. pinea*, e os estudos com alfa glucanas ainda não é tão vasto, entretanto a mesma já foi observada em outros fungos como *Aspergillus niger*, *Armillaria tabescens*, *Lentinula edodes*, por exemplo, (SILVA, 2006; SYNYTSYA; NOVAK, 2014).

Os polissacarídeos fúngicos são conhecidos geralmente devido às suas propriedades espessantes, geleificantes e emulsificantes, observando-se a aplicação destas moléculas na saúde humana. Várias pesquisas com estas moléculas já identificaram o seu potencial antitumoral, sendo esta uma atividade biológica observada em glucanas. Tem-se descrito também seu potencial anti-inflamatório, no tratamento da artrite reumatóide, na imunomodulação e atuando como protetor contra danos oxidativos, o que justifica sua pesquisa em virtude da sua aplicabilidade (SYNYTSYA; NOVAK, 2013; HAN et al., 2011, FELICE et al., 2020).

4.7.4 Difração de Raios X – Cristalografia

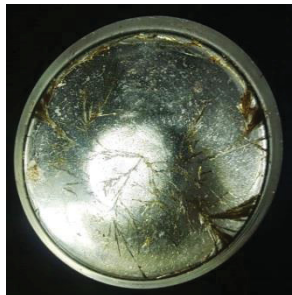
Estudos publicados nos últimos anos vêm estabelecendo de maneira factível que os fungos têm demonstrado grande impacto ambiental, diversidade e distribuição na natureza (PINTO et al., 2002; RANI et al., 2017; YUNES; CALIXTO 2001). No entanto, pesquisas sobre o potencial de biossíntese em moléculas de fungos se destacam pela escassez de estudos em biotecnologia no desenvolvimento sustentável, que pode ser considerada uma alternativa promissora na síntese química de moléculas. Além disso, os fungos podem sofrer interferência de outros organismos, ou passar por diferentes condições de estresse, que alteram sua via

metabólica por meio da produção de diferentes moléculas (KUSARI et al., 2013).

Para uma fração obtida a partir do extrato metanol, foi possível a obtenção um mono cristal refratável (FIGURA 21), que posteriormente foi submetido a metodologia de difração de raios X

Como resultado do experimento, os parâmetros de célula unitária deste mono cristal pode ser visto na TABELA 9, sendo possível que, de acordo com o arranjo espacial, átomos encontrados e dados registrados no The Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC) e Fachinformationszentrum Karlsruhe (FIZ), depósito DMANTL02, o composto seja caracterizado como sendo D-manitol (FIGURA 22) (MOURA et al., 2021).

FIGURA 21 – CRISTAL REFRATÁVEL (D-MANITOL)



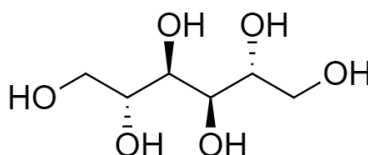
Fonte: A autora (2021).

TABELA 9 – DADOS DE CÉLULAS UNITÁRIAS OBTIDOS PARA O MONO CRISTAL POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X

Sistema Cristalino	Ortorrômico P
A	5.55 Å
B	8.69 Å
C	16.91 Å
$\alpha = \beta = \gamma$	90 graus
Volume	816 Å

Fonte: A autora (2021).

FIGURA 22 – ESTRUTURA DO COMPOSTO ISOLADO (D-MANITOL)



Fonte: A autora (2021).

O D-manitol é um carboidrato natural encontrado em vegetais, exsudatos de árvores, algas marinhas, com escassez no Reino Animal (CALMES et al., 2013), obtido por extração em álcool sob aquecimento. Este monossacarídeo, embora amplamente distribuído, não foi encontrado em quantidades abundantes em fontes naturais (OLIVEIRA et al., 2009; CALMES et al., 2013). Dentre essas fontes, as mais relevantes são os micélios e os corpos de frutificação dos fungos, o que torna extremamente importante o relato de novas fontes de obtenção desse produto, como a descrição do D-manitol em *D. pinea*.

Quimicamente, é uma molécula muito versátil com aplicações na indústria farmacêutica, como excipiente; na indústria de alimentos, como coadjuvante para melhorar o sabor de alguns produtos; e na área médica, por ser um diurético osmótico. Devido à sua conformação química, pode ser utilizado na síntese de diversos ligantes quirais e na síntese orgânica para a construção de blocos quirais aplicados na obtenção de diversos compostos enantiomericamente puros. Exemplos de moléculas sintetizadas usando D-manitol incluem micalamida A (antitumoral, antiviral e imunossupressor), clavulazina (antimicrobiana e herbicida) e longimicina C (antitumoral) (OLIVEIRA et al., 2009).

Calmes et al. (2013) avaliaram o aumento da produção de manitol pelo fungo necrotrófico *Alternaria brassicicola* em diferentes períodos de estresse, concluindo que a produção deste carboidrato está ligada à manutenção do seu ciclo de vida. Os autores enfatizam que este metabólito demonstra funções importantes na reserva energética, regeneração do NADPH, na morfogênese, nidação e desenvolvimento, manutenção e resistência de esporos.

Ele é muito importante na patogênese, com uso para suprimir a resistência das plantas, visto que sua produção aumenta diante do estresse ambiental e do processo de infecção (CALMES et al., 2013; MEENA; KANWAR, 2015). Em um estudo anterior, Moura (2017) observou que sob diferentes condições de cultivo (20 °C, 21 dias), não havia produção significativa deste metabólito. Em condições estressantes de diminuição da temperatura e do tempo de incubação, pode-se observar que o fungo passou a sintetizar o carboidrato, otimizando assim a produção do metabólito.

No estudo descrito por Calmes et al. (2013), foi proposto que o metabolismo do manitol em fungos ocorre por meio da ação da manitol-1-fosfato 5-desidrogenase, que reduz a frutose 6-fosfato no manitol-1-fosfato usando NADH como um cofator;

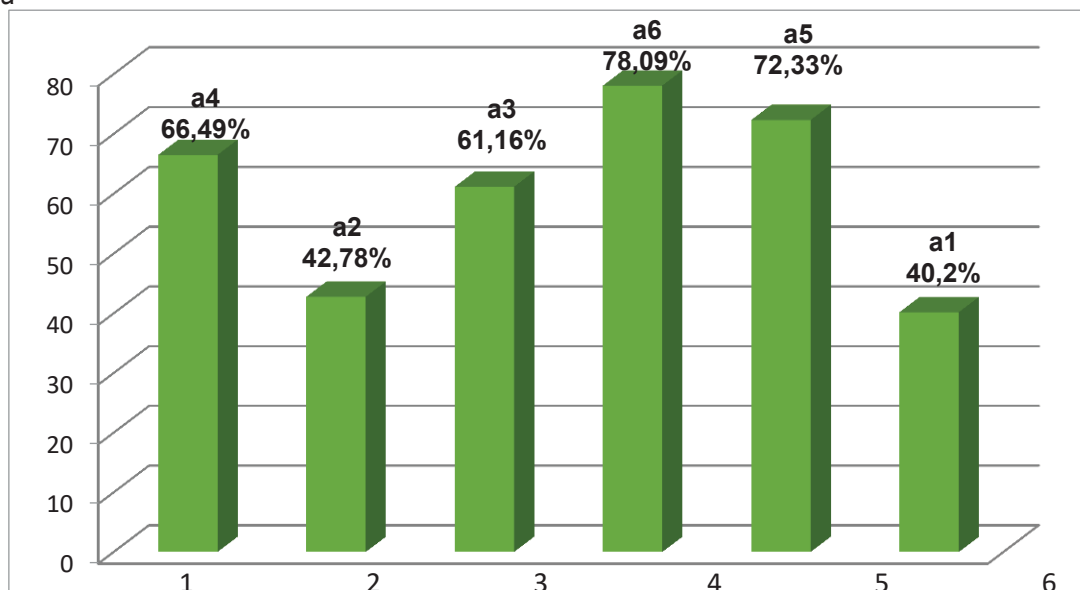
em seguida, a desfosforilação por uma fosfatase de manitol-1-fosfato, resultando em fosfato inorgânico e manitol (CALMES et al., 2013).

Para fungos do gênero *Diplodia*, foram encontrados marcadores que indicam a presença de isoenzimas nos diferentes morfotipos de *D. pinea*, sendo que essas enzimas podem catalisar reações que levam à formação de D-manitol (STANOSZ et al., 1999). Na espécie *Diplodia viticola*, foram encontrados os carboidratos manitol e arabitol no micélio, cuja capacidade de biossíntese foi a primeira descrita para o gênero, além das enzimas manitol desidrogenase e glicose-6-fosfato desidrogenase envolvidas na produção de manitol (STROBEL; KOSUGE 1965). Dentre os monossacarídeos que podem ser obtidos de fontes naturais, o manitol se destaca pelas inúmeras aplicações, ressaltando-se que para o fungo *D. pinea*, o presente trabalho traz a primeira descrição desse metabólito nesta espécie.

4.8 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO TBARS

A atividade antioxidante avaliada pelo método do TBARS, para o fungo *D. pinea* teve os melhores resultados obtidos empregando-se os extratos metanol e etanol/água (78% e 72%, respectivamente). Os outros extratos indicaram uma atividade entre 40 a 70% (GRÁFICO 1). O padrão utilizado nas análises foi o BHT na mesma concentração das amostras.

GRÁFICO 1 – ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (%) PARA EXTRATOS DO FUNGO *Diplodia pinea*



Nota: 1) Extrato hexano do micélio; 2) Extrato clorofórmio do micélio; 3) Extrato acetato de etila do micélio; 4) Extrato metanol do micélio; 5) Extrato etanol/água do micélio; 6) Extrato acetato de etila do meio. Padrão BHT = 100%. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey; $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2021).

O ensaio do TBARS mede o malondialdeído (MDA) presente na amostra, bem como o malondialdeído gerado a partir de hidroperóxidos de lípidos pelas condições hidrolíticas da reação. O que indica que as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico são detectadas por este teste, podendo ser observada formação de um cromóforo rosado que pode ser medido espectrofotometricamente, o que indica uma maior atividade de acordo com a absorbância detectada (WILLIAM, 1991; DAWN-LINSLEY et al., 2005). Sendo o malonaldeído um dos principais produtos da decomposição dos hidroperóxidos, essa análise é, portanto, uma avaliação indireta da oxidação indicando a propriedade antioxidante de cada extrato (LIMA JUNIOR et al., 2013).

Observando o alto desempenho antioxidante do extrato metanol e etanol/água, pôde-se observar uma efetividade contra a peroxidação lipídica sendo que os resultados obtidos corroboram com os metabólitos secundários encontrados em análises preliminares que indicaram a presença de esteroides e triterpenos, por exemplo.

Em estudos anteriores já foi relatada propriedade antioxidante de esteroides e tri-terpenoides. Segundo Costa et al. (2010), os esteroides sitosterol, estigmasterol e sitosterol-3-O- β -D-glicopiranosídeo, bem como os triterpenoides pentacíclicos

lupeol, 3- β -O-acil lupeol, lupenona e ácido betulínico, podem ser citados como exemplo de moléculas com potencial antioxidante (COSTA et al., 2010).

Neste contexto é importante ressaltar que existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes, isso ocorre devido ao fato de serem substâncias que em pequenas quantidades podem prevenir patologias causadas pela presença de radicais livres como artrite, doenças cardíacas, disfunções cognitivas, envelhecimento e câncer, apresentando, portanto, um alto potencial terapêutico (COSTA et al., 2010).

4.9 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH

O método baseado na eliminação do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) caracteriza-se por ser uma das técnicas amplamente utilizada para detectar a capacidade antioxidante de compostos. Estudos como o de Oliveira (2015) indicam que em 90% das pesquisas antioxidantes se utiliza essa metodologia por ser considerada fácil, altamente sensível, precisa, rápida, simples e econômica. O método DPPH• é capaz de determinar a atividade antioxidante, pois avalia a capacidade das substâncias contida nas amostras testadas de reduzir o radical livre estável sendo essa reação monitorada através de um espectrofotômetro UV. É importante ressaltar que se indica, como realizado neste trabalho, a avaliação da propriedade antioxidante por mais de uma metodologia, sendo necessários outros métodos para caracterizar completamente um composto como antioxidante (DAWIDOWICZ et al., 2012; OLIVEIRA, 2015).

Os resultados obtidos foram comparados aos padrões de Vitamina C (ácido ascórbico), BHT e Rutina. Observa-se na TABELA 10 os valores obtidos para os padrões e amostras, esses valores indicam a capacidade de redução do radical livre em meio reacional. Com base nisso, observou-se que a propriedade antioxidante, frente a esta metodologia, pôde ser considerada de baixa a mediana para os extratos clorofórmio, acetato de etila do meio e micélio e etanol/H₂O, e baixa para as amostras dos extratos hexano e metanol (valores >500) frente aos padrões empregados (TABELA 10).

