



**Universidade Federal do Maranhão**  
**Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,**  
**Pós-Graduação e Internacionalização**  
**Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto**  
**Mestrado Acadêmico**



**ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIBACTERIANA DE  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Euterpe oleracea* Mart.**

**Diamantino Alves**

**São Luís**

**2023**

**DIAMANTINO ALVES**

**ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIBACTERIANA DE  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Euterpe oleracea* Mart.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Processos biológicos em saúde

Linha de Pesquisa: Doenças infecciosas e endêmicas no Maranhão

Orientadora: Geusa Felipa de Barros Bezerra

Coorientadora: Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

Coordenador: Marcelo Souza de Andrade

São Luís - MA  
2023

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Alves, Diamantino.

ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIBACTERIANA DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Euterpe*  
*oleracea* Mart / Diamantino Alves. - 2023.

39 p.

Coorientador(a): Maria do Desterro Soares Brandão  
Nascimento.

Orientador(a): Geusa Felipa de Barros Bezerra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em  
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
São Luís, 2023.

1. Antibacteriana. 2. Antitumoral. 3. *Aspergillus*  
*niger*. 4. Fungo endofítico. 5. Metabólitos secundários.  
I. de Barros Bezerra, Geusa Felipa. II. Soares Brandão  
Nascimento, Maria do Desterro. III. Título.

**DIAMANTINO ALVES**

**ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIBACTERIANA DE  
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Euterpe oleracea* Mart.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Geusa Felipa de Barros Bezerra (Orientadora)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Profa. Dra. Amanda Mara Teles (Examinadora)  
Universidade Estadual do Maranhão

---

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade (Examinador)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flavia Castello Branco Vidal Cabral (Examinadora)  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Marcos Antonio Custódio Neto da Silva (Suplente)  
Universidade Federal do Maranhão

Dedico este trabalho à minha mãe, Rofina Baraca Pereira (*in memoriam*), a quem sempre admirei por ser a minha fonte de inspiração, um exemplo de ser humano, minha verdadeira heroína. Ela sempre esteve ao meu lado, cuidando de mim, ensinando-me a respeitar as pessoas de todas as idades, a ter caráter e honra. Além de me ensinar a ler e escrever à luz de vela, pois não tínhamos energia em casa.

Ao meu pai, Jorge Albino José Alves, que me incentivou e deu o seu apoio para que eu pudesse correr atrás dos meus objetivos.

Ao meu tio Joaquim Gomes, que considero meu segundo pai, por sempre me tratar como o próprio filho. Por me ajudar a realizar o meu sonho de graduar em farmácia e agora a pós-graduação.

À minha tia/mãe Fina Baraca Pereira, pelos conselhos, cuidados e pela constante preocupação com o meu bem estar.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por me conceder a vida e saúde.

À minha orientadora Profa. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra, por disponibilizar o seu tempo para me orientar ao longo desta pesquisa.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, pelo incansável ajuda, apoio moral e incentivo desde a elaboração do projeto de pesquisa até o exato momento.

Ao Professor Walbert Edson Muniz Filho, pela motivação e conselhos que certamente ajudaram muito.

Ao amigo Nilson Carlos Costa de Souza Filho, pelo apoio e pela amizade.

Ao laboratório de Micologia da Universidade Federal do Maranhão, coordenado pela minha orientadora Profa. Dra. Geusa Felipe de Barros Bezerra, pelos materiais e local que possibilitaram esta pesquisa.

Ao laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão, na pessoa da Profa. Dra. Cláudia Quintino Da Rocha, pela grande contribuição na realização da pesquisa.

Aos meus amigos, Paulo Henrique Boaes Moraes, António Alezio Ferreira Sá, Karlla Patrícia Sousa, Glauber Sales, Ítalo Moraes, pela amizade construída.

**À minha mãe, Rofina Baraca  
Pereira (*In memoriam*), pela minha  
formação moral, pela proteção,  
inspiração e motivação para lutar  
pelos meus objetivos.**

ALVES, DIAMANTINO. **ATIVIDADE ANTITUMORAL E ANTIBACTERIANA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Euterpe oleracea* Mart.** Dissertação (Mestrado em Saúde do Adulto). Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto. Universidade Federal do Maranhão, São Luís-MA, 2023.

## RESUMO

Os fungos são organismos unicelulares ou multicelulares com células eucarióticas, ou seja, com um núcleo rodeado por uma membrana. Estes organismos são heterotróficos e não possuem plastídeos ou pigmentos fotossintéticos. Dependendo do tipo de poros produzidos durante seu ciclo de vida, os fungos podem ser classificados como: Mastomycetes, Leveduras, Zygomycota, Basidiomycota e Ascomycota. O termo "metabolismo secundário" foi introduzido pela Bu'Lock em 1960 para designar os metabólitos microbianos que não são essenciais para o metabolismo celular e são encontrados em um número limitado de taxa como produtos de diferenciação celular. O objetivo deste trabalho é avaliar a atividade antitumoral e antibacteriana do metabólito secundário de fungos endofíticos isolados de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí). Selecionou-se o fungo endofítico *Aspergillus niger*, cujo metabólito secundário isolado demonstrou resultado positivo ao ser testado em linhagens de células de câncer cervical SIHA HPV16, e os resultados obtidos com as frações aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger*, após a realização dos ensaios pela técnica de disco, demonstraram que houve inibição das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.

**Palavras-chave:** Fungo endofítico, metabólitos secundários, *Aspergillus niger*, antitumoral, antibacteriana.



ALVES, DIAMANTINO. **ANTITUMOR, ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITES OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *Euterpe oleracea* Mart.** Dissertation (Master in Adult Health). Post Graduate Program in Adult Health. Federal University of Maranhão, São Luís-MA, 2023.

## **ABSTRACT**

Fungi are unicellular or multicellular organisms with eukaryotic cells, that is, with a nucleus surrounded by a membrane. These organisms are heterotrophic and lack plastids or photosynthetic pigments. Depending on the type of pores produced during their life cycle, fungi can be classified as: Mastomycetes, Yeasts, Zygomycota, Basidiomycota and Ascomycota. The term "secondary metabolism" was introduced by Bu 'Lock in 1960 to designate microbial metabolites that are not essential for cellular metabolism and are found in a limited rate number as products of cellular differentiation. The objective of this work is to evaluate the antitumor, antibacterial and antifungal activity of the secondary metabolite of endophytic fungi isolated from *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí). The endophytic fungus *Aspergillus Niger* was selected, whose isolated secondary metabolite showed a positive result when tested in cervical cancer cell lines SIHA HPV16, and the results obtained with the aqueous fractions and ethyl acetate of *Aspergillus Niger*, after carrying out the tests using the disk technique, demonstrated that there was inhibition of the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp.

**Keywords:** Endophytic fungus, secondary metabolites, *Aspergillus niger*, antitumor, antibacterial, antifungal.

## LISTA DE FIGURAS

<a href="#"><u>Figura 1 - Palmeira de <i>Euterpe oleracea</i></u></a> .....	16
<a href="#"><u>Figura 2 - Coleta da folha de Açaí do município de Axixá</u></a> .....	17
<a href="#"><u>Figura 3 - Mapa do Município visitado para coleta da folha de <i>Euterpe oleracea</i> Mart.</u></a> .....	18
<a href="#"><u>Figura 4 - Partição em funil de separação para obtenção das substâncias químicas a serem testadas</u></a> .....	19
<a href="#"><u>Figura 5 - Gráficos do teste realizado em células de câncer cervical</u></a> .....	25
<a href="#"><u>Figura 6 - Curva da porcentagem de atividade antioxidante da fração aquosa e acetato de etila de <i>Aspergillus niger</i> pelo método DPPH</u></a> .....	27
<a href="#"><u>Figura 7 - Curvas das porcentagens de atividade antioxidante da fração aquosa e acetato de etila de <i>Aspergillus niger</i> pelo método ABTS</u></a> .....	29

## LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1 - Comparação entre as medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) pela técnica de difusão em disco utilizando da fração aquosa e acetato de etila. ....</u>	26
<u>Tabela 2 - Atividade sequestradora do radical livre DPPH e índice da atividade antioxidante do da fração aquosa e acetato de etila de Aspergillus niger.....</u>	27
<u>Tabela 3 - Atividade sequestradora do radical livre ABTS e índice da atividade antioxidante da fração aquosa e acetato de etila de Aspergillus niger.....</u>	30
<u>Tabela 4 - Determinação do percentual da atividade antioxidante da fração aquosa e acetato de etila de Aspergillus niger pelos métodos DPPH e ABTS .....</u>	30

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Fungos Endofíticos .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Aspectos gerais sobre o câncer .....</b>	<b>14</b>
<b>2.3 Euterpe oleracea MART. ....</b>	<b>15</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>17</b>
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Coleta da Euterpe oleracea Mart.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2 Cultivo e Isolamento dos fungos .....</b>	<b>19</b>
<b>4.3 Produção do metabólito .....</b>	<b>19</b>
<b>4.4 Extração do metabólito secundário e Identificação dos compostos químicos.....</b>	<b>19</b>
<b>4.5 Determinação quantitativa de compostos fenólicos totais .....</b>	<b>21</b>
<b>4.6 Procedimentos Experimentais .....</b>	<b>21</b>
4.6.1 Atividade Citotóxica .....	21
4.6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana .....	22
4.6.3 Padronização do inóculo .....	22
a) Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco....	22
b) Avaliação da atividade antioxidante, in vitro, das frações aquosa e acetato de etila de <i>Aspergillus niger</i> .....	23
4.6.4 Atividade seqüestradora do radical DPPH .....	23
4.6.5 Determinação da atividade antioxidante por ABTS .....	24
4.6.6 Determinação da Concentração Eficiente ou CE50% .....	24

4.6.7 Determinação do Índice de Atividade Antioxidante .....	25
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1 Atividade antitumoral.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2 Determinação quantitativa de compostos fenólicos totais e flavanóides totais .....</b>	<b>26</b>
<b>5.3 Atividade antimicrobiana do Aspergillus niger .....</b>	<b>26</b>
<b>5.4 Atividade antioxidante .....</b>	<b>27</b>
5.4.1 Atividade seqüestradora do radical DPPH .....	27
5.4.2 Atividade seqüestradora do radical ABTS .....	29
5.4.3 Comparação entre a atividade sequestradora do radical DPPH e ABTS	31
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
<b>6.1 Análise Estatística.....</b>	<b>34</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>34</b>
<b>Referências bibliográficas.....</b>	<b>35</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a taxonomia de Whittaker (1979), os fungos são organismos que pertencem ao reino fúngico. Estes organismos podem ser encontrados em diferentes ambientes e são ecologicamente importantes porque atuam como decompositores, mas também economicamente importantes porque são utilizados em tudo, desde medicamentos até nossos alimentos. Além disso, alguns fungos se distinguem pelo fato de causarem doenças.

Dependendo do tipo de esporos produzidos durante seu ciclo de vida, os fungos podem ser classificados como.

- Mastomycetes: são fungos que formam ascósporos. Eles têm a capacidade de viver em ambientes aquáticos (rios, lagos, oceanos) ou úmidos (desde que sejam previstas condições para o movimento dos ascósporos). Estes fungos são classificados como Chytridiomycota.

- Leveduras: estes fungos não têm a capacidade de formar ascósporos durante seu ciclo de vida. O habitat desses fungos é o solo (terra). A classificação desses fungos é baseada nos esporos sexuais que eles produzem.

Eles podem, portanto, ser classificados na seguinte fila.

- Zygomycota: produzir ascósporos. Exemplo: mofo de pão preto.

- Basidiomycota: Produz basidiosporos. Exemplos: fungos e cogumelos (comestíveis e venenosos).

- Ascomycota: produz ascósporos. Exemplos: leveduras e trufas. Muitos desses fungos produzem doenças nas plantas.

Os fungos endofíticos referem-se aos fungos que colonizam os tecidos internos das plantas durante um determinado período de sua vida sem causar sintomas nas plantas, diferente dos fungos epifíticos, que parasitam na superfície das plantas, e dos patógenos, que causam doenças nas plantas. Espécies hospedeiras podem ser infectadas lateralmente por endófitos por meio de lesões naturais (como estômatos ou crescimento de raízes) e lesões induzidas pelo homem (como as causadas por práticas agrícolas). A infecção também pode ocorrer verticalmente através das sementes do hospedeiro, caso em que o endófito pode colonizar a planta durante todo o seu ciclo de vida.

Metabólito secundário é o crescimento normal que tem, por exemplo, tanto um composto defensivo quanto uma molécula que interage entre si. São

considerados novos anti-inibidores, promotores do crescimento, herbicidas, inseticidas, antidiabéticos e inibidores.

Por outro lado, a síntese de metabólitos secundários garante que os fungos tenham uma vantagem em habitats onde eles precisam competir com outros microrganismos. Como resultado, muitos deles têm efeitos antibióticos e inibitórios sobre outros organismos.

Outras substâncias dignas de menção são os citocromos, que pertencem a um grupo de metabólitos fúngicos relacionados em estrutura e atividade biológica, com capacidade antitumoral e atividade antibiótica. Estes metabólitos exibem efeitos incluindo inibição da divisão citoplasmática e motilidade celular, indução de deslocamento nuclear, retração do coágulo e agregação plaquetária, transporte de glicose e secreção tireoidiana. Três novos citocromos foram relatados como derivados do fungo endófito *Rhinochadiella sp.* do *Tripterygium wilfordii*. Outro citocromo importante é o Phomopsolida, um metabólito do fungo *Phomopsis sp.* Ele tem atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*; e atividade antifúngica contra *Candida tropicalis*. (WAGENNAR et al., 2000).

*Aspergillus niger* é um fungo muito utilizado pela indústria farmacêutica. Tem grande importância no que diz respeito a biotecnologia. Produz compostos a nível industrial como ácido cítrico, ácido glucônico, ácido málico, vitamina C e muitas enzimas por meio do processo de fermentação (AFONSO, 2015).

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

Os fungos são organismos unicelulares ou multicelulares com células eucarióticas, ou seja, com um núcleo rodeado por uma membrana. Estes organismos são heterotróficos e não possuem plastídeos ou pigmentos fotossintéticos. A hifa é a unidade estrutural do fungo e seu agregado é conhecido como micélio, que, por sua vez, é responsável pelo desenvolvimento e absorção de nutrientes do fungo (SANTOS, 2023).

## 2.1 Fungos Endofíticos

O termo endófito originalmente descrito por De Bary em 1866, refere-se a qualquer micro-organismo que vive nos tecidos de plantas, distinguindo-se dos epifíticos que vivem na superfície (CHAPLA, et al. 2013). Os micro-organismos endófitos associados a plantas representam uma fonte inexplorada de produtos naturais novos e bioativos, com mais de 20000 substâncias descritas sendo que destas 51% apresentam estruturas inéditas e 80% atividade biológica (CHAPLA, V. M. et al. 2013).

O termo "metabolismo secundário" foi introduzido pela Bu'Lock em 1960 para designar os metabólitos microbianos que não são essenciais para o metabolismo celular e são encontrados em um número limitado de taxa como produtos de diferenciação celular. Este termo é usado por fisiologistas de plantas para indicar a presença de alcalóides (LANCINI et al., 1995).

Metabólitos secundários derivados de fungos endófitos são compostos que geralmente apresentam estruturas complexas, baixo peso molecular e atividade biológica significativa e, portanto, têm atraído atenção no campo da saúde (Calderani et al., 2016). Santos et al. (2020) isolaram fungos endofíticos da espécie umbuzeiro (*Spondias tuberosa Arruda Câmara*). Assim, obtiveram 60 isolados fúngicos diferentes, dos quais 23,33% tinham potencial para produzir amilase, 16,67% tinham potencial para produzir lipase e 36,67% tinham potencial para produzir pigmentos, que podiam ser usados nas indústrias farmacêuticas e alimentícias.

A maioria dos endófitos é capaz de sintetizar compostos bioativos que podem fornecer defesa e proteção às plantas contra patógenos. Alguns desses compostos podem ser úteis para a descoberta de novas drogas. Alguns endófitos demonstraram ser benéficos para as plantas, promovendo o crescimento, a fixação de nitrogênio (BERTALAN et al., 2009) e a supressão de doenças. Eles são principalmente bactérias e fungos, embora archaeae, algas, protozoários e nematódeos sejam raramente encontrados vivendo como endófitos; no entanto, eles têm um impacto significativo sobre as plantas (BERENDSEN et al., 2012). Eles ajudam a obter nutrientes do meio ambiente, tais como fósforo, ferro e nitrogênio, ou por meio da produção de hormônios vegetais tais como auxina, IAA, giberelinas e



etileno, e podem beneficiar indiretamente o crescimento das plantas através da supressão de patógenos vegetais causadores de doenças (SANTOYO et al., 2016).