TABELA 10 – IC₅₀ E DADOS ESTATÍSTICOS, PARA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH

Amostra	IC ₅₀ µg.mL ⁻¹	Análise estatística
Ácido ascórbico	5,8 ± 0,04	a1
BHT	13,93 ± 0,64	a3
Rutina	8,9 ± 0,07	a2
Hexano	>500	a8
Clorofórmio	307,8 ± 0,38	a5
Acetato de etila	344,3 ± 0,40	a7
Metanol	>500	a8
Etanol/H ₂ O	336,8 ± 0,89	a6
Acetato De Etila (meio)	277,8 ± 0,39	a4

Nota: médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey; p<0,05.

Fonte: A autora (2021).

Para a maioria dos estudos publicados, a propriedade antioxidante dos fungos encontra-se ligada à presença de compostos fenólicos como observado por Sugiharto et al. (2016) em testes com cepas de *Aspergillus* e *Monascus purpureus* apresentando potencial uso na indústria farmacêutica (SUGIHARTO et al., 2016). Ressalta-se que os antioxidantes podem ser de grande benefício para a melhoria da qualidade de vida, devido ao fato de terem a capacidade de proteger o organismo dos danos causados pelos radicais livres (LIANG et al., 2011).

4.10 AVALIAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEAU

Esse método foi realizado com amostras em triplicata para a pesquisa de compostos polifenóis totais.

O ensaio colorimétrico que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu é um método simples e baseia-se na interação das substâncias redutoras com o reagente. Em um meio reacional com pH alcalino substâncias redutoras, como os compostos

fenólicos, são capazes de dissociar um próton, levando à formação do ânion fenolato. Este ânion é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu formando óxido de tungstênio e óxido de molibdênio, estes óxidos por sua vez possuem coloração azul detectável por espectrofotometria. Atualmente, o ensaio de Folin-Ciocalteu está entre as metodologias mais aceitas e utilizadas para avaliar a atividade indireta do potencial antioxidante de uma amostra, utilizando como princípio medir o poder redutor em extratos (GONZÁLEZ et al., 2003; SARTORI et al., 2014; PIRES et al., 2017).

Baseando-se nos resultados encontrados, pode-se afirmar que todos os extratos do fungo *D. pinea* apresentaram boa concentração de fenóis totais, indicando uma atividade de média a alta segundo a classificação de Roginsky e Lissi (2005), pois a concentração de fenóis totais encontra-se acima de 50 mg EAG para todos os extratos (TABELA 11). A maior concentração desses compostos foi encontrada no extrato acetato de etila do micélio, isso se justifica devido à polaridade do solvente que possui grande capacidade de extrair os compostos fenólicos de uma amostra por afinidade de grupamentos químicos.

No emprego da mesma metodologia para os isolados de polissacarídeos foram testadas somente as amostras que tinham quantidade suficiente para o teste após a etapa de purificação por gelo e degelo e liofilização (as amostras de baixo rendimento foram arquivadas). Dessa maneira testaram-se as amostras provenientes das extrações 1 – extração com H₂O a 25 °C a partir do micélio, 2 – extração com H₂O a 65 °C a partir do micélio, 3a – parte solúvel do sobrenadante (extração com KOH 1% a 25 °C a partir do micélio), 3b – parte insolúvel do sobrenadante (extração com KOH 1% a 25 °C a partir do micélio), 3c – precipitado insolúvel (extração com KOH 1% a 25 °C a partir do micélio), 4a – parte insolúvel do sobrenadante (extração com KOH 2% a 25 °C), 4b – parte solúvel do sobrenadante (extração com KOH a 2%), 4c – precipitado solúvel (extração com KOH 2% a 25 °C a partir do micélio), 5 - extração com KOH a 10%.

Para todas as amostras de polissacarídeos testadas o teor de compostos fenólicos foi inferior a 30 mg EAG. g⁻¹, considerado baixo para a concentração de fenóis (ROGINSKY; LISSI, 2005).

TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE EXTRATOS DE *Diplodia pinea*

Amostra	Concentração de fenóis totais (mg EAG. g ⁻¹ da amostra)	Análise estatística
Hexano	34 mg ± 0,04	a1
Clorofórmio	61,8 mg ± 0,07	a4
Acetato de etila	119,21 mg ± 0,02	a6
Metanol	47,5 mg ± 0,02	a2
Etanol/H ₂ O	53,2 mg ± 0,08	a3
Acetato de etila (meio)	70,8 mg ± 0,01	a5

Nota: médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey; p<0,05.

Fonte: A autora (2021).

As substâncias fenólicas apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas ligadas a ele, essa estrutura química confere atividade redutora para esse grupo de metabólitos, que pode atuar doando elétrons ou sequestrando radicais livres. Devido a essas características, vastos estudos indicam que as substâncias fenólicas, como os flavonoides e os ácidos fenólicos, destacam-se por essa propriedade e são considerados os antioxidantes fenólicos mais comuns e de elevada potência em fontes naturais (IKAWA et al., 2003; GARCÍA MARTÍNEZ et al., 2015; PIRES et al., 2017).

Estudos como o de Hammed et al. (2017) comprovam o descrito na literatura para a propriedade antioxidante de alguns compostos. A pesquisa mencionada foi realizada com cepas do fungo *Mucor circinelloides* e demonstrou que sob condições controladas de cultivo, é possível observar a produção de metabólitos secundários com propriedades antioxidantes, dentre estes pode-se citar o β-caroteno, ácido linoleico, taninos e compostos fenólicos (HAMEED et al., 2017).

4.11 AVALIAÇÃO DO PODER DE REDUÇÃO DO ÍON FERRO – FRAP

O sistema de defesa antioxidante é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, presentes tanto no organismo (localizados dentro das células ou na circulação sanguínea), como em substâncias ingeridas (SHAMI; MOREIRA, 2004) sendo que várias metodologias, como a do poder de redução do íon ferro, podem ser utilizadas para avaliação do potencial antioxidante. Nesta metodologia o poder antioxidante dos extratos foi comparado com uma curva padrão de sulfato ferroso com atividade antioxidante conhecida para observação do seu poder redutor. As cinco concentrações mais relevantes de cada extrato, bem como suas atividades podem ser observadas na TABELA 12.

TABELA 12 – POTENCIAL DE REDUÇÃO DO ÍON Fe DOS EXTRATOS DE *Diplodia pinea* FRENTE AOS CONTROLES

Amostras	Potencial de redução em μM de sulfato ferroso / 1g de amostra	Análise estatística
Ácido ascórbico	17763 $\mu\text{M} \pm 0,72$	a6
Rutina	9092 $\mu\text{M} \pm 1,04$	a5
Hexano	378,5 $\mu\text{M} \pm 0,95$	a1a2
Clorofórmio	413,9 $\mu\text{M} \pm 0,21$	a2a3
Acetato de etila	661,4 $\mu\text{M} \pm 0,91$	a4
Metanol	212,6 $\mu\text{M} \pm 0,74$	a1
Etanol/água	562,6 $\mu\text{M} \pm 0,59$	a3a4
Acetato de etila (meio)	646,3 $\mu\text{M} \pm 0,94$	a4

Nota: médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey; $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2021).

Os extratos para essa metodologia não apresentaram propriedade antioxidante significativa frente ao padrão, o que indica que os extratos não têm bom resultado quando se avalia a capacidade antioxidante de redução do íon ferro, desta maneira ressalta-se ainda mais a importância de testar diferentes metodologias, pois o mecanismo de ação antioxidante muda entre amostras de diferentes origens (SILVA et al., 2018b).

4.12 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE PELA METODOLOGIA DO FOSFOMOLIBDÊNIO

Este ensaio avalia a atividade de compostos lipofílicos e hidrofílicos baseando-se na redução do molibdênio VI em molibdênio V na presença de substâncias com propriedade antioxidante. Para os extratos avaliados observou-se uma atividade mais satisfatória para o extrato hexano, quando comparado ao padrão BHT (TABELA 13). Isso se justifica, pois, possivelmente neste extrato haja compostos lipofílicos como esteroides e triterpenos com propriedade antioxidante, sendo por essa metodologia, o extrato mais promissor.

TABELA 13 – AVALIAÇÃO DA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DOS EXTRATOS DE *Diplodia pinea* AA%

Amostras	Ácido ascórbico	Rutina	BHT
Hexano	10,65 ± 0,7 a5	23,12 ± 0,6 a5	50,60 ± 1,6 a5
Clorofórmio	7,61 ± 0,6 a4	16,51 ± 0,3 a4	36,14 ± 0,4 a4
Acetato de etila	5,37 ± 0,3 a2a3	11,67 ± 0,6 a2a3	25,54 ± 0,5 a2a3
Metanol	4,51 ± 0,3 a2	9,80 ± 0,7 a2	21,44 ± 0,2 a2
Etanol/H ₂ O	5,98 ± 0,1 a3	12,99 ± 0,5 a3	28,43 ± 1,4 a3
Acetato de etila meio	2,99 ± 0,2 a1	6,49 ± 0,4 a1	14,21 ± 0,3 a1

Nota: médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey; p<0,05.

Fonte: A autora (2021).

Para as amostras de polissacarídeos essa metodologia foi empregada usando como padrão somente a vitamina C, devido a solubilidade dos outros padrões não ser satisfatória em água. Os isolados testados, assim como na avaliação de compostos fenólicos foram os que tinham quantidade suficiente para o teste após a etapa de purificação por gelo e degelo e liofilização (as amostras de baixo rendimento foram arquivadas). Testou-se, portanto as amostras provenientes das extrações 1 – parte solúvel do sobrenadante (extração com H₂O a 25 °C a partir do micélio), 2 – parte solúvel do sobrenadante (extração com H₂O a 65 °C a partir do micélio), 3a – parte solúvel do sobrenadante (extração com KOH 1% a 25 °C a partir do micélio), 3b – parte insolúvel do sobrenadante (extração com KOH 1% a 25 °C a partir do micélio), 3c – precipitado insolúvel (extração com KOH 1% a 25 °C a partir

do micélio), 4a – parte insolúvel do sobrenadante (extração com KOH 2% a 25 °C), 4b – parte solúvel do sobrenadante (extração com KOH a 2%), 4c – precipitado solúvel (extração com KOH 2% a 25 °C a partir do micélio), 5 - parte solúvel do sobrenadante (extração com KOH a 10%).

Os melhores resultados foram obtidos para duas amostras: a proveniente da extração 1 e a proveniente da extração 2 realizadas com o solvente água. Para estas amostras obtiveram-se os resultados de 14,77 e 30,1 AA%, respectivamente, de percentual do poder redutor do complexo fosfomolibdênio. Em avaliação de estudos anteriores com fungos se atribui a propriedade antioxidante a compostos como esteroides e triterpenos (AZEVEDO et al., 2014).

Segundo Merino et al. (2015), a avaliação pelo método fosfomolibdênio tem a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante de componentes lipofílicos e hidrofílico, desta maneira é possível avaliar a capacidade total de uma mistura complexa de compostos (extratos) de forma simples e com baixo custo. Desta maneira conclui-se que estando na fase lipofílica ou hidrofílica da amostra o método é capaz de indicar a propriedade antioxidante o que pode ser considerada uma vantagem (MERINO et al., 2015).

Estudos como o de Costa et al. (2016) demonstraram a propriedade antioxidante de fungos cultivados em meio batata dextrose pelo mesmo mecanismo do método do fosfomolibdênio, indicando mais uma vez o campo promissor a nível biotecnológico (COSTA et al., 2016).

4.13 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE *in vitro* DE *Diplodia pinea*

4.13.1 Frente à *Artemia salina*

A avaliação da atividade tóxica é importante para a medida do potencial tóxico de uma substância. Normalmente não se afirma que determinada substância não tem toxicidade, pois isso em geral depende da dose em que determinado composto está presente. Dentre os ensaios de toxicidade o sobre *Artemia salina* pode ser facilmente realizado com muitas vantagens, como baixo custo e rapidez. A *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada sendo que seus ovos eclodem facilmente (SIQUEIRA et al., 1998).

A toxicidade frente à *Artemia salina* pôde ser visualizada de maneira relevante somente no extrato acetato de etila na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ($\text{CL}_{50} = 746,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Os demais extratos não apresentaram toxicidade *in vitro*, sendo considerado, para este teste ausência de toxicidade. O controle positivo apresentou toxicidade a partir da segunda concentração testada, validando dessa maneira o teste. Os dados do ensaio podem ser vistos na TABELA 14 a qual mostra o número de larvas mortas levando em consideração a amostragem de 30.