Algumas descobertas importantes ao estudar os metabólitos secundários dos fungos foram a produção de antibiótico a partir de um gênero fúngico *Penicillium* que deu origem ao primeiro antibiótico, a penicilina, realizada em 1928 (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2011). Outra grande descoberta no estudo de fungos foi o isolamento de ciclosporina, por volta de 1970, a partir dos fungos de solo *Tolypocladium inflatum* e *Cylyndrocarpon lucidum* (SILVA; COELHO, 2006)

Os fungos endofíticos podem induzir a produção de metabólitos primários e secundários que melhoram o desempenho do seu hospedeiro, protegendo o hospedeiro de herbívoros, patógenos e situações ambientais adversas (FELIX, Thaís, 2019). De forma geral, todas as plantas possuem fungos endofíticos, podendo algumas possuir mais de um (01) tipo de fungo endofítico, como é o caso da aroeira *Schinus terebinthifolius Raddi*, que, ao ser estudado por Felix (2019), descobriu-se que possui quatro tipos de fungos endofíticos. Tais fungos ainda não foram especificados, porém servem de exemplo de que certas plantas podem possuir vários tipos de fungos endofíticos.

Os fungos têm um papel fundamental no ecossistema, nos processos de decomposição, reciclagem e transporte de nutrientes no ambiente. Os fungos endofíticos são diferentes de fungos patogênicos, pela ausência de danos à planta hospedeira pela interação fungo-planta, mantendo uma relação harmônica mutualística ou simbiótica. Assim, são capazes de biossintetizar diversos compostos farmacologicamente úteis e ainda imitar as plantas hospedeiras na produção de metabólitos bioativos (CALDERANI; ORLANDELI; PAMPHILE 2016; MARTINEZ-KLIMOVA et al., 2017).

## **2.2 Aspectos gerais sobre o câncer**

Convém uma abordagem sobre câncer, pois, no presente estudo, foi desenvolvida atividade anti-tumoral em células, com metabólitos secundários de *A. niger*.

O câncer é um problema mundial de saúde e de difícil tratamento e cura. É uma doença crônica decorrente do aumento da expectativa de vida e da urbanização e conseqüentes mudanças no meio ambiente (SILVA et al., 2020).

No entanto, as moléculas bioativas oriundas de metabólitos secundários de fungos endofíticos estão sendo consideradas fontes promissoras com potencial farmacológico e propriedades terapêuticas (CALDERANI; ORLANDELI; PAMPHILE 2016).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (2022), são esperados 704 mil casos novos de câncer no Brasil para cada ano do triênio 2023-2025, com destaque para as regiões Sul e Sudeste, que concentram cerca de 70% da incidência. Ainda de acordo com a Instituto Nacional de Câncer, do total dos 704 mil novos casos de câncer a cada ano no País durante o triênio 2023-2025, 70% dos casos estão previstos para as regiões Sul e Sudeste. O câncer de mama em mulheres (Sul: 71,44/100 mil; Sudeste: 84,46/100 mil), o de próstata (Sul: 57,23/100 mil; Sudeste: 77,89/100 mil) e o de cólon e reto (Sul: 26,46/100 mil; Sudeste: 28,75/100 mil) são os três tipos mais incidentes nessas duas regiões. Já nas regiões Norte e Nordeste, o câncer de próstata (Norte: 28,40/100 mil; Nordeste: 73,28/100 mil) é o mais incidente, seguido do câncer de mama feminina (Norte: 24,99/100 mil; Nordeste: 52,20/100 mil) e câncer do colo do útero (Norte: 20,48/100 mil; Nordeste: 17,59/100 mil).

### **2.3 Euterpe oleracea MART.**

Foi a planta escolhida para estudar fungos endofíticos, daí um breve entendimento sobre esta espécie.

A *Euterpe oleracea* Mart. pertence à família Arecaceae e apresentada 200 gêneros e cerca de 2.600 espécies, abrangendo regiões tropicais e subtropicais. Na região Amazônica, esta família compreende 39 gêneros e estima-se 150 a 180 espécies. Dentro deste gênero, a *Euterpe oleracea*, *Euterpe edulis* e a *Euterpe precatória* são as de maior importância econômica, nutricional e medicinal (FREITAS, *et al.*, 2015).

Além disso, a *Euterpe oleracea* Mart. é popularmente conhecida e encontrada principalmente em terras baixas e em florestas inundadas pelo estuário do rio Amazonas, nos estados brasileiros do Pará, Maranhão, Tocantins, Amapá, além da Guiana Francesa e da Venezuela. Apesar da maior quantidade de espécies de *Euterpe Oleracea* concentradas no lado oriental da floresta amazônica, também é

observada uma quantidade considerável na região setentrional da América do Sul (YAMAGUCHI et al, 2015).

É uma palmeira rica em composição fitoquímica, como ácidos fenólicos, antocianinas - especialmente cianidina-3-orutinosida, Cianidina-O-glucosido - proantocianidinas, ligninas - tais como ariltetrahidronaftaleno, dihidrobenzofurano, furofurano, 8-O-4-neolignano, Tetrahydrofurano - e constituintes polifenólicos – tais como a epicatequina, a catequina homoorientina, orientina, isovitexina, taxifolino desoxihexose (PACHECO-PALENCIA *et al* 2008; KANG *et al.*, 2011; HOLDERNESS *et al.*, 2011; GORDON *et al.*, 2012; MULABAGAL; KELLER; CALDERON, 2012; MOURA *et al.*, 2012; LASLO *et al.*, 2013; GIRONES-VILAPLANA *et al*, 2014).

O estudo composicional da *Euterpe oleracea* Mart. tem revelado rico perfil de ácidos graxos, conteúdo mineral, taninos, polifenóis, antocianinas. Tal composição expressa intervenção eficaz na promoção do envelhecimento saudável e na redução dos danos oxidativos (YAMAGUCHI et al., 2015).

Figura 1 - Palmeira de *Euterpe oleracea*



Fonte: Autor

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antitumoral e antibacteriana do metabólito secundário de fungos endofíticos isolados de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí).

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar a microbiota fúngica presente na palmeira da *Euterpe oleracea* Mart.;
- Extrair os metabólitos secundários dos fungos isolados da *Euterpe oleracea* Mart.;
- Determinar quantitativamente os compostos fenólicos totais;
- Avaliar a atividade antitumoral e antibacteriana do metabólito secundário produzido pelos fungos isolados da *Euterpe oleracea* Mart.

### 4 METODOLOGIA

#### 4.1 Coleta da *Euterpe oleracea* Mart.

Foram coletadas em outubro de 2020, folhas da palmeira de *Euterpe oleracea* Mart. do município de Axixá (Maranhão), distante de São Luís, latitude: -2°50'31.200, longitude: -44°3'54.000, por ser grande produtor de açaí no Estado. Após a coleta, foram realizadas as exsiccatas e estas serão depositadas no Herbário Ático Seabra (SLS) da Universidade Federal do Maranhão.

Figura 2 - Coleta da folha de Açaí do município de Axixá.



Fonte: Autor

Figura 3 - Mapa do Município visitado para coleta da folha de *Euterpe oleracea* Mart.



## 4.2 Cultivo e Isolamento dos fungos

Para o isolamento dos fungos, as folhas retiradas da *E. oleracea* Mart. foram trituradas e pesadas (25g), diluídas (250mL) em água destilada estéril e semeadas em meio de cultura Ágar Sabouraud-Dextrose (SDA) e incubadas a 25°C e 37°C em estufa BOD até obter o crescimento dos fungos. As colônias crescidas foram isoladas em tubo com meio de cultura SDA para obtenção da cultura pura, seguido de microcultivo para melhor caracterização morfológica seguido da identificação comparativa com atlas ou imagens de artigos científicos. Foram identificados os seguintes fungos: *aspergillus niger*, *fusarium sp*, *aspergillus flavus*, *penicillium* e *fungo dematiaceo*.