TABELA 14 – MORTALIDADE DA *Artemia salina* PARA OS EXTRATOS E CONTROLES

[] g/mL	Hexano (micélio)	Clorofórmio (micélio)	Acetato de etila (micélio)	Metanol (micélio)	Etanol Água (micélio)	Acetato de etila (meio)	C +
10	-	-	-	-	-	-	0
100	-	-	-	-	-	-	10
250	-	-	-	-	-	-	30
500	-	-	-	-	-	-	30
1000	-	-	27	-	-	-	30

Nota: C+ controle positivo.

Fonte: A autora (2021).

O ensaio de *A. salina* é um teste preliminar de toxicidade biológica *in vitro*, importante para medir o potencial tóxico de uma substância ou extrato. Pode ser utilizado em estudos com extratos que apresentam atividades biológicas com a finalidade de confirmar ou não sua toxicidade ambiental. Segundo Amarante et al. (2011) e Lima et al. (2011), uma amostra com CL_{50} acima de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ tem ausência de toxicidade. Os extratos hexano e clorofórmio de *D. pinea* não apresentaram toxicidade para este teste em nenhuma das concentrações testadas, pois apresentaram uma CL_{50} superior a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

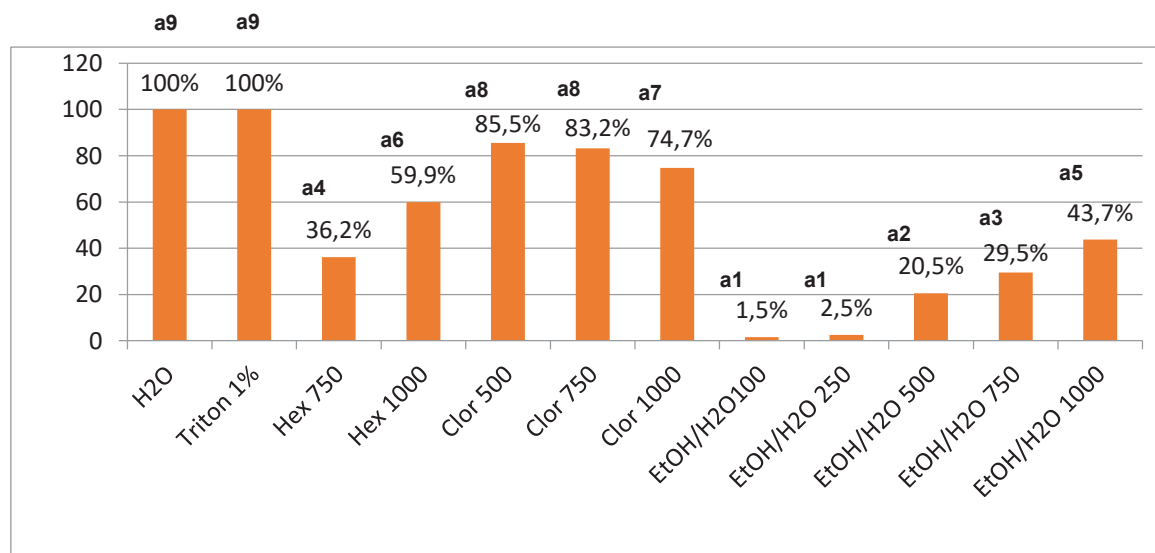
4.13.2 Atividade Hemolítica

Neste estudo *in vitro* observou-se o potencial dos extratos de causarem lise celular em eritrócitos, indicando, potencial toxicidade preliminar, sendo que com a evolução da metodologia observou-se que se pode medir além do dano causado na membrana celular dos eritrócitos, também os danos causados nas proteínas celulares liberadas no processo de desnaturação, que podem ser detectados pela

mudança na absorvância da oxiemoglobina (WOLFGANG et al., 1987). Para este estudo os extratos foram avaliados quanto ao seu potencial hemolítico, pois o principal objetivo foi avaliar toxicidade a nível celular.

Como resultados observou-se que os extratos acetato de etila do meio e do micélio e metanol, não apresentaram toxicidade, foram negativos para o teste de hemólise. Já os extratos hexano do micélio, clorofórmio do micélio e etanol/água do micélio apresentara atividade hemolítica. Para o extrato hexano a hemólise foi observada nas concentrações de 750 e 1000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (36,2% e 59,9%, respectivamente); no extrato clorofórmio nas concentrações de 500, 750 e 1000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ observou-se um percentual de resposta hemolítica alta superior a 70%, sendo este o extrato com maior toxicidade. Por fim o extrato etanol/água apresentou uma atividade hemolítica dose dependente em todas as concentrações testadas, sendo o maior valor obtido na maior concentração de extrato empregada (43,7% em 1000 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) (GRÁFICO 2).

GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE HEMÓLISE DOS EXTRATOS QUE APRESENTARAM RESULTADOS SIGNIFICATIVOS FRENTE AOS CONTROLES



Nota: Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey; $p < 0,05$.

Fonte: A autora (2021).

A atividade hemolítica está associada à composição de metabólitos secundários presentes nos extratos, bem como a correlação dos mesmos. Dentre esses metabólitos podem-se citar os taninos, saponinas e compostos nitrogenados, por exemplo (DEWICK, 2002).

Observa-se, portanto, a importância do desenvolvimento de metodologias preliminares como a da hemólise, pois, buscaram-se alternativas para a redução na utilização dos testes *in vivo* nas pesquisas, principalmente em testes preliminares. Com isso os testes *in vitro* ficam cada vez mais em evidência aumentando o seu uso como experimentos de triagem. Ressalta-se, entretanto que para que um teste possa ser empregado em larga escala, o mesmo deverá ser validado metodologicamente, como observado neste estudo (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006).

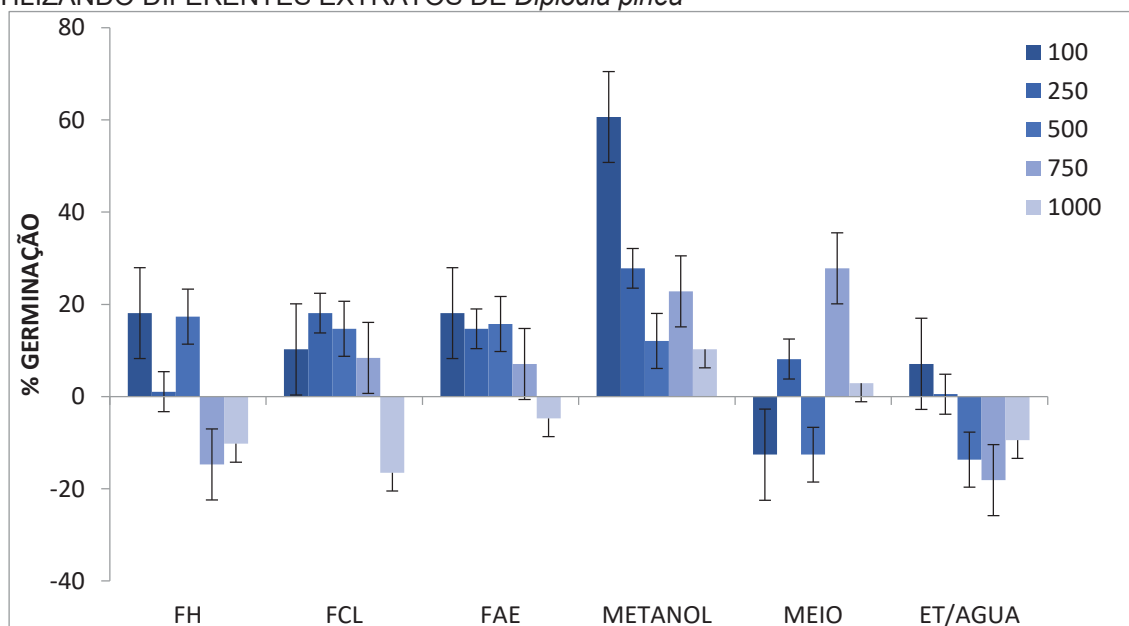
4.14 ESTUDO ALELOPÁTICO

Quanto ao estudo alelopático, este foi realizado utilizando sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa* empregando, portanto, um modelo de planta dicotiledônea e monocotiledônea, respectivamente. Foi analisada durante esse estudo a possível interferência na germinação e no crescimento de hipocótilo e radícula para ambas as sementes, sendo avaliado, portanto, o potencial de cada um dos extratos sobre as plântulas.

Inicialmente foi avaliado se os extratos influenciaram no índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *L. sativa* frente aos controles. Os dados obtidos estão expressos no GRÁFICO 3.

Se comparado com os controles, ao analisar a velocidade de germinação para as sementes de alface, observa-se que o fungo em questão tem atividade predominante no aumento da velocidade de germinação, sendo observada uma maior atividade no extrato metanólico na concentração de 100 µg.mL⁻¹, caracterizando essa atividade como não dose dependente.

GRÁFICO 3 – GERMINAÇÃO (%) E DESVIO PADRÃO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* UTILIZANDO DIFERENTES EXTRATOS DE *Diplodia pinea*

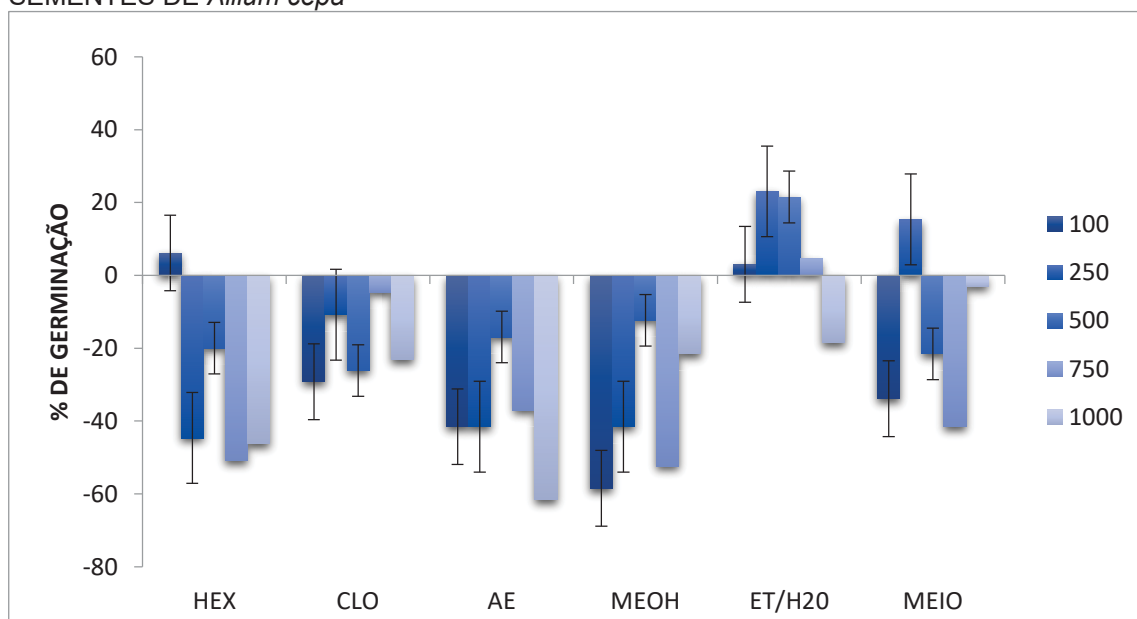


Nota: FH – extrato hexano do micélio; FCL – extrato clorofórmio do micélio; FAE – Extrato acetato de etila do micélio; METANOL – extrato metanol do micélio; MEIO – extrato acetato de etila do meio de cultivo; Et/AGUA – extrato 50% etanol/50% água (v/v) do micélio.

Fonte: A autora (2021).

Quando se analisou as sementes de *A. cepa* observou-se que os extratos foram capazes de inibir fortemente a velocidade de germinação. Observando o GRÁFICO 4 foi possível constatar que praticamente todos os extratos apresentam uma atividade inibitória, com destaque para os extratos hexano, acetato de etila e metanol, os quais apresentaram melhor atividade. Para os testes realizados com as sementes de cebola observou-se que a atividade inibitória também não foi dose dependente.

GRÁFICO 4 – % DE GERMINAÇÃO E DESVIO PADRÃO PARA FUNGO *D. pinea* UTILIZANDO SEMENTES DE *Allium cepa*

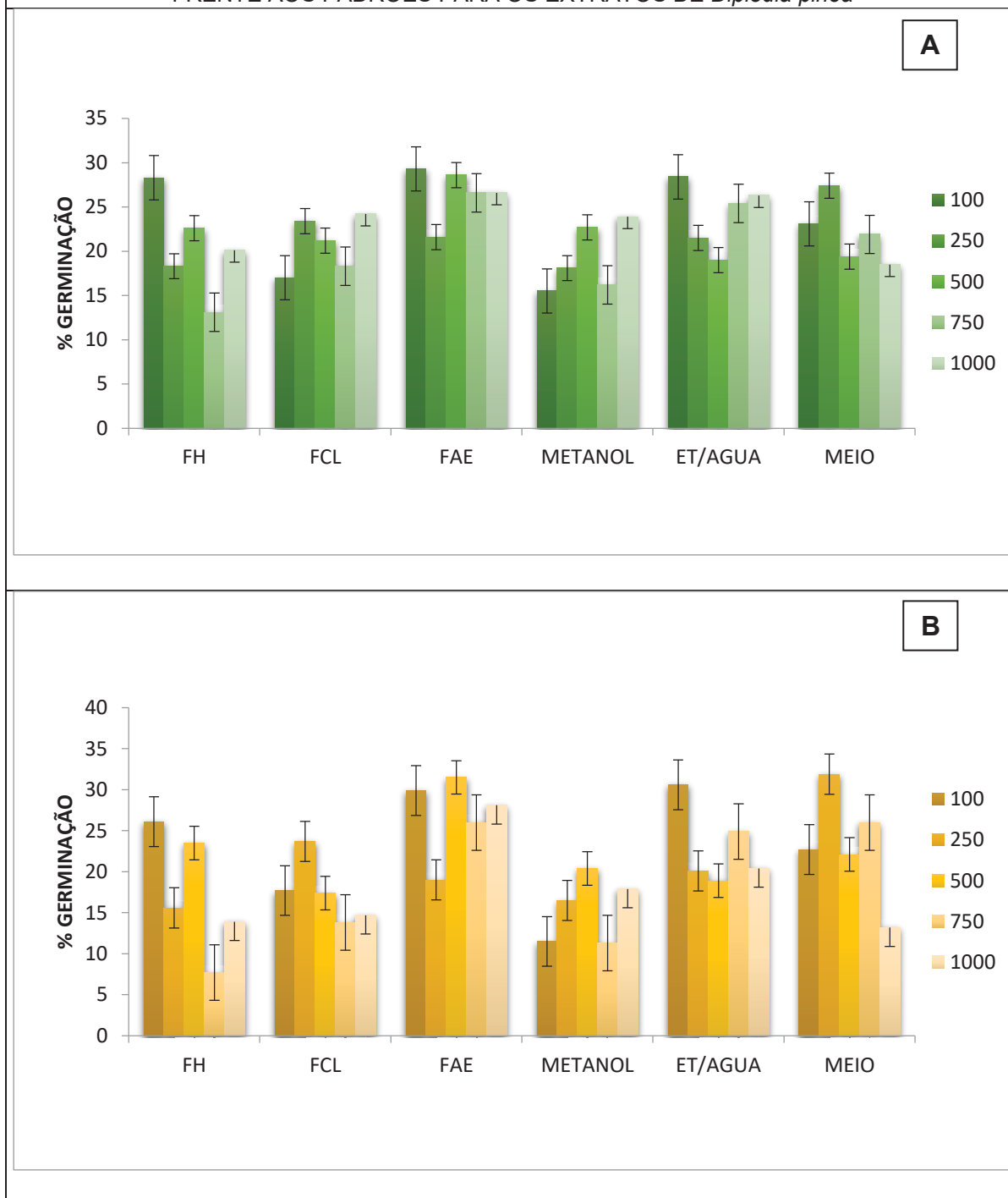


Nota: HEX – extrato hexano do micélio; CLO – extrato clorofórmio do micélio; AE – Extrato acetato de etila do micélio; MEOH – extrato metanol do micélio; ET/AGUA – extrato 50% etanol/50% água (v/v) do micélio; MEIO – extrato acetato de etila do meio de cultivo.

Fonte: A autora (2021).

Quanto ao crescimento do hipocótilo e da radícula para a *L. sativa*, como resultado obteve-se uma inibição de crescimento frente aos extratos em concentrações diferentes, de maneira não dose dependente, quando comparados com os controles metanol e água. Esses dados podem ser constatados observando-se a FIGURA 23 baseando-se também na análise estatística realizada (TABELA 15 e TABELA 16).

FIGURA 23 – PERFIL DE CRESCIMENTO DE HIPOCÓTILO E RADÍCULA DE *Lactuca sativa* FRENTE AOS PADRÕES PARA OS EXTRATOS DE *Diplodia pinea*



Nota: FH – extrato hexano do micélio; FCL – extrato clorofórmio do micélio; FAE – Extrato acetato de etila do micélio; METANOL – extrato metanol do micélio; ETANOL H₂O – extrato 50% etanol/50% água (v/v) do micélio; AE MEIO – extrato acetato de etila do meio de cultivo.

A – HIPOCÓTILO; B – RADÍCULA.

Fonte: A autora (2021).

Quanto ao hipocótilo (TABELA 15) observou-se inibição para todos os extratos, sendo que para o extrato hexano a inibição ocorreu nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para os extratos clorofórmio e metanol houve uma inibição de crescimento nas concentrações de 100, 250, 500 e 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para o extrato acetato de etila do meio observou-se ausência de inibição somente na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo esses quatro extratos os mais inibitórios para o hipocótilo de *Lactuca sativa*.

Por fim o extrato etanol/água apresentou inibição de crescimento em duas concentrações (250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e o acetato de etila do meio apresentou o menor potencial de inibição, somente visualizado na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$.

TABELA 15 – EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE EXTRATOS DE *Diplodia pinea* SOBRE O HIPOCÓTILO DE *Lactuca sativa*

	100 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	750 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	
Ext. Hexano	28,3 a2	18,3 a1	22,6 a1	13,1 a1	20,1 a1	
Ext. Clorofórmio	17,0 a1	23,4 a1	21,2 a1	18, 3 a1	24,2 a2	
Ext. Acetato de Etila	29,3 a2	21,6 a1	28,6 a2	26,6 a2	26,6 a2	
Ext. Metanol	15,5 a1	18,1 a1	22,7 a1	16,2 a1	23,9 a2	
Ext. Etanol/H₂O	28,4 a2	21,5 a1	19,0 a1	25,4 a2	26,3 a2	
Ext. Meio	23,1 a1	27,4 a2	19,4 a1	21,9 a1	18,5 a1	
Controle metanol	-	-	-	-	-	31,5 a2
Controle água	-	-	-	-	-	32,2 a2

Nota: intervalo de confiança obtido de 0,05. Grupos com números diferentes diferem estatisticamente segundo teste de Scott Knott.

Ext. – extrato. Cont. – controle. Meio – extrato acetato de etila do meio de cultivo.

Fonte: A autora (2021).

Os resultados obtidos para radícula (TABELA 16) constatarem uma inibição de crescimento para todos os extratos. Os extratos hexano, clorofórmio e metanol, apresentaram maior potencial inibitório, pois o mesmo foi observado em todas as concentrações testadas (100, 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Os extratos etanol/água e acetato de etila do meio, apresentaram inibição em para um maior número de concentrações testadas do que observado para radícula. E por fim, o extrato acetato de etila do micélio permaneceu sendo o menos inibitório, apresentando atividade apenas nas concentrações de 250 e 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

TABELA 16 – EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE EXTRATOS DE *Diplodia pinea* SOBRE A RADÍCULA DE *Lactuca sativa*

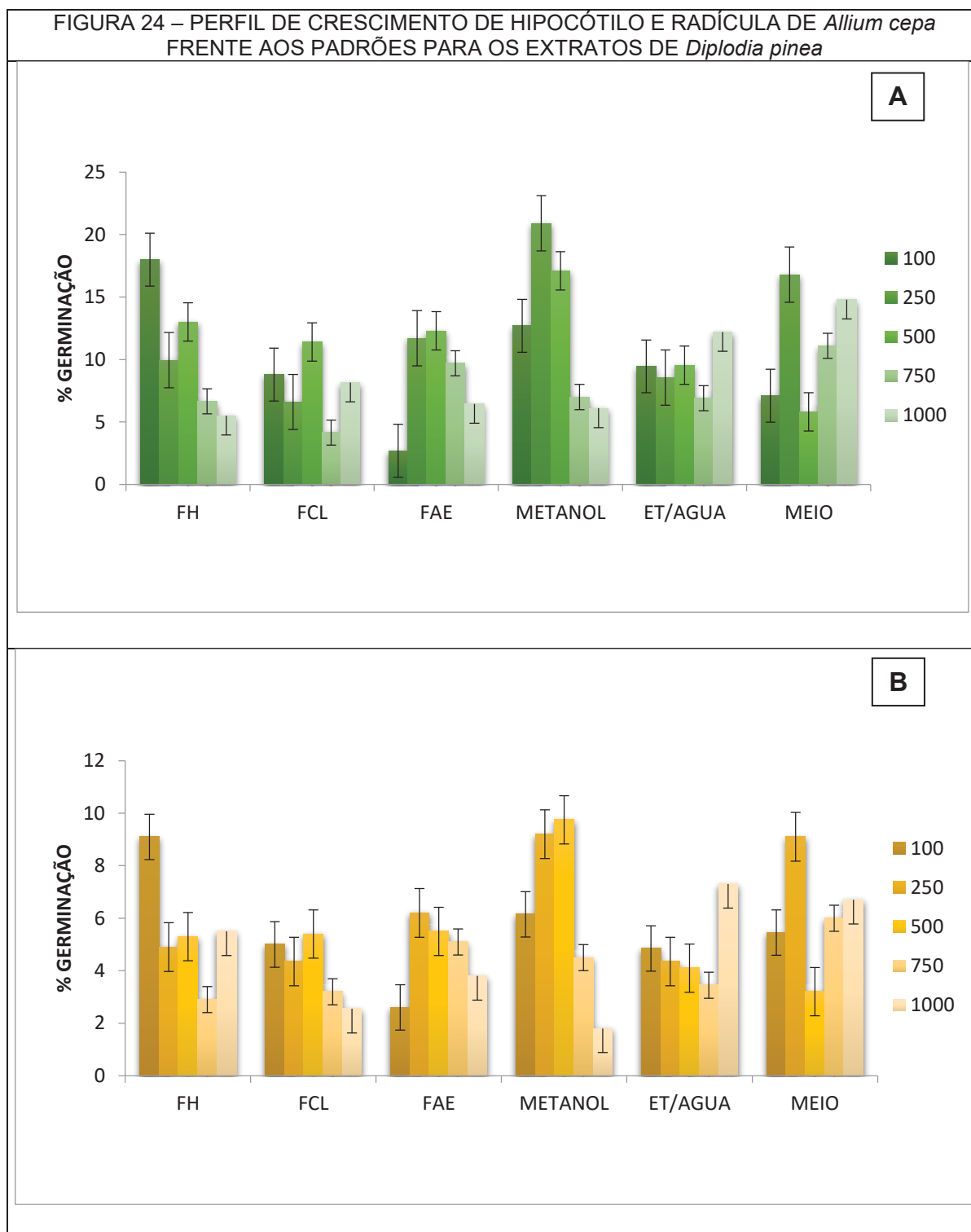
	100 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL	750 µg/ML	1000 µg/mL	Cont. H ₂ O	Cont. MEOH
Ext. Hexano	26,1 a2	15,6 a1	23,05 a2	7,7 a1	13,9 a1		
Ext. Clorofórmio	17,7 a1	23,7 a2	17,4 a1	13,8 a1	14,7 a1		
Ext. Acetato de Etila	29,9 a3	19 a1	31,5 a3	26 a2	28,1 a3		
Ext. Metanol	11,5 a1	16,5 a1	20,4 a1	11,3 a1	17,9 a1		
Ext. Etanol/H₂O	30,6 a3	20,1 a1	18,9 a1	24,9 a2	20,4 a1		
Ext. Meio	22,7 a2	31,9 a3	22,1 a2	26,05 a2	13,2 a1		
Controle metanol						32,5 a3	
Controle água						33,5 a3	

Nota: intervalo de confiança obtido de 0,05. Grupos com números diferentes diferem estatisticamente segundo teste de Scott Knott.

Ext. – extrato. Cont. – controle. Meio – extrato acetato de etila do meio de cultivo.

Fonte: A autora (2021).

Testando-se as sementes *Allium cepa* observou-se que para o hipocótilo notou-se uma inibição de crescimento em todos os extratos e em diferentes concentrações. Entretanto, quando se avaliam os extratos em suas mesmas concentrações para a radícula constatou-se que os mesmos não afetam seu desenvolvimento, estes dados podem ser constatados na FIGURA 24 e TABELA 17 e TABELA 18.



Nota: FH – extrato hexano do micélio; FCL – extrato clorofórmio do micélio; FAE – Extrato acetato de etila do micélio; METANOL – extrato metanol do micélio; ETANOL H₂O – extrato 50% etanol/50% água (v/v) do micélio; AE MEIO – extrato acetato de etila do meio de cultivo.