## 4.3 Produção do metabólito

O metabólito secundário foi produzido a partir do fungo *Aspergillus niger*, fungo de maior frequência em isolamento. Fragmentos (6 mm) da cultura de fungos foram inoculados em meio líquido com o auxílio de uma pipeta de vidro em meio Caldo Sabouraud-dextrose (SDB), adicionado em frascos Erlenmeyers de 250mL, contendo em cada 50 mL de caldo, para inóculo e extração.

## 4.4 Extração do metabólito secundário e Identificação dos compostos químicos

A extração do metabólito secundário obedeceu aos protocolos do Laboratório de Química da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

Após 22 dias de cultivo, o micélio crescido nos meios líquidos foi separado do meio de cultura por filtração à vácuo, utilizando Kitassato e o funil de büchner. O micélio foi extraído com 20 mL da mistura binária acetato de etila/ metanol, na proporção 1:1 (AcOEt/MeOH 1:1). A parte líquida restante foi utilizada para extração de metabólito.

Em um erlenmayer com meio caldo de Batata Dextrose, foram adicionados três (03) fragmentos do micélio crescido na placa e deixado em extração por 22 dias. Foi realizada a filtração do extrato, no qual foi aproveitada a parte aquosa e o micélio foi descartado (podendo guardar o micélio para pesquisas posteriores). Foi

adicionado álcool etílico a 99% PA na parte aquosa filtrada. Deixado por 24 horas em extração, em seguida o solvente foi retirado por meio do rotaevaporador. Foi adicionado outro solvente, acetato de etila, na proporção de 1:1 e colocado no funil de separação (processo de partição), deixado por uma hora (01 hora). Após esse tempo, foi separada a parte aquosa do solvente (acetato de etila), que fica na parte superior do funil de separação. O processo foi repetido três vezes. Na parte superior aproveitada, ficam as substâncias químicas do extrato. Em seguida, foi adicionado sulfato de sódio anidro para absorver água contida no extrato acetato de etila. Depois, foi passado no rotaevaporador para retirar o acetato de etila, aproveitando apenas as substâncias químicas que foram utilizadas nos nossos testes.

Figura 4 - Partição em funil de separação para obtenção das substâncias químicas a serem testadas



Fonte: Autor

#### 4.5 Determinação quantitativa de compostos fenólicos totais

A determinação de fenólicos totais nas frações foi realizada através do método colorimétrico quantitativo de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2012) com modificações. Para a determinação da curva padrão expressa em ácido gálico, foi preparada uma solução de 1.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a qual originou seis diferentes diluições (5 a 100  $\mu\text{g ácido gálico mL}^{-1}$ ) no qual foi usada de cada concentração 0,5 mL, enquanto que para análise das frações foi realizado apenas com uma concentração 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  no qual acrescentamos apenas 1 mL e em seguida, foram acrescentados 1,0 mL da solução de Folin-Ciocalteu 5% (v/v), e 1,0 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m/v). Sendo essa solução homogeneizada e colocada sob abrigo de luz por 30 min., logo após, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis (Quimis, Mod.Q-898U2M5) a 765nm, utilizando cubeta de quartzo de campo único de 1 cm.

Os resultados da absorbância foram verificados graficamente em função da concentração de ácido gálico, através da equação de regressão. Os ensaios foram realizados em triplicata. O teor de fenólicos totais foi calculado utilizando a equação de regressão obtida a partir da curva de ácido gálico, e com os valores da absorbância conforme equação 1.

$$FT = \frac{X_{FT}}{0,001} \text{ Eq. 1}$$

Onde: FT: teor de compostos fenólicos totais expressos em mg EAG g<sup>-1</sup>; X<sub>FT</sub> = valor de “x” da equação de regressão obtida pela curva do ácido gálico.

#### 4.6 Procedimentos Experimentais

##### 4.6.1 Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica do metabólito do fungo foi realizada em parceria com Laboratório de Cultura de Células da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), em linhagens de células tumorais. A avaliação da citotoxicidade foi realizada pelo método do MTT- ensaio da atividade metabólica mitocondrial -, método comumente utilizado nos ensaios de citotoxicidade. As células foram plaqueadas em diferentes



concentrações céls/mL para as linhagens MCF-7, HeLa, DU-145 e GM07492-A. O tempo de incubação do ensaio foi de 72h. Os experimentos de concentração única foram analisados segundo a média  $\pm$  desvio padrão (DP) da porcentagem de inibição do crescimento celular usando o programa *GraphPad Prism 5*.

#### **4.6.2 Avaliação da atividade antimicrobiana**

Foram utilizadas três cepas microbianas provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC) doadas pelo Laboratório de Microbiologia do Controle de Qualidade de Alimentos e Água da Universidade Federal do Maranhão (PCQA-UFMA), sendo duas Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella* sp. (ATCC 14028) e uma Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). A identificação das cepas foi confirmada pelo uso de ensaios bioquímicos, seguindo as recomendações do manual de microbiologia clínica (MURRAY, 2003).

#### **4.6.3 Padronização do inóculo**

Culturas microbianas puras mantidas em ágar TSA sob refrigeração foram repicadas para caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 35°C até atingirem fase exponencial de crescimento (4-6h). Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma turbidez comparável à da solução padrão de McFarland 0,5, o que resulta em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003).

#### **a) Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco**

A técnica de disco foi realizada segundo Clinical and Laboratory Standards Institute (2008), que padroniza os testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão. Primeiro foi preparado as placas com o meio de cultura Ágar Mueller Hinton (AMH) após sua solidificação foi distribuído a suspensão microbiana na superfície do ágar e deixado em repouso a temperatura ambiente por 30 min. Logo após foram preparados os discos contendo 50  $\mu$ L na concentração de  $1.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

das frações, controle positivo (gentamicina) e controle negativo (DMSO 0,1%). Utilizando-se pinça esterilizada, os discos foram distribuídos sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24 horas.

Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Esses ensaios foram feitos em triplicata. Os valores dos halos de inibição foram as médias das medidas dos três resultados e forneceram informação sobre o potencial inibitório das frações em estudo sobre as cepas testadas.

#### **b) Avaliação da atividade antioxidante, in vitro, das frações aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger***

Os ensaios para a avaliação da atividade antioxidante foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Maranhão. A atividade antioxidante foi avaliada por dois métodos in vitro – pelo ensaio do radical livre DPPH e do radical ABTS.

#### **4.6.4 Atividade seqüestradora do radical DPPH**

Este ensaio baseia-se na capacidade de seqüestradora do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila), de acordo com a metodologia descrita por Brand-Willians e Berset (1995). Uma alíquota (300µL) da amostra (frações), nas concentrações 10 a 350 µg.mL<sup>-1</sup>, foram misturadas com 3,0 mL de solução de DPPH na concentração de 40 µg.mL<sup>-1</sup>. Procedeu-se da mesma forma para preparação da solução denominada controle, porém substituindo-se 300µL da amostra por etanol. Na solução denominada Branco, foi utilizado solvente etanol PA. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, o grau de descoloração do radical DPPH foi medido através da leitura da absorbância em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

As absorbâncias obtidas foram convertidas em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) através da equação descrita abaixo (MENSOR et al, 2001):

$$AA\% = 100 - \{[(Absa - Absb) \times 100] \div Absc \}$$

Onde: AA% : atividade antioxidante em porcentagem

Absa : absorbância da amostra (fração aquosa e acetato)

Abs<sub>b</sub> : absorvância do branco

Abs<sub>c</sub> : absorvância do controle

#### 4.6.5 Determinação da atividade antioxidante por ABTS

Foi realizado o método de descoloração do ABTS, de acordo com a metodologia proposta por Re et al (1999). A partir das concentrações das frações 10 a 350 µg.mL<sup>-1</sup> preparou-se a mistura reacional com o cátion radical ABTS. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 30 µL de cada concentração das frações em estudo em tubos de ensaio contendo 3,0 mL do cátion radical ABTS e se homogeneizou em agitador de tubos. Após 6 minutos, realizou-se a leitura da absorvância da mistura reacional em espectrofotômetro em comprimento de 734 nm.