A – HIPOCÓTILO; B – RADÍCULA.

Fonte: A autora (2021).

Na análise do perfil de inibição dos extratos frente às sementes de *Allium cepa*, na análise do desenvolvimento do hipocótilo, observou-se uma maior atividade para o extrato etanol/água nas suas quatro concentrações iniciais (100, 250, 500 e 750 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Para os outros extratos observou-se um perfil semelhante de inibição para em média três concentrações de modo não dose dependente (TABELA 17).

TABELA 17 – EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE EXTRATOS DE *Diplodia pinea* SOBRE O HIPOCÓTILO DE *Allium cepa*

	100 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	750 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	
Ext. Hexano	18 a2	9,95 a1	13 a2	6,65 a1	5,5 a1	
Ext. Clorofórmio	8,8 a1	6,6 a1	11,4 a2	4,15 a1	8,15 a1	
Ext. Acetato de Etila	2,7 a1	11,7 a2	12,3 a2	9,7 a1	6,45 a1	
Ext. Metanol	12,7 a2	20,9 a2	17,1 a2	7,05 a1	6,1 a1	
Ext. Etanol/H₂O	9,45 a1	8,55 a1	9,55 a1	6,9 a1	12,2 a2	
Ext. Meio	7,1 a1	16,8 a2	5,8 a1	11,1 a2	14,8 a2	
Controle metanol						13,7 a2
Controle água						13,6 a2

Nota: intervalo de confiança obtido de 0,05. Grupos com números diferentes diferem estatisticamente segundo teste de Scott Knott.

Ext. – extrato. Cont. – controle. Meio – extrato acetato de etila do meio de cultivo.

Fonte: A autora (2021).

Para radícula como destacado pela análise estatística, no caso de *A. cepa* não se observou diferença frente ao controle, ou seja, não foi constatada nem inibição nem estímulo de crescimento, exceto para a concentração de 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ do extrato metanol do micélio (TABELA 18).

TABELA 18 – EFEITO DOS DIFERENTES TIPOS DE EXTRATOS DE *Diplodia pinea* SOBRE A RADÍCULA DE *Allium cepa*

	100 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	750 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	
Ext. Hexano	9,1 a1	4,9 a1	5,3 a1	2,9 a1	5,5 a1	
Ext. Clorofórmio	5 a1	4,35 a1	5,4 a1	3,2 a1	2,55 a1	
Ext. Acetato de Etila	2,6 a1	6,2 a1	5,5 a1	5,1 a1	3,8 a1	
Ext. Metanol	6,15 a1	9,2 a1	9,75 a2	4,5 a1	1,8 a1	
Ext. Etanol/H₂O	4,85 a1	4,35 a1	4,1 a1	3,45 a1	7,3 a1	
Ext. Meio	5,45 a1	9,1 a1	3,2 a1	6 a1	6,7 a1	
Controle metanol						6,4 a1
Controle água						7,8 a1

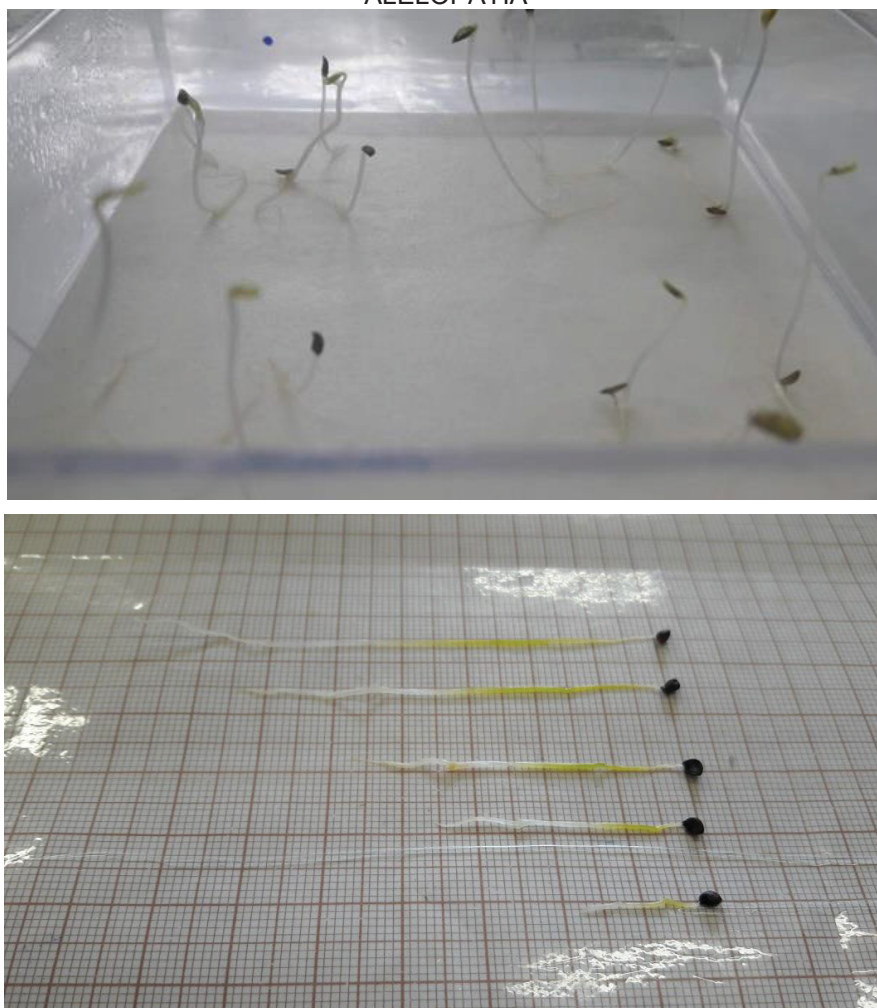
Nota: intervalo de confiança obtido de 0,05. Grupos com números diferentes diferem estatisticamente segundo teste de Scott Knott.

Ext. – extrato. Cont. – controle. Meio – extrato acetato de etila do meio de cultivo.

Fonte: A autora (2021).

Alelopatia é uma atividade biológica definida como um fenômeno no qual espécies vegetais ou fúngicas produzem metabólitos secundários como fitotoxinas, que podem inibir ou estimular o índice de velocidade de germinação, e o desenvolvimento do hipocótilo e radícula (FIGURA 25) (CRUZ et al., 2021).

FIGURA 25 – AMOSTRAS AVALIADAS QUANTO AO CRESCIMENTO E INIBIÇÃO NO ENSAIO DE ALELOPATIA



Fonte: A autora (2021).

Neste contexto, é fundamental ressaltar que a atividade alopática, por meio de metabólitos secundários, afeta de maneira positiva e/ou negativa o crescimento e desenvolvimento de sistemas biológicos em plantas cultivadas. Atualmente, espécies produtoras de compostos alelopáticos inibidores são utilizados em sistemas agrícolas, por sua ação inseticida, fungicida, bactericida e herbicida, atuando, portanto, como potente inibidor de germinação de sementes, hipocótilo e radícula. Pesquisas recentes demonstraram que metabólitos secundários como

compostos nitrogenados, taninos e alguns compostos fenólicos podem apresentar importante potencial alelopático (LISBOA et al., 2018; CRUZ et al., 2021).

A aplicação de herbicidas pode ser reduzida com métodos alternativos, como o uso de fungos patogênicos, pois comprovadamente estes produzem diversos compostos secundários em meio de crescimento, os quais apresentam fitotoxicidade, como exemplo de microrganismos que se comportam dessa maneira cita-se o *Fusarium solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium graminearum* e *Diplodia maydis*, podendo ser usados para controlar plantas daninhas de maneira ecológica e sustentável, sendo uma alternativa para reduzir a aplicação de herbicidas (SPIASSI et al., 2015).

Observa-se também que além do fator inibitório sobre plantas, testes de antagonismo em placa realizados com o *D. pinea*, indicaram seu potencial de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e micorrizicos (OLIVEIRA et al., 2018). Frente a isso se pode afirmar que *D. pinea* tem uma capacidade inibitória mais acentuada que a atividade de promover o crescimento de outros organismos, como plantas ou outros microrganismos ao seu redor.

4.15 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL

No teste de avaliação antitumoral, avaliou-se o potencial de inibição de crescimento de células tumorais sob as linhagens Hela e H460 para cada um dos extratos testados.

Nas concentrações testadas (10 e 50 µg) não se observou potente inibição de crescimento das células tumorais. De acordo com os resultados obtidos os extratos hexano do micélio, clorofórmio do micélio, acetato de etila do meio e etanol foram os únicos que conseguiram inibir sensivelmente o crescimento das células tumorais, isto é, os extratos não chegaram a inibir 10% do crescimento das células tumorais.

Alguns autores, entretanto, em pesquisas anteriores, apontam que no caso de baixas concentrações, como as testadas nesse estudo devido ao protocolo empregado, uma inibição em torno de 10% pode ser considerada mediana, pressupondo que um aumento da concentração inibiria o crescimento tumoral. Além desse fato, devem-se levar em consideração que foram testados extratos, e não

isolados (AZEVEDO et al., 2021).

Essa inibição pode ser justificada pela presença de metabólitos, dentre eles o ácido palmítico que foi isolado de um dos extratos testados. A presença de esteroides e triterpenos nos extratos, evidenciado pela CCD, impacta na viabilidade de diversas células tumorais diminuindo o crescimento das mesmas (PATOCKA, 2003; INÁCIO, 2012). O mecanismo de supressão de crescimento de células tumorais ligados à presença de ácidos graxos pode ser parcialmente justificado, pois se acredita que os mesmos são capazes de ativar sensores moleculares fazendo com que os sinais intercelulares induzam a apoptose (NAGATA et al., 2015).

Outros metabólitos como esteroides e triterpenos também já foram apontados como responsáveis pela diminuição da viabilidade de células tumorais, tornando os extratos fúngicos importantes nas pesquisas por novas moléculas com potencial anticancer (DAMIANI, 2007; INÁCIO, 2012)

4.16 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi realizada para constatar se os extratos testados tinham a capacidade de atuar como bactericida ou bacteriostático sob cepas de interesse clínico.

O extrato hexano do micélio apresentou leve inibição de crescimento na concentração de 1000 µg/mL para o microrganismo *Staphylococcus aureus* (TABELA 19). O extrato clorofórmio do micélio demonstrou atividade moderada contra *S. aureus* a partir da concentração de 250 µg/mL, sendo caracterizado como bacteriostático após teste de viabilidade em meio de cultura sólido. Os outros extratos para todos os outros microrganismos, não apresentaram inibição de crescimento, não apresentando atividade contra essas cepas testadas (SOUZA et al., 2013; VEIGA et al., 2019).

TABELA 19 – CLASSIFICAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PARA O TESTE DE CIM

CONCENTRAÇÃO	ATIVIDADE INIBITÓRIA
Até 100 µg/mL	BOA
100 a 500 µg/MI	MODERADA
500 a 1000µg/MI	FRACA

Fonte: Souza (2013).

Os estafilococos são cocos Gram catalase positivos com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporulados. Podem apresentar diversos arranjos, desde isolados, aos pares, até agrupados irregularmente. Várias características morfológicas, fisiológicas e químicas contribuem para a virulência do *S.aureus* e os sorotipos 6 e 7 são os mais associados a infecções em seres humanos.

Até a década de 1950, as infecções eram tratadas amplamente com penicilina, antibiótico recém-descoberto que apresentava atividade contra a parede celular bacteriana. Porém, ao longo do tempo as bactérias desenvolveram mecanismos de resistência aos antimicrobianos culminando em cepas de bactérias multirresistentes o que contribuiu para o grande aumento dos casos de infecções hospitalares. Frente a este panorama, a busca de novos compostos que apresente inibição do crescimento do *S. aureus* é de grande interesse para a saúde humana (SANTOS et al., 2007). Em pesquisas anteriores como o de Bruggeman, 2010 observou-se que pequenas concentrações de ácidos graxos, como o ácido palmítico, podem inibir a atividade enzimática das bactérias, justificando, portanto os resultados encontrados (KABARA et al., 1972; ZHENG et al., 2005).

A propriedade antimicrobiana de outra espécie de *Diplodia* já foi relatada por estudos como o de Nogueira et al. (2006) que demonstrou a ação antibiótica dos fungos fitopatogênicos *D. maydis* e *Sclerotium rolfsii* frente a bactérias multirresistentes isoladas de pacientes hospitalizados, incluindo o *S. aureus*. Atividade esta atribuída pelos autores à metabólitos secundários do grupo dos triterpenos (NOGUEIRA et al., 2006).

No caso do extrato clorofórmio essa atividade pode ser justificada pela presença de triterpenos e compostos fenólicos encontrados nesse extrato, evidenciado no *screening* de CCD, pois sabidamente esses compostos estão ligados à ruptura da membrana plasmática bem como a supressão da virulência bacteriana (SALEEM et al., 2010; KUREK et al., 2011).

4.17 ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS

Sobre o potencial larvicida, os extratos do fungo *D. pinea* demonstraram atividade satisfatória nos extratos hexano e clorofórmio (TABELA 20). As amostras tiveram índice de mortalidade e uma boa taxa de LC_{50} para larvas do *A. aegypti*. A

LC₅₀ indica a concentração letal do extrato testado capaz de matar 50% das larvas durante o teste.

Pôde-se visualizar que a melhor atividade foi observada no extrato clorofórmio, que apresentou LC₅₀ de 90,49 e uma excelente taxa de mortalidade mesmo na concentração mais baixa testada (10 µg.mL⁻¹) (LIMA et al., 2014).

TABELA 20 – MORTALIDADE DE LARVAS DE *Aedes aegypti* FRENTE A EXTRATOS DE *Diplodia pinea*

Extrato	Concentração (µg.mL ⁻¹)	Mortalidade (%) ± SD	LC ₅₀ (µg.mL ⁻¹) (LC Min-LC Máx)
EH	10	6,66 ± 0.57	441,42 (209,26 – 1429,68)
	100	26,66 ± 0.57	
	1000	63,33 ± 0.57	
EC	10	23,33 ± 0.57	90,49 (32,60 – 238,87)
	100	53,33 ± 0.57	
	1000	76,66 ± 0.57	
EAE	10	6,66 ± 0.57	>1000
	100	20,0 ± 1.00	
	1000	36,66 ± 1.15	
EM	10	0,0 ± 0.00	>1000
	100	3,33 ± 0.57	
	1000	16,66 ± 0.57	
EEA	10	0,0 ± 0.00	>1000
	100	0,0 ± 0.00	
	1000	3,33 ± 0.57	
EAEM	10	0,0 ± 0.00	>1000
	100	6,66 ± 0.57	
	1000	20,0 ± 1.00	

Legenda: Extrato hexano do micélio fúngico (EH); Extrato clorofórmio do micélio fúngico (EC); Extrato acetato de etila do micélio fúngico (EAE); Extrato Metanol do micélio fúngico (EM); Extrato Etanol/água do micélio fúngico (EEA); Extrato acetato de etila do meio de cultivo (EAEM). Nota: não foi observada mortalidade no controle negativo; para o controle positivo a mortalidade foi de 100% das larvas. Intervalo de confiança igual ou superior a 95%.

Fonte: A autora (2021).

Como responsável por essa atividade, descrita para *Aedes* e para outros vetores, citam-se os metabólitos secundários de grupos semelhantes aos observados para os extratos de *D. pinea*, os esteroides e triterpenos. Segundo Pinheiro et al. (2020), alguns fungos como *Aspergillus terreus* – que apresentou excelente atividade frente a larvas de *Anopheles stephensis* e *Culex quinquefasciatus* – já foram testados. Os mesmos autores descrevem um trabalho, o qual se vincula a atividade larvicida de extratos fúngicos obtidos de *Penicillium* sp., a metabólitos secundários como os da classe dos meroterpenóides (PINHEIRO et al.,

2020).

Em pesquisa publicada em 2008 por Pandi e colaboradores, um fungo do mesmo gênero, o *Botryodiplodia theobromae*, apresentou atividade contra larvas de *Culex quinquefasciatus* em seu segundo estágio nas primeiras 24 h, atividade atribuída a metabólitos secundários produzidos pelo fungo (PANDI et al., 2008).

Bücker e colaboradores citaram, em 2013, a atividade de *Pestalotiopsis virgulata*, frente a larvas de *Aedes* e *Anopheles*. Os autores realizaram um cultivo *in vitro* do fungo e posterior extração com emprego de solventes de diferentes polaridades a partir do micélio fúngico, como no presente estudo realizado com *D. pinea*.

Pesquisas como a de Podder e Grosh (2019) demonstram que fungos do gênero *Trichoderma* como o *T. asperellum*, além de serem utilizados como promotores de crescimento vegetal na área agrícola têm aplicabilidade como agente de controle biológico por apresentar atividade larvicida contra o mosquito *Anopheles*, vetor da malária (PODDER; GROSH, 2019).

Larvicidas obtidos de fontes naturais vêm se tornando uma opção biotecnológica, o que impulsiona a pesquisa na área de produtos naturais. Isso se deve à necessidade de produtos menos tóxicos ao meio ambiente, bem como à saúde humana e animal (RAGAVENDRAN et al., 2019). Os fungos são reconhecidamente fontes de substâncias bioativas de origem natural e, por este motivo, cada vez mais se sugere a necessidade e pesquisas que avaliem o potencial desses organismos no controle de vetores responsáveis pela disseminação de patologias de alta prevalência, como a dengue e a malária.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção em massa do fungo *D. pinea in vitro* foi possível de ser realizada de maneira satisfatória, sob condições de cultivo controladas, obtendo-se quantidades suficientes de micélio e caldo de cultivo para todos os testes propostos. O resultado total de biomassa obtida da produção a 16 °C por 7 dias foi de 40,85 g de biomassa e 5 litros de caldo de cultivo.

O valor encontrado para umidade e cinzas foi de 94,4% e 2,17% respectivamente, ficando relatados pela primeira vez estes parâmetros para *D. pinea* nessas condições de cultivo.

O resultado do experimento de análise térmica do micélio fúngico demonstrou a presença de metabólitos primários e secundários.

Foi bem-sucedida a produção dos extratos a partir do micélio liofilizado e caldo de cultivo de *D. pinea*, sendo o extrato metanol o de maior rendimento (47,33%).

Foi possível realizar o *screening* químico dos metabólitos primários, os quais foram observados os monossacarídeos glicose, arabinose, maltose, galactose e xilose e secundários sendo observada positividade para esteroides, compostos fenólicos e triterpenos.

Os metabólitos, ácido palmítico, a 1,3 α -glucana e D-manitol foram evidenciados e caracterizados.

Nos ensaios de avaliação da propriedade antioxidante, os extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila do micélio e do caldo de cultivo e extrato etanol/água demonstraram uma excelente atividade pelas metodologias de TBARS e Folin Ciocalteu. Fato que se justifica pelo mecanismo que cada uma dessas técnicas avalia, em que se atribui a propriedade antioxidante neste contexto aos compostos fenólicos e triterpenos, principalmente.

Nos testes de avaliação da toxicidade *in vitro* pelas metodologias de *A. salina* e hemólise, observou-se ausência de toxicidade para todos os extratos no ensaio de *A. salina*. No teste de hemólise, entretanto, quando se observou a toxicidade frente às células, houve toxicidade para os extratos clorofórmio e etanol/água.

Na avaliação do potencial alelopático dos extratos, observou-se a capacidade de inibição do desenvolvimento de hipocótilo e radícula de monocotiledôneas e dicotiledôneas.

No caso da atividade antitumoral, não foi observada inibição acima de 10% do crescimento das células tumorais nas concentrações testadas.

Quanto à avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos *in vitro*, o extrato clorofórmio demonstrou ter uma atividade bacteriostática moderada, a partir da concentração de 250 µg/mL.

Por fim, os extratos clorofórmio e hexano apresentaram potencial larvicida frente ao *A. aegypti*, LC₅₀ de 441,42 e 90,49 µg/mL⁻¹, respectivamente.

5.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Dentre os estudos realizados com fungos, observa-se que os mais estudados são os tipos endofíticos. Já os estudos com *D. pinea* são bastante escassos. Ao longo dessa pesquisa, observou-se que os estudos publicados estão mais voltados para a área agrícola, com muitas das atividades relatadas no presente estudo consideradas inéditas.

Destacam-se a atividade antimicrobiana, a propriedade antioxidante e o isolamento da 1,3 alfa-glucana e do D-manitol.

Portanto, esta pesquisa revelou grande potencial e inúmeras possibilidades na descoberta de novos insumos para a indústria farmacêutica, agrícola e veterinária, por dar aplicabilidade benéfica ao fungo fitopatogênico *D. pinea*.

Indica-se, dessa forma, o prosseguimento de estudos, pesquisas acadêmicas e laboratoriais com esta espécie de fungo, além de outras pertencentes ao gênero *Diplodia*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações Biotecnológicas. **Revista UNINGÁ**, v. 11, n. 1, p. 55 – 59, 2015.
- 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, p. 1 – 16, 2010.
- APPELT, H. R.; OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, R. C. Synthesis and Antimicrobial Activity of Carbohydrate Based Schiff Bases: Importance of Sugar Moiety. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2013, a. 320892, 2013. DOI:10.1155/2013/320892
- AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. N. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. **Molecules** v.21, p. 1-19, 2016.
- AZEVEDO, L. F. P.; FARIA, T. S. A.; PESSANHA, S. S.; ARAUJO, M. F.; LEMOS, G. C. S. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) S.w. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n. 2, p. 209 – 215, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722014000200007>.
- AZEVEDO, I. M. F.; SILVA, R. B.; PINHEIRO, A. A.; CARNEIRO, R. F.; NETO, L. G. N. Avaliação da atividade antitumoral da lectina isolada da esponja marinha *Chondrilla caribensis*, **Revista multidisciplinar de educação e meio ambiente**, v. 2, n. 2, 2021. DOI: <https://doi.org/10.51189/rema/1270>.
- BASILIO, P. R. R. C. Caracterização morfofisiológica, patogênica e molecular de isolados de *Diplodia pinea*. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná - Curitiba, 2013.
- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **Journal of Antibiotics (Tokyo)**, v. 58, p. 1 - 26, 2005.
- BETIM, F. C. M.; OLIVEIRA, C. F.; SOUZA, A. M.; SZABO, E. M.; ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; DIAS, J. F. G. *Ocotea nutans* (Nees) Mez (Lauraceae): chemical composition, antioxidant capacity and biological properties of essential oil. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, 55 (Article 18284), 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902019000118284>.
- BETTER, M. araB EXPRESSION SYSTEM IN *Escherichia coli*. **Gene Expression Systems**, p. 95-107, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-012253840-7/50005-5>.
- BIHON, W.; BURGESS, T.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. Distribution of *Diplodia pinea* and its genotypic diversity within asymptomatic *Pinus patula* trees. **Australasian Plant Pathology**, v. 40, p. 540 – 548, 2011.

BIHON, W.; BURGESS, T.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. High levels of genetic diversity and cryptic recombination is widespread in introduced populations. **Australasian Plant Pathol**, p. 41– 46, 2012.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p. 21 - 32, 2015.

BRAUN, G. H. Exploração do Potencial Químico e Biológico de Fungos Endofíticos e de Fungos Derivados de Ambiente Marinho em Associação Ecológica com Ascídias. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista, 2018.

BORGES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos Secundários De Plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v. 11, n. 1, p. 54 - 67, 2020.

BÜCKER, A.; BÜCKER, N. C. F.; SOUZA, A. Q. L.; GAMA, A. M.; RODRIGUES-FILHO, E.; COSTA, F.M.; NUNEZ, C.V.; SILVA, A.C.; TADEI, W. P. Larvicidal effects of endophytic and basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles* larvae (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 4, p. 411 - 419, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0063-2013>

BUENO, C. J.; FISCHER, I. H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 3, n. 2, 2006.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira 6ª Edição**, v. 1 e v. 2, 2019.

CALMES, B.; GUILLEMETTE, T.; TEYSSIER, L.; SIEGLER, B.; PIGNÉ, S.; LANDREAU, A.; IACOMI, B.; LEMOINE, R.; RICHOMME, P.; SIMONEAU, P. Role of mannitol metabolism in the pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola*. **Frontiers in Plant Science**, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00131>.

CARVALHO, J. L. S.; CUNICO, M. M.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Termoeabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1031 – 1035, 2009.

CASADEVALL, A. Determinants of virulence in the pathogenic fungi. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 130-132, 2007.

CHON, S. U.; KIM, Y. M.; LEE, J. C. Herbicidal potential and quantification of causative allelochemicals from several Compositae weeds. **Weed Research**, v. 43, p. 444 - 450, 2005.

CHOW, C. K. S. Penetration of young stems of *Pinus radiata* by *Diplodia pinea*. **Physiological Plant Pathology**, v. 12, p. 189-192, 1978.

CÓSER, I.; BRANDÃO, A. A. F.; RAPOSO, N. R. B.; GONÇALVES, E. Determinantes das patentes em ciências da vida e da saúde nas universidades federais de Minas Gerais, Brasil: uma análise de dados em painel para o período 1995-2016. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 1-14. DOI: 10.1590/0102-311X00097517.