As análises foram realizadas em triplicata e a captura do radical livre foi expressa em porcentagem de inibição (%I) do cátion radical ABTS de acordo com a fórmula abaixo (HONG et al, 2014):

$$I(\%) = \left( \frac{Abs_B - Abs_A}{Abs_B} \right) * 100$$

Onde: I% : Porcentagem de inibição do cátion ABTS

Abs<sub>A</sub> : absorvância da amostra (fração aquosa e acetato) após 6 min

Abs<sub>B</sub> : absorvância em 734nm da solução do radical ABTS

#### 4.6.6 Determinação da Concentração Eficiente ou CE50%

A concentração eficiente ou CE50% representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH ou radicais ABTS. Construiu-se uma curva exponencial de primeira ordem plotando-se, na abscissa, as concentrações das amostras (fração aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger*) e na ordenada a porcentagem de DPPH ou ABTS reduzido.

As frações aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger* são consideradas ativos quando apresentarem CE50% < 500 µg.mL<sup>-1</sup> (CAMPOS et al, 2003).

#### 4.6.7 Determinação do Índice de Atividade Antioxidante

O índice de atividade antioxidante (IA) é apropriado para a comparação da força antioxidante entre frações aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger*, calculado usando a fórmula abaixo (SHERER; GODOY, 2009):

$$IA = \frac{A \text{ concentração final do radical } (\mu\text{g mL}^{-1})}{CE_{50}(\mu\text{g mL}^{-1})}$$

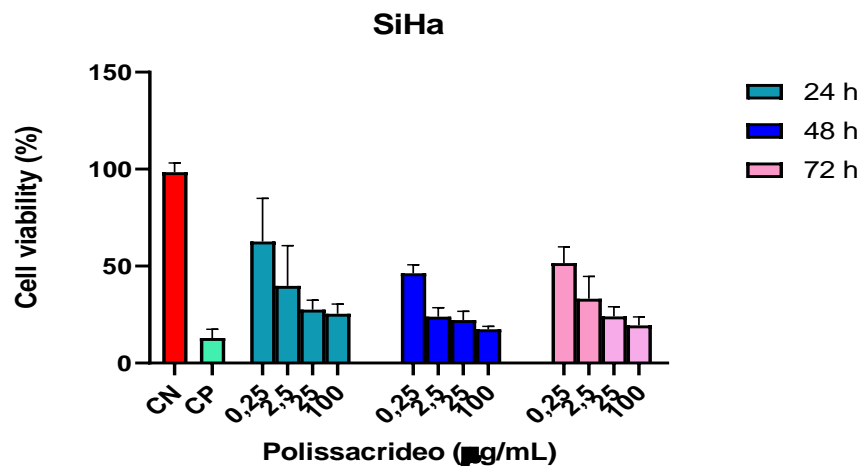
De acordo com a fórmula acima temos uma pobre atividade antioxidante quando IA for < 0,5 < 0,5 ele possui uma moderada atividade antioxidante quando IA estiver entre 0,5 e 1,0, forte atividade quando IA estiver entre 1,0 e 2,0 e muito forte quando IA for > 2,0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Atividade antitumoral

O metabólito secundário isolado, demonstrou o resultado positivo ao ser testado em linhagens de células de câncer cervical SIHA HPV16, reduzindo a proliferação celular.

Figura 5 - Gráficos do teste realizado em células de câncer cervical.



Fonte: Autor

## 5.2 Determinação quantitativa de compostos fenólicos totais e flavanóides totais

O conteúdo dos compostos fenóis e flavonoides totais das frações acetato de etila e aquosa estão apresentados na Tabela 4. Em que verificamos que o cálculo para determinação de fenólicos totais foi realizado através da equação de regressão  $y = 0,0009x + 0,0681$ , com  $R^2$  de 0,9961, com o padrão ácido gálico e flavonoides totais com a equação de  $y = 0,0294x - 0,0898$ , com  $R^2$  de 0,9961, em que o padrão usado foi a quercetina.

**Tabela 4:** Teor de Compostos fenólicos totais e Flavonoides totais das frações acetato de etila e aquosa. Valores médios (n=3). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si segundo o teste T não pareado, ( $p < 0,05$ ).

Fração	Conteúdo de fenólicos totais (mg EAG g <sup>-1</sup> )*	Conteúdo de flavonoides totais (mg EQ g <sup>-1</sup> )*
Acetato de etila	131,6 <sup>a</sup> ± 2,286	
Aquosa	111,9 <sup>b</sup> ± 2,044	

\*EAT = equivalente em ácido gálico e EAQ = equivalente em Quercetina.

Fonte: Autor.

Foi realizado o teste T não pareado e verificamos que as Frações foram diferentes estatisticamente si ( $P = 0,0028$ ) para os fenólicos totais e podemos afirmar que o fração acetato de etila apresentou a maior quantidade de fenóis.

## 5.3 Atividade antimicrobiana do *Aspergillus niger*

Os resultados obtidos com as frações aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger*, após a realização dos ensaios pela técnica de disco, demonstraram que houve inibição das bactérias testadas, pela formação de halos de inibição ao redor dos discos onde foram depositadas frações testadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre as medidas dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm) pela técnica de difusão em disco utilizando da fração aquosa e acetato de etila.

Micro-organismos	Fração Acetato de etila	Fração Aquosa	Gentamicina
<i>S. aureus</i>	15,67±0,57	13,33±0,57	15,67±0,57
<i>Salmonella sp</i>	13,33±0,57	9,33±0,57	14,67±0,57
<i>Escherichia coli</i>	14,67±0,57	10,33±0,57	16,33±0,57

Fonte: Autor

Em relação às frações de *Aspergillus niger* testadas, foi possível observar que houve diferença entre os halos de inibição. Verificou-se que a fração acetato de etila apresentou halos de inibição superiores aos da fração aquosa, o que pode estar relacionado diretamente à sua composição química. Verificou-se, ainda, que a bactéria Gram negativa foi mais sensível frente as frações em estudo e o antibiótico de uso comercial demonstrou eficiência similar a fração de acetato de etila frente ao *S. aureus*.

## 5.4 Atividade antioxidante

### 5.4.1 Atividade seqüestradora do radical DPPH

O radical DPPH avalia atividade antioxidante através de um ensaio que determina a capacidade sequestradora de radicais livres. Apresenta coloração roxa intensa em solução alcoólica, reduz em presença de moléculas antioxidantes, ocasionando o descoloramento, através da doação de um átomo de hidrogênio ao radical, mudando sua coloração para amarelo, sendo que essa mudança de cor é medida por espectrometria na região do ultravioleta-visível (UV-VIS) mais específico em 517nm.

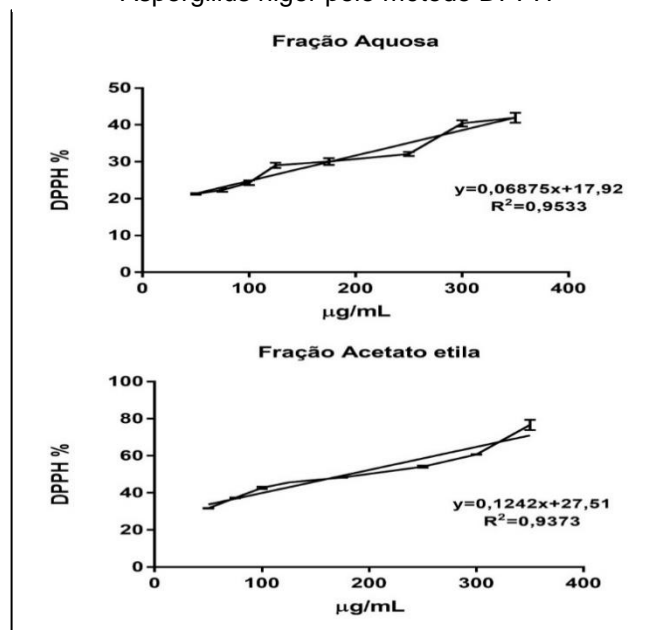
Através das absorbâncias obtidas traçaram-se gráficos das atividades antioxidantes em diferentes concentrações (10 a 350 µg.mL<sup>-1</sup>) dos frações (aquosa e acetato).

Os resultados da atividade antioxidante da fração aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger*, determinado pelo teste DPPH, podem ser observados na Figura 6

na qual estão apresentados os valores em porcentagem de atividade que foram obtidos a partir dos resultados das absorbâncias.

Os resultados demonstram que o percentual antioxidante aumenta proporcionalmente a concentração das frações, atingindo o valor de 41,93% de atividade antioxidante para a concentração de 350  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para a fração aquosa, enquanto que a fração acetato de etila 76,62% de atividade antioxidante para a concentração de 350  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Comparando os valores de atividade das amostras entre si foi possível verificar que a fração acetato teve uma maior atividade antioxidante.

Figura 6 - Curva da porcentagem de atividade antioxidante da fração aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger* pelo método DPPH



Fonte: 1 Autor

Podem ser conferidos na Tabela 2, o valor de  $\text{CE}_{50}$  de da fração aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger*, que é a concentração necessária para atingir 50% de atividade antioxidante

Tabela 2 - Atividade sequestradora do radical livre DPPH e índice da atividade antioxidante do da fração aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger*

Amostras	DPPH ( $\text{CE}_{50}$ )	IA <sup>1</sup>
Fração Aquosa	466,22	0,75
Fração Acetato de Etila	181,08	1,93

IA = índice de atividade antioxidante

Fonte: Autor

Verificou-se que a fração acetato de etila apresentou o valor de CE50 igual a 181,08  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , maior que a fração aquosa. O mesmo resultado pode ser observado ao analisar o índice de atividade antioxidante, no qual, para a fração acetato, demonstrou-se forte atividade, enquanto para fração aquosa, moderada atividade.

#### **5.4.2 Atividade seqüestradora do radical ABTS**

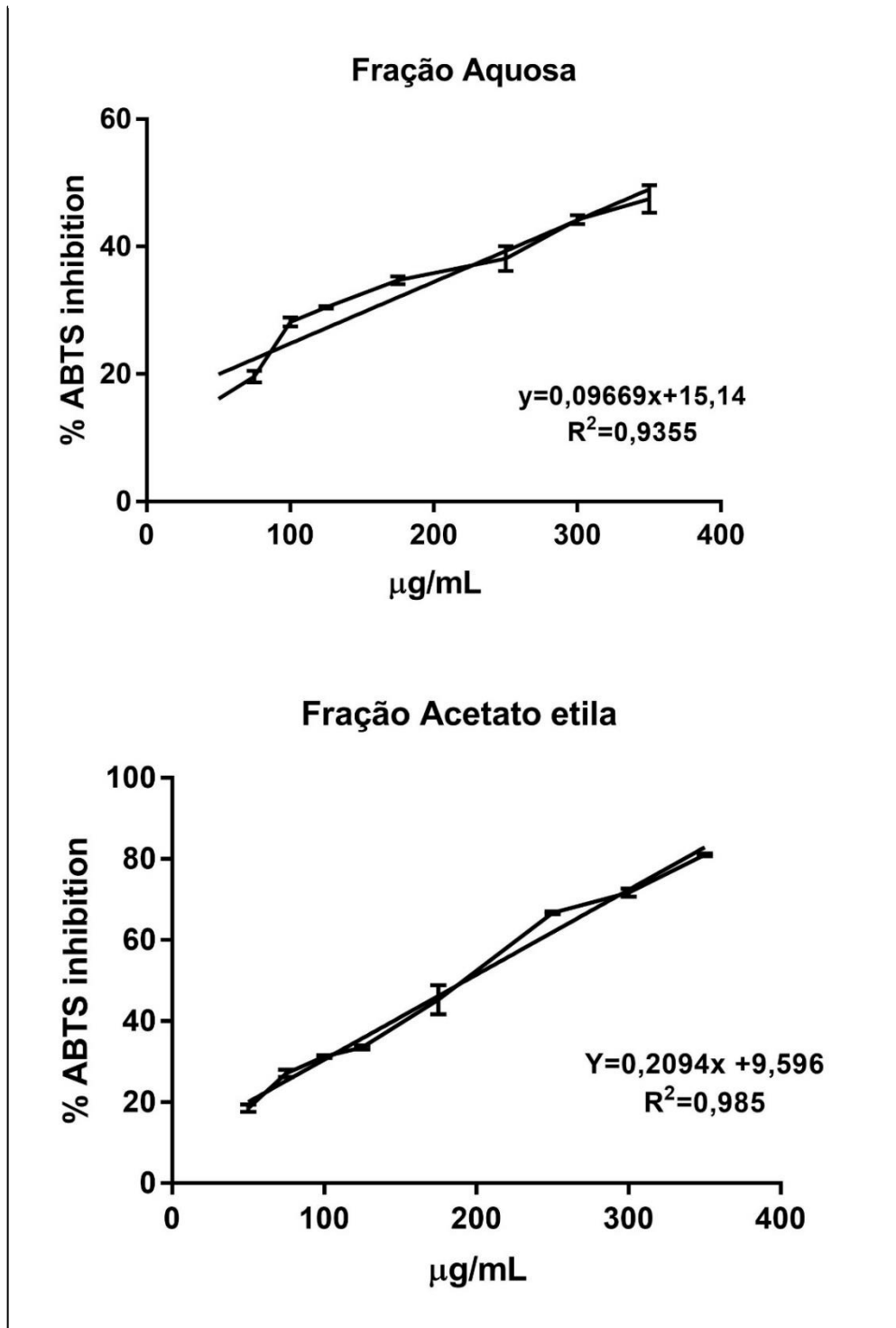
A capacidade antioxidante da fração aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger* foi determinada pelo método ABTS, que se fundamenta na redução do radical ABTS pelas substâncias antioxidantes.

A atividade antioxidante da fração aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger* concentrações (10 a 350  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) pode ser observada na Figura 7, através da curva da porcentagem de atividade antioxidante em função das concentrações.

De acordo com a Figura 2 a fração aquosa apresentou atividade antioxidante, com percentual máximo de seqüestro do radical ABTS de 47,46% na concentração de 350  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , enquanto a fração acetato obteve percentual máximo de 81,00% na concentração de 350  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Logo, fica evidente que, à medida que a concentração aumenta, proporcionalmente há um aumento da atividade antioxidante.



Figura 7 - Curvas das porcentagens de atividade antioxidante da fração aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger* pelo método ABTS



Fonte: Autor

Pode-se observar, ainda, através da Figura 7 com a equação da reta obtida, foi possível calcular o CE50 da fração aquosa e da fração acetato de etila de *Aspergillus niger*, mostrado na tabela 2 está expressa em CE50 que avalia a concentração das frações necessária para sequestrar 50% dos radicais livres.

Tabela 3 - Atividade sequestradora do radical livre ABTS e índice da atividade antioxidante da fração aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger*

<b>Amostras</b>	<b>ABTS (CE<sub>50</sub>)</b>	<b>IA</b>
Fração Aquosa	360,50	0,97
Fração Acetato de Etila	192,95	1,81

IA: índice de atividade antioxidante

Fonte: Autor

A fração aquosa apresentou o valor de CE<sub>50</sub> igual a 360,50 µg.mL<sup>-1</sup>, enquanto a Fração Acetato de Etila apresentou um valor de EC<sub>50</sub> igual a 192,95 µg.mL<sup>-1</sup>, como pode ser observado na tabela 3.

De acordo índice da atividade, pode-se verificar, na tabela 3, que a fração acetato etila apresenta atividade antioxidante forte e a fração aquosa demonstrou moderada atividade.

#### 5.4.3 Comparação entre a atividade sequestradora do radical DPPH e ABTS

Comparando os valores do percentual de atividade dos dois métodos usados (Tabela 4), foi possível verificar que, para as concentrações testadas (10 a 350 µg.mL<sup>-1</sup>), a fração acetato obteve uma maior atividade.

Tabela 4 - Determinação do percentual da atividade antioxidante da fração aquosa e acetato de etila de *Aspergillus niger* pelos métodos DPPH e ABTS

<b>Amostras</b>	<b>DPPH (% inibição)</b>	<b>Concentração (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>ABTS (% inibição)</b>	<b>Concentração (µg.mL<sup>-1</sup>)</b>
Fração Aquosa	41,93	350	47,46	350
Fração Acetato	76,62	350	81,00	350

Fonte: Autor

Os resultados, de acordo com tabela 4, sugerem que a fração acetato foi classificada como forte, por ter valores acima de 70% nos dois métodos usados, enquanto a fração aquosa apresentou fraco percentual de sequestro nos dois métodos, com valor inferior a 50%.

## 6 DISCUSSÃO

O Fungo endofítico coletado da folha de *Euterpe oleracea* Mart. produziu metabólitos secundários que foram testados em bactérias pelo método de difusão em disco, ABTS e DPPH, métodos comumente utilizados em testes antimicrobianos. Esses metabólitos secundários também foram testados em células de câncer cervical. Os resultados tanto em bactérias quanto em células de câncer cervical foram positivos.