CONCEIÇÃO, E. M. Produção de ácidos graxos por fungos da ordem mucorales em meio de cultura alternativo a base de milhocina e efluente da indústria de sorvete. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

CORRÊA, P. R. R.; MACEDO, L. M.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. Caracterização de isolados de *Diplodia pinea* da região Sul do Brasil por meio da compatibilidade micelial e de marcadores RAPD. **Summa Phytopathology**, v. 42, n. 1, p. 97 - 99, 2016.

COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; SILVA, W. C. S.; COSTA, C. L. S. Constituintes químicos, fenóis totais e atividade antioxidante de *Sterculia striata* St. Hil. et Naudin. **Acta Amazônica** v. 40, n. 1, p. 207 – 212, 2010.

CREMASCO, M. A & NAZARENO, B. P. Análise termogravimétrica do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervium* C. DC). **Acta amazônica**, v. 41, n.2, p.275 – 278, 2011.

CRUZ, R. M. S.; PEREIRA, R. C.; SILVA, B. G.; SANTOS, R. F.; BRACCINI, A. L.; FILHO, L. C.; GONZAGA, D. E. R.; PELLOSO, M. F.; RIZZO, N. M.; OLIVEIRA, S. M.; BORGES, Y. M. Atividade alelopática do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf) na qualidade das sementes de tomate. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. 1-10, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13266>.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; 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. DOI: 10.17648/diversitas-journal-v1i2.332.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Pharmacological management of children with short stature: the role of aromatase inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 172–177, 2007.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 1037-1043, 2012.

DAWN-LINSLEY, M.; EKINCI, F. J.; ORTIZ, D.; ROGERS, E.; SHEA, T. B. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. **Journal of Neurosciences Method**, v. 141, n. 2, p. 219 - 222, 2005.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. London: John Wiley & Sons, 2002, 517p.

DIAS J. F. G.; CÍRIO G. M.; MIGUEL M. D.; MIGUEL O. G. Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 220 - 223, 2005.

FELICE, B.; DAMIANO, S.; MONTANINO, C.; DEL BUONO, A.; LA ROSA, G.; GUIDA, B.; SANTILLO, M. Effect of beta- and alpha-glucans on immune modulating factors expression in enterocyte-like Caco-2 and goblet-like LS 174T cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 153, n. 15, p. 600 – 607, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.046>.

FURLANI, R. P, Z & GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 154-157, 2007.

GONZÁLEZ, M.; GUZMÁN, B.; RUDYK, R.; ROMANO, E.; ACUÑA, M.; MARÍA, A. Spectrophotometric determination of phenolic compounds in própolis. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 22, n. 3; p. 243 – 248, 2003.

HAMEED, A.; HUSSAIN, S. A.; YANG, J.; IJAZ, M. U.; LIU, Q.; HAFIZ ANSAR RASUL SULERIA, H. A. R.; SONG, Y. Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*). **Antioxidants (Basel)**, v. 5, n. 1, 2017. DOI: 10.3390/antiox5010006.

HASAN, S.; AHMAD, A.; PURWAR, A.; KHAN, N.; KUNDAN, R.; GUPTA, G. Production of extracellular enzymes in the entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. **Bioinformation Singapore**, v. 9, n. 5, p. 238 - 242, 2013.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 1, p. 71 – 74, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00311-3](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00311-3).

HAZRA, A.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K. Thermal analysis of the evaporation of compounds used in aromatherapy using thermogravimetry. **Thermochimica Acta**, v. 392, p. 221 - 229, 2002.

HLAIEM, S.; YANGUI, I.; ROCCA, G. D.; BARBERINI, S.; DANTI, R.; BEN JAMÂA, M. L. *Diplodia* Species Causing Dieback on *Pinus Pinea*: Relationship between Disease Incidence, Dendrometric and Ecological Parameters. **Journal of Sustainable Forest**, p. 1 – 18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/10549811.2021.1944879>.

HAN, X. Q.; WU X. M.; CHAI, X. Y. Isolation, characterization and immunological activity of a polysaccharide from the fruit bodies of an edible mushroom, *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. **Food Research International**, v. 44, p. 489 – 493, 2011.

HOWLETT, B. J. Secondary Metabolite Toxins and Nutrition of Plant Pathogenic Fungi. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 371 – 375, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.004>.

INÁCIO, J. P. F. Esteróides antitumorais : a funcionalização seletiva do anel D de esteróides da série pregnano no desenvolvimento de potenciais agentes anticancerígenos, **Dissertação de Mestrado**, Universidade da Beira Interior., 2012

JALGAONWALA, R. B. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21 - 32, 2011.

JURADO, E.; CAMACHO, F.; LUZÓN, G.; VICARIA, J. M. A new model proposed for hydrolysis of lactose by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 300 - 309, 2002.

KABARA, J. J.; SWIECZKOWSKI, D. M.; CONLEY, A. J.; TRUANT, J. P. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 2, n. 1, p. 23–28, 1972.

KELLER, N. P.; TURNER, G.; BENNETT, J. W. Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 937-947, 2005.

KORTBEEK, R. W. J.; VAN DER GRAGT, M.; BLEEKER, P. M. Endogenous plant metabolites against insects. **European Journal of Plant Pathology**, v. 154, n. 1, p. 67-90, 2019.

KUSARI, S.; PANDEY, S. P.; SPITELLER, M. Untapped mutualistic paradigms linking host plant and endophytic fungal production of similar bioactive secondary metabolites. **Phytochemistry**, v.91, p. 81 – 87, 2013.

LARA, C. A. Xilanases de leveduras e fungos leveduriformes e sua aplicação em processos de produção de bioetanol lignocelulósico e panificação. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

LIANG, B.; JIN, M.; LIU, H. Water-soluble polysaccharide from dried *Lycium barbarum* fruits: Isolation, structural features and antioxidant activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1947-1951, 2011.

LIGON, B. L. Penicillin: its discovery and early development. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, 15, p. 52 - 57, 2004.

LIMA, C. P.; SANTOS, L. M. O.; OLIVEIRA, L. A.; TIBULO, E. P. S. Análise de amostras de flores de *Calêndula* (*Calendula officinalis* L., Asteraceae) comercializadas na grande Curitiba. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 251 - 258, 2014.

LIMA JUNIOR, D. M.; RANGEL, A. H. N.; URBANO, S. A.; MORENO, G. M. B. Oxidação lipídica e qualidade da carne ovina. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n.1, p.14 - 28, 2013.

LISBOA, A. J. M.; QUEIROZ, F. J. G.; GIOTTO, A. C.; SANTOS, J. F. D.; SILVA, K. C. D. Análises fotoquímicas de *Copaifera langsdorffii* DESF. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, v. 7, n. 3, p. 208 - 213, 2018.

LOBATO, R. C.; VARGAS, V. S.; SILVEIRA, E. S. Sazonalidade e prevalência de fungos anemófilos em ambiente hospitalar no Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v. 11, n. 2, p. 21 - 28, 2009.

LUCHI, N.; PRATES, N.; SIMI, L.; PAZZAGLI, M.; CAPRETTI, P.; SCALA, A.; SLIPPERS, B.; PINZANI, P. High-Resolution Melting Analysis: a new molecular approach for the early detection of *Diplodia pinea* in Austrian pine. **Fungal biology**, p. 715 - 723, 2011.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, p. 2512 - 2521, 2000.

MARTÍNEZ, G. E. M.; SEGOVIA, F. I.; FUENTES, L. A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. **Agronomía i del Medi Natural**, 2015. DOI: <http://hdl.handle.net/10251/52056>.

MCCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals), **Life Sciences** v. 22, p. 476 - 484, 2005.

MEENA, K. R.; KANWAR, S. S. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. **BioMed Research International**, [s.l.], v. 2015, 2015.

MENG, X., YANG, J., XU, X., ZHANG, L., NIE, Q., XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renew Energy**, v. 34, p. 1 - 5, 2009.

MERINO, F. J. Z.; OLIVEIRA, V. B.; PAULA, C. S.; e.a. Phytochemical analysis, antioxidant potential and toxicity of crude ethanol extract and fractions of the species *Senecio westermanii* Dusén against *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1031 - 1040, 2015.

MICHEREFF, J. S. "Fungos como agentes de doenças de plantas". **Universidade Federal Rural de Pernambuco - Departamento de Agronomia - Área de Fitossanidade**, 2013.

MIGUEL, O. G. Ensaio sistemático de análise em fitoquímica. **Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR**, Curitiba, 2003.

MILANDRI, R.; MALTAGLIATI, M.; BOCCHIALINI, T.; DEL PRETE, C.; BIANCHI, G.; ROCCO, B. M.; MICALI, S. Effectiveness of D-mannose, *Hibiscus sabdariffa* and *Lactobacillus plantarum* therapy in prevention of infectious events following urodynamic study. **Urologia Journal**, v. 86, n. 3, p. 122 - 125, 2019. DOI: 10.1177/0391560318798291. Epub 2018 Sep 12.

MONEY, N. P. Chapter 12 - Fungi and Biotechnology. **The Fungi (Third Edition)**, p. 401- 424, 2016.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo** Universidade Federal de Lavras, p. 729, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOURA, P. F. Caracterização e otimização dos métodos de cultivo dos fungos *Armillaria sp.*, *Botrytis cinerea* e *Diplodia pinea*, estudo químico e avaliação das atividades biológicas de extratos de *Diplodia pinea*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, 2017.

MOURA, P. F.; AUER, C. G.; RECH, K. S.; OLIVEIRA, C. F.; OLIVEIRA, C. S. P.; HIROTA, B. C. K.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Biotechnology of biomass production in vitro of fungi isolated from *Pinus*. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. 1 – 15, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.9080>.

MOURA, P. F.; BETIM, F. C. M.; OLIVEIRA, C. F.; DIAS, J. F. G.; MONTRUCCHIO, D. P.; MIGUEL, O. G.; AUER, C. G.; MIGUEL, M. D. Larvicidal activity of *Diplodia pinea* extracts against *Aedes aegypti*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p., 1 – 8, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i2.12295.

NAGATA, Y.; ISHIZAKI, I.; WAKI, M.; e.a. Palmitic acid, verified by lipid profiling using secondary ion mass spectrometry, demonstrates anti-multiple myeloma activity. **Leukemia Research**, v. 39, n. 6, p. 638–645, 2015.

OLIVEIRA, P. S. M.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. V. Utilização do D-manitol em síntese orgânica. **Química Nova**, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000200031.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 36 - 44, 2015. DOI:https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_165.

OLIVEIRA, C. F.; MOURA, P. F.; RECH, K. S.; OLIVEIRA, C. S. P.; HIROTA, B. C. K.; OLIVEIRA, M.; SILVA, C. B.; SOUZA, A. M.; DIAS, J. F.; MIGUEL, O. G.; AUER, C. G.; MIGUEL, M. D. Antagonistic activity of *Diplodia pinea* against phytopathogenic fungi. **Folia Microbiologica**, v. 64, p. 415 – 419, 2018.

OLIVEIRA, C. F. Caracterização química, avaliação das atividades biológicas e propriedades antioxidantes de *Armillaria sp.* (PHYSALACRIACEAE) e atividade antagonista de fungos fitopatogênicos. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Paraná, 2019.

OLIVER, R. P; IPCHO, S. V. S. *Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 347 - 352, 2004.

PAMPHILE, J. A.; COSTA, A. T.; ROSSETO, P.; POLONIO, J. C.; PEREIRA, J. O.; AZEVEDO, J. L. Aplicações biotecnológicas de metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos: o caso do *Colletotrichum sp.* **Revista UNINGÁ**, v. 53, n.1, p.113 - 119, 2017.

PANDI, M.; KODALINGAM, A.; MANIKANDAN, R.; MUTHUMARY, J. Larvicidal activity of two extracts of endophytic fungi isolated from *Pongamia pinnata*(L) Pierre. **Indian Journal of Applied Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 34 – 36, 2008.

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. 2003.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 34, v. 1 p. 45 - 48, 2006.

PEREIRA, A. P.; ANDRADE, J. B. Fontes, reatividade e quantificação de metanol e etanol na atmosfera. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 744 - 754, 1998.

PINHEIRO, D. M.; PORTO, K. R. A.; MENEZES, M. E. S. A Química dos Alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais. **Conversando sobre Ciências em Alagoas**, p. 1 - 54, 2005.

PINHEIRO, J. B.; POLONIO, J. C.; ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A.; GOLIAS, H. C. Atividade larvica de fungos endofíticos: uma revisão. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 35761 – 35774, 2020. DOI:10.34117/bjdv6n6-205.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.

PIRES, J. S.; TORRES, P. B.; SANTOS, D. Y. A. C. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências**, Universidade de São Paulo, p. 1 – 5, 2017.