Gurgel (2020) avaliou 120 fungos endofíticos pelo método de diluição em placa, 28 produziram metabólitos que inibiram o crescimento de pelo menos um dos microrganismos testados. Apenas um fungo produziu substâncias com atividade antibacteriana frente à cepa *S. aureus*. No estudo realizado por Gurgel (2020), o fungo que demonstrou atividade no teste com a cepa de *S. aureus* foi caracterizado de acordo com taxonomia clássica como *Guignardia sp.* (MATIAS, 2018).

No presente trabalho, o metabólito secundário que apresentou atividade frente às cepas das bactérias não foi identificado pela caracterização taxonômica. Sabe-se que o metabólito do presente trabalho foi produzido pelo fungo endofítico *Aspergillus niger*.

Pesquisa realizada por Cairns et al (2021) relata que *Aspergillus niger* secreta ácidos orgânicos, proteínas, enzimas e metabólitos secundários, possuindo um potencial biotecnológico para ser usado em diversas áreas. Diante desta perspectiva, foi realizada análise da atividade antioxidante e seu potencial antimicrobiano de frações de *Aspergillus niger* isolado dos frutos da *Euterpe oleraceae*.

A pesquisa com microrganismos endofíticos também vem crescendo entre a comunidade científica. Diversas pesquisas apontam o potencial destes fungos em sintetizar uma ampla gama de moléculas bioativas com potencial para aplicações na agricultura, medicina e biotecnologia (REIS *et. al.*, 2022).

Nesta pesquisa, pode-se demonstrar atividades biológicas como a antimicrobiana, na qual foi adotada, para avaliação dos resultados encontrados, critérios utilizados para o teste de difusão em disco, segundo Cimanga *et al* (2002), que adota para classificação da atividade antimicrobiana as zonas de inibição:  $zdi \geq 15$  forte inibição;  $10 \leq zdi < 15$  inibição moderada e  $zdi < 10$  inativo.

Observou-se que os halos de inibição obtidos para as frações em estudo demonstram ser eficientes na concentração de 1.000 µg.mL<sup>-1</sup>, porém fica evidente que a técnica usada pode ter interferido e pode-se ter halos de inibição superiores aos encontrados, visto que a técnica de difusão em disco não oferece condições de igualdade para se comparar substâncias com solubilidade e difusibilidade distintas. Segundo Ostrosky et. al. (2008), diversos fatores influenciam nesta técnica, tais como presença de enzimas bacterianas, composição do meio, difusão da substância no meio, densidade do inóculo e período de incubação.

As frações em estudo apresentaram maior potencial inibitório contra *S. aureus*, bactéria Gram positiva, o que pode estar associado à maior complexidade da parede celular das bactérias Gram negativas.

Verificamos que as frações podem variar de acordo com a concentração e o tipo de bactéria a ser estudada. Variações nas estruturas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem causar danos diferenciados quando a bactéria é submetida a compostos antimicrobianos. Silva et. al. (2010) relatam que antimicrobianos exercem efeitos na membrana através de numerosos mecanismos, como ruptura, complexação de substrato, inativação enzimática e quelação de metais.

Os antimicrobianos envolvidos na atividade biológica encontrada nas frações de *Aspergillus niger* estão associados à produção de metabólitos secundários, como foi descrito por Boecker et al (2018). Pesquisa realizada por Wanka et al (2016) relata que os metabólitos secundários de *A. niger* são produzidos durante o seu crescimento.

Outra a atividade antioxidante foi pesquisada por meio de duas técnicas distintas, DPPH e ABTS. Verificou-se que a fração acetato apresentou maior percentual antioxidante nas duas técnicas em estudo. Pela técnica DPPH, foi de 76,62%; pela ABTS, 81,00%. Tais resultados, segundo Melo et al (2008), são considerados como fortes, intermediários ou fracos quando o percentual de sequestro do radical atingir, respectivamente, valores acima de 70%, entre 60 e 70% e abaixo de 50%.

Determinou-se, ainda, valores da concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) pelos dois métodos usados (Tabela 1 e 2). Foi possível verificar que a menor concentração observada foi para a fração acetato de etila (181,08µg/mL), pelo método DPPH e 192,95 µg/mL pelo método ABTS.

Segundo Campos et al. (2003), são considerados ativos quando apresentarem  $CE_{50\%} < 500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Logo, fração de acetato de etila demonstrou atividade antioxidante. O mesmo foi verificado para a fração aquosa, pois apresentou concentração efetiva menor que  $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

O mecanismo de reação usado para avaliação da atividade antioxidante pelo radical ABTS é o mesmo do teste com radical DPPH. Ambos são dependentes da conformação estrutural do antioxidante, ou seja, capacidade de redução do radical por doação de hidrogênio radicalar. Assim, o teste com ABTS pode ser considerado uma confirmação dos resultados obtidos para a atividade antioxidante via DPPH.

A atividade antioxidante está ligada principalmente à presença de ácidos orgânicos. Upton et al. (2017) apontam que *Aspergillus niger* é capaz de secretar ácidos orgânicos que podem ser responsáveis pela atividade verificada nos testes realizados. Cairns et al (2022) relata, ainda, que, além de ácidos orgânicos, o *A. niger* é capaz de secretar proteínas e metabólitos secundários que podem ser aplicados na indústria farmacêutica, tendo diversos fins biotecnológicos.

## 6.1 Análise Estatística

A partir dos resultados das médias seguidas de  $\pm$  desvio padrão à análise de variância (ANOVA) de um fator e quando esta análise apresentou variação significativa ( $p < 0,05$ ). Os testes estatísticos foram realizados utilizando-se o software GraphPad Prism (versão 7.0).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O metabólito secundário de fungo endofítico de *Aspergillus niger* isolado da folha de *Euterpe oleracea* Mart. coletada no município de Axixá, obteve o resultado positivo tanto em linhagens de células de câncer cervical SIHA HPV16 quanto em bactérias.

## Referências bibliográficas

AFONSO, S.O.M. **Aspergillus niger: sua utilização na indústria farmacêutica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. Almada. 2015.

ALVES, L.V.J. **Investigação dos Metabólitos Secundários de Fungos Endofíticos isolados de *Humirianthera ampla***. Programa Institucional de Bolsa de iniciação Científica. Universidade Federal do Sergipe. Aracaju. 2017.

BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, 2012, Vol. 17, No. 8.

BERTALAN, M.; ALBANO, R.; PÁDUA, V. de; ROUWS L.; ROJAS, C.; HEMERLY, A.; TEIXEIRA, K.; SCHWAB, S.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, A.; FRANÇA, L.; MAGALHÃES, V.; ALQUÉRES, S.; CARDOSO, A.; ALMEIDA, W.; LOUREIRO, M.; NOGUEIRA, E.; CIDADE, D.; OLIVEIRA, D.; SIMÃO, T. Sequência completa do genoma do endófito fixador de nitrogênio da cana-de-açúcar *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. **BMC Genomics**, 10(1), 450, 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-450>

BOECKER S.; GRÄTZ S.; KERWAT D.; ADAM L.; SCHIRMER D.; RICHTER L.; SCHÜTZE T.; PETRAS D.; SÜSSMUTH R.D.; MEYER V. *Aspergillus niger* is a superior expression host for the production of bioactive fungal cyclodepsipeptides. **Fungal Biol Biotechnol**. 2018, PMID: 29507740; PMCID: PMC5833056.

BRUM, AAS; ARRUDA, LF de; BISMARA, MA. *Regitano-d'Arce; Métodos De Extração e Qualidade da Fração Lipídica de Matérias-Primas de Origem Vegetal e Animal*; **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 4, 849-854, 2009.

CAIRNS T.C., BARTHEL L., MEYER V. Something old, something new: challenges and developments in *Aspergillus niger* biotechnology. **Essays Biochem**. 2021, 65(2):213-224. doi: 10.1042/EBC20200139. PMID: 33955461; PMCID: PMC8314004.

CALDERANI; F. A.; ORLANDELLI, R. C.; PAMPHILE, J. A. Compostos bioativos com propriedades antitumorais produzidos por fungos endofíticos. **Revisa Unigá Review**. Vol. 25, n.2, pp 79-86. Jan –Mar 2016.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais, **Rev. Virtual Quim.**, 2013, 5 (3), 421-437.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; BRUYNE, T. de; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**. 2002, 79(2): 213-220.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3**. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

FELIX, Thaís. **FUNGOS ENDOFÍTICOS EM ESPÉCIES AGRÍCOLAS DE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA**. Belo Horizonte, 2019.

FILHO MELHORANÇA, A. L.; PEREIRA M. R. R. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS EXTRAÍDOS DE AÇAÍ E DE PUPUNHA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Pseudomonas aeruginosa* E *Staphylococcus aureus*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 4, p. 598-603, July/Aug. 2012.

FREITAS, B.; BENTO, F.S.; SANTOS, F. Q.; FIGUEIREDO, M.; AMÉRICA, P.; MARÇAL, P. Características Físico-químicas, Bromatológicas, Microbiológicas e Microscópicas de Polpas de Açaí (*Euterpe oleraceae*) Congeladas do Tipo B. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences – JAPHAC**, 2015; 2(2): 2-13.

GURGEL, Raiana Silveira. **Atividade antimicrobiana, antioxidante e citotóxica de metabólitos de fungos endofíticos isolados de espécies amazônicas**. Dissertação de mestrado. PPGSS – Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020. Disponível em: <https://pos.uea.edu.br/data/area/titulado/download/107-8.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2023.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, Londres, v. 22, p. 475-477, 1973. de Risco, n. 16, p. 66-71, 2010.

HENDRY E; CONWAY B; WORTHINGTON T; Antimicrobial Efficacy of a Novel Eucalyptus Oil, Chlorhexidine Digluconate and Isopropyl Alcohol Biocide Formulation 1 , *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 14016-14025; doi:10.3390/ijms131114016  
HORNSTRA, G. Lipids in functional foods in relation to cardiovascular disease. **Fett/Lipid**, Berlin, v. 101, n. 12, p. 456466, 1999.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa**, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/por-neoplasia-taxas-ajustadas/todas-exceto-pele-nao-melanoma>. Acesso em: 03 jan. 2023.

IVANOVA-PETROPULOS, V. Characterisation of traditional Macedonian edible oils by their fatty acid composition and their volatile compounds. **Food Research International**, [s.l.], v. 77, p.506-514, nov. 2015.

JENSEN, J.; MUÑOZ, P.; GUINEA, J.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS, M.; PELÁEZ, T.; BOUZA, E. Mixed fungemia: incidence, risk factors, and mortality in a general hospital. **Clin Infect Dis.** 2007;44(12):e109-14.

KITAHARA, T.; AOYAMA, Y; HIRAKATA Y, KAMIHIRA S.KOHNO S; ICHIKAWA N; NAKASHIMA M; SASAKI H; HIGUCHI S. In vitro activity of lauric acid or myristylamine in combination with six antimicrobial agents against methicillin-

resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2006.

LANCINI, G.; PARENTI, F.; GALO, G. A. **Antibióticos: uma abordagem multidisciplinar**. Nova York: Plenário, 1995. 278 p.

MAIA, E. L.; RODRIGUES-AMAYA, D. Avaliação de um método simples e econômico para metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, 53(1): 27-35, 1993.

MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, 2017.

MARTINI, W. S.; PORTO, S. L.; OLIVEIRA DE, A. L. Comparative Study of the Lipid Profiles of Oils from Kernels of Peanut, Babassu, Coconut, Castor and Grape by GC-FID and Raman Spectroscopy. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 29, No. 2, 390-397, 2018.

MATIAS, R. R. **Bioprospecção de fungos endofíticos de Aniba canelilla e avaliação do seu potencial na degradação do polietileno tereftalato**. Projeto de Doutorado apresentado ao Programa de pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE (em andamento), Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018.

MATOS, I. O.; DOURADO, Douglas; PEREIRA, N. P. PROSPECTION OF FIXED OILS FROM BRAZILIAN AND AFRICAN FLORA IN SUSTAINABLE COSMETOLOGY. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.16, n.2, Abr. - Jun./2015 - ISSN 1518-8361

MELLO, M. A. R.; KALKO, E. K. V.; SILVA, W. R. Diet and abundance of the bat *Sturnira lilium* (Chiroptera) in a Brazilian montane Atlantic Forest. **Journal of Mammalogy**. 2008, 89(2):485-492.

MOREIRA, C., (2014) Classificação de Whittaker, *Rev. Ciência Elem.*, V2(4):250

NASCIMENTO DO, W. M. O. Embrapa Amazônia Oriental. **Informativo técnico da Rede de Sementes da Amazônia**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 02 jan. 2023.

NASCIMENTO, R. J. S. S. do; ANTONIASSI, C. R.; FREITAS, S. P. Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 30, n. 2, p. 498-502, 2008.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2008, 18( 2), 301-307.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med**. 1999 May;26(9-10):1231-7.



REIS J.B.A. dos; LORENZI A.S.; VALE H.M.M. do. Methods used for the study of endophytic fungi: a review on methodologies and challenges, and associated tips. **Arch Microbiol.** 2022 ;204(11):675. doi: 10.1007/s00203-022-03283-0. PMID: 36264513; PMCID: PMC9584250.

RONUALDO, G. R.; FRAGOSO, M. F.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO; M. C. P. de A.; FERNANDES, A.A.H.; BARBISAN, L.F. Protective effects of spray-dried açai (*Euterpe oleracea* Mart) fruit pulp against initiation step of colon carcinogenesis. **Food Research International**, 2015, 432–440.

SANTOS, K.S.; DE FARIA SILVA, L.A. Fungos endofíticos isolados do umbuzeiro (*Spondias tuberosa* rue camara): potenciais fontes alternativas para a produção de enzimas e pigmentos naturais. **Brazilian Journal of Development** , 6(12), 103761-103774, 2020.

SANTOS, Vanessa Sardinha dos. "Reino Fungi"; Brasil Escola. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/fungi.htm>. Acesso em 31 de janeiro de 2023.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M.A.; GLICK, B.R. (2016). Endófitos bacterianos que promovem o crescimento vegetal. **Pesquisa microbiológica**, 183, 92-99, 2016.

SILVA, D. F.; DA SILVA, M. A. C. N. da.; RODRIGUES, G. M.; VIDAL, F. C. B.; BARBOSA, M.C. L. do.; BRITO, L. M. O.; BEZERRA, F. B. de.; MUNIZ FILHO, W. E.; BORGES, K. R. S.; ROSA, I. G.; CARVALHO, J. E. de.; NASCIMENTO, M. D. S. B. do. Açai (*Euterpe oleracea* Mart) Consumption and Prevention of Chronic Diseases: Is There an Association? A Preliminary Study. **The Scientific World Journal.** 2020, Article ID 5782485, 7 pages <https://doi.org/10.1155/2020/5782485>.

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

SILVA FILHO, A A.A. da; SOUSA, J.P.B. de; SOARES, S.; FURTADO, N.A.J.C.; ANDRADE E SILVA, M.L.; CUNHA W.R.; GREGORIO, L.E.; , NANAYAKKARA N.P.D.; BASTOS, J.K. Antimicrobial Activity of the Extract and Isolated Compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Zeitschrift für Natur forschung C**, Volume 63, Issue 1-2, Pages 40–46, ISSN (Online) 1865-7125, ISSN (Print) 0939-5075, 2008.

UPTON D.J., MCQUEEN-MASON S.J., WOOD A.J. An accurate description of *Aspergillus niger* organic acid batch fermentation through dynamic metabolic modelling. **Biotechnol Biofuels**, 2017. doi: 10.1186/s13068-017-0950-6. PMID: 29151887; PMCID: PMC5679502.

VILLELA, M.M.; PIMENTA, D.N.; LAMOUNIER, P.A.; DIAS, J.C.P. Avaliação de conhecimentos e práticas que adultos e crianças têm acerca da doença de Chagas e seus vetores em região endêmica de Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, 25: 1701-1710, 2009.

WAGNER, B.L.; LEWIS, LESLIE C. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(8): 3468-3473, 2000.

WANKA, F.; ARENTSHORST, M; CAIRNS, T.C.; JØRGENSEN, T.; RAM, A.F.; MEYER V. Highly active promoters and native secretion signals for protein production during extremely low growth rates in *Aspergillus niger*. **Microb Cell Fact.** 