PODDER, D.; GROSH, S. K. A new application of *Trichoderma asperellum* as anopheline larvicide for ecofriendly management in medical science. **Scientific Reports**, v. 9, a. 1108, p. 1 – 15, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37108-2>.

PRICE, D. M.; HAWKINS, M. Calorimetry of two disperse dyes using thermogravimetry. **Thermochimica Acta**, v. 315, p. 19 – 24, 1998.

QUERELLOU, J.; BØRRESEN, T.; BOYEN, C.; DOBSON, A.; HÖFLE, M.; IANORA, A.; JASPARS, M.; KIJJOA, A.; OLAFSEN, J.; RIGOS, G.; WIJFFELS, R. H. Marine Biotechnology: A New Vision and Strategy for Europe. **European Science Foundation, Marine Board**, n. 15, p 1- 93, 2010.

RAGAVENDRAN, C.; MANIGANDAN, V.; KAMARAJ, C.; BALASUBRAMANI, G.; PRAKASH, J. S.; PERUMA, P.; NATARAJAN, D. Larvicidal, Histopathological, Antibacterial Activity of Indigenous Fungus *Penicillium sp.* Against *Aedes aegypti* L and *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera: Culicidae) and Its Acetylcholinesterase Inhibition and Toxicity Assessment of Zebrafish (*Danio rerio*). **Frontiers in Microbiology**, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00427>

RANI, M.; SHANKER, U.; JASSAL, V. Recent strategies for removal and degradation of persistent & toxic organochlorine pesticides using nanoparticles: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 190, p. 208 – 222, 2017.

REGLINSKI, T.; TAYLOR, J. T.; AH CHEE, A.; NORTHCOTT, G.; SPIERS, M. Biochemical responses to ultraviolet-C radiation and methyl jasmonate in *Pinus radiata* seedlings that accompany induced resistance to *Diplodia pinea*. **Plant Pathology**, v. 62, p. 851 – 858. 2013.

RODRIGUES, F. A.; PIMENTA, V. S. C.; BRAGA, K. M. S.; ARAÚJO, E. G. Obtenção de extratos de plantas do Cerrado. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 23, p. 870 - 887, 2016.

ROUXEL, T.; BALESSENT, M. H. The stem canker (blackleg) fungus, *Leptosphaeria maculans*, enters the genomic era. **Mol Plant Pathol**, v. 6, p. 225 - 241, 2005.

RUFINO, M. S. M.; ALBES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, S. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP). **Comunicado Técnico – EMBRAPA**. ISSN 1679-6535. Dezembro, 2006. Fortaleza, CE.

SANTIAGO, P. A.; MARQUEZ, L. D. S.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Estudo da produção de β -Galactosidase por fermentação de soro de queijo COM *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567 - 572, 2004.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 43, n. 6, p. 413 – 423, 2007.

SARTORI, C. J.; CASTRO, A. H. F.; MORI, F. A. Teores de Fenóis Totais e Taninos nas Cascas de Angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina*). **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 3, p. 394 – 400, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/2179-8087.061113>.

SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; SERRATO, R. V; e.a. Application of acetate derivatives for gas chromatography – mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, p. 215–222, 2008.

SEIBOTH, B.; METZ, B. Fungal arabinan and L-arabinose metabolismo. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 89, n. 6, p. 1665 – 1673, 2011. DOI: 10.1007/s00253-010-3071-8. Epub 2011 Jan 7.

SHERWOOD, P.; BONELLO, P. Austrian pine phenolics are likely contributors to systemic induced resistance against *Diplodia pinea*. **Tree Physiology**, v. 33, n. 8, p. 845–854, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt063>.

SHIN, H. J. Natural Products from Marine Fungi. **Marine drugs**, v. 18, p. 230-234, 2020.

SILVA, M. L. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S.; STELLUTI, R. M.; GIESE, E. C.; BARBOSA, A. M. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 85 – 92, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100017>.

SILVA, F. B. Caracterização morfológica, fisiológica e patogênica de isolados de *Armillaria sp.* da Região Sul do Brasil. **Tese de Doutorado**, Curitiba, 2014.

SILVA, C. J. A & MALTA, D. J. N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Ciências biológicas e da saúde**, v. 2, n. 3, p. 49 – 66, 2016.

SILVA, F. B.; MAZAROTTO, E. J.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G. Caracterização morfofisiológica e patogênica de isolados de *Armillaria* na região Sul do Brasil. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 23 - 31, 2018 a.

SILVA, L. A.; RAPOSO, J. D. A.; CAMPOS, L. P. G.; CONCEIÇÃO, E. C.; OLIVEIRA, R. B.; MOURÃO, R. H. V. Atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. por diferentes métodos de análises antioxidantes (ABTS, DPPH, FRAP, β caroteno/ácido linoleico). **Revista Fitos**, v. 12, n. 2, p. 117 – 126, 2018 b. DOI: 10.5935/2446-4775.20180011.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição** v. 17, n. 2, p. 227 – 236, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-52732004000200009>

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro. 2007.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia Salina* Leach. DFB - CCBS - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Departamento de Química – CCET. **Química nova**, v. 21, n. 5, 1998.

SORGER, D.; DAUM, G. Triacylglycerol biosynthesis in yeast. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 61, p. 289–299, 2003.

SOROKINA, M.; STEINBACK, C. Review on natural products databases: where to find data in 2020. **Journal of Cheminformatics** v.12, p. 1-51, 2020.

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A. C.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILE, J. A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 16, n. 4, p. 345 – 351, 2014.

SPIASSI, A.; NÓBREGA, L. H. P.; ROSA, D. M.; PACHECO, F. P.; SENEM, J.; PICCOLO DE LIMA, G. Allelopathic effects of pathogenic fungi on weed plants of soybean and corn crops. **Bioscience Journal**, v. 31, n. 4, p. 1037–1048, 2015.

STANOSZ, G.; SWART, W.; SMITH, D. RAPD marker and isozyme characterization of *Sphaeropsis sapinea* from diverse coniferous hosts and locations. **Mycological Research**, v. 103, n. 9, p. 1193-1202, 1997. DOI:10.1017/S0953756299008382

STROBEL, G. A.; KOSUGE, T. Polyol metabolism in *Diplodia viticola* Desm. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 109, v. 3, p. 622–626, 1965. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(65\)90409-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(65)90409-1)

SUGIHARTO, S.; YUDIARTI, T.; ISROLI, I. Assay of Antioxidant Potential of Two Filamentous Fungi Isolated from the Indonesian Fermented Dried Cassava. **Nutrients**, v. 9, n. 10, 2016. DOI: 10.3390/nu9101101.

SYNYTSYA, A.; NOVÁK M. Structural diversity of fungal glucans. **Carbohydr Polym**, n. 92, p. 792–809, 2013.

SYNYTSA, A.; NOVAK, M. Structural analysis of glucans. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 2, p. 1–14, 2014. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.02.07.

TORTORA, G.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 8ª Ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2012.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. **Pelotas: Embrapa Clima Temperado**, Documento 316, p. 1 – 16, 2010.

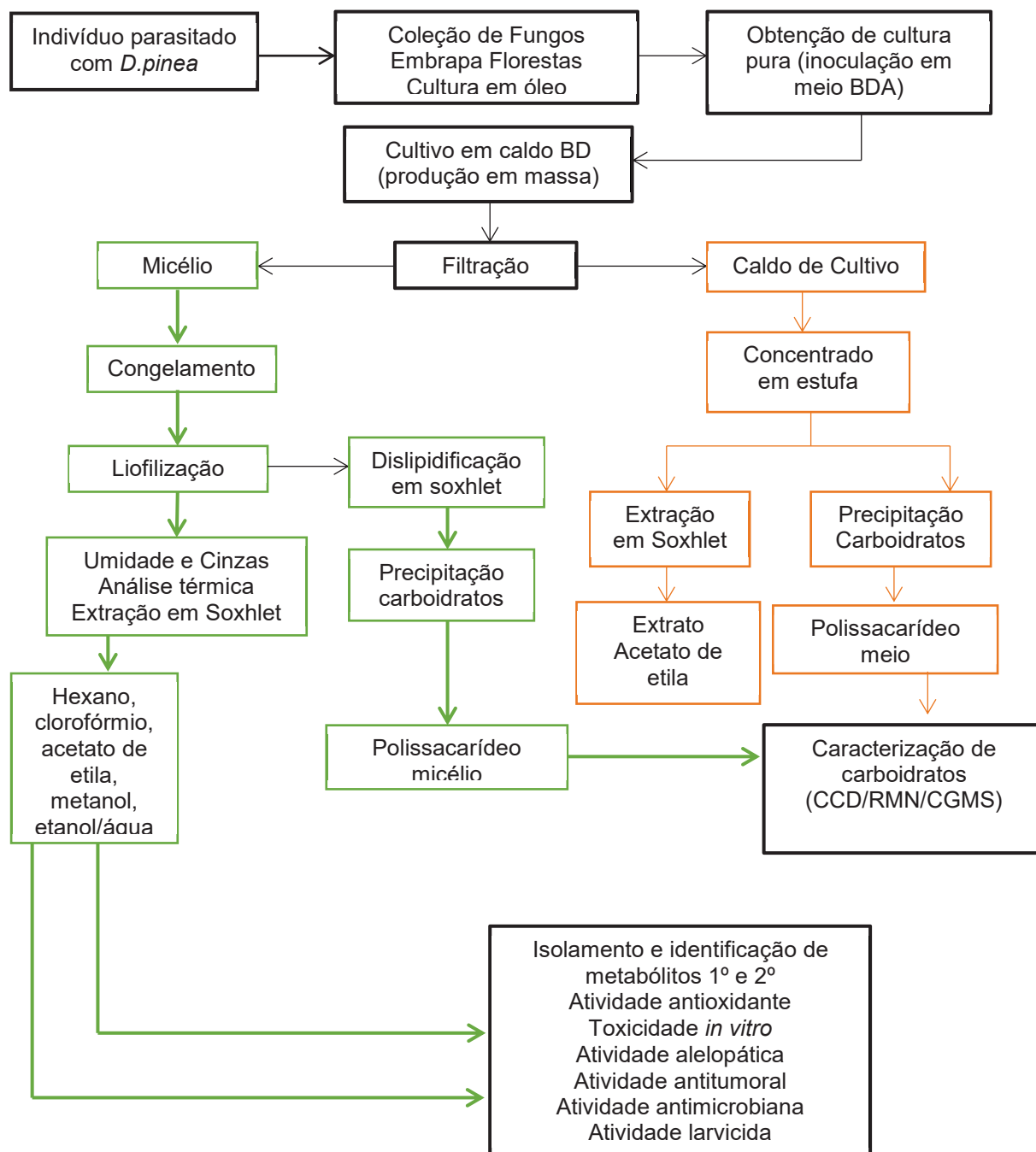
WOLFGANG, J. W. P.; PFANNENBECKER, U.; HOPPE, U. Validation of Red Blood Cell Test System as in Vitro Assay for the Rapid Screening of Irritation Potencial of Surfactants. **Molecular Toxicology**, v. 1, p. 525-536, 1987.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais – sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

ZHENG, C. J.; YOO, J.-S.; LEE, T.-G.; e.a. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5157– 5162, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 – FLUXOGRAMA COMPLETO DO ESTUDO REALIZADO



Fonte: A autora (2021).

ANEXO 2 – EXCICATA DEPOSITADA DO MATERIAL DE ESTUDO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
HERBÁRIO UNOP

Cascavel, PR, Brasil, Rua Universitária, 2069 – Jardim Universitário, CEP 85819-110, Tel. 45 32203239



Data do envio / Sent date: 14/08/2015

Herbário UNOP *Algae* - 09/2015

RECEBIDO DE UFPR

Marilis Dallarmi Miguel
Universidade Federal do Paraná
Campus III
CEP 80210-170

Finalidade do envio/Purpose:

- ☒ Doação/Gift para recebimento do VOUCHER
- ☐ Permuta/Exchange
- ☐ Devolução/Return
- ☐ Empréstimo/Loan por/for meses/months
- ☐ Prorrogação/Prorogation
- ☐ Para identificação/For identification

Material recebido:

05 amostras secas para Herbário UNOP *Algae*:

- UNOP 4240 *Armillaria* sp.
- UNOP 4241 *Botrytis cinerea*
- UNOP 4242 *Diplodia pinea*
- UNOP 4243 *Rhizoctonia* sp.
- UNOP 4244 *Sclerotinia* sp.
- UNOP 4245 *Sutillus granulatus*

Remetido por/from:

Prof. Dr. Norma Catarina Bueno
Curator Herbario UNOP *Algae*
UNIOESTE/CCBS

Favor datar, assinar e devolver uma cópia desta guia de remessa/Please sign, date, and return one copy.

Recebido em/

Assinatura/Date received:

Signature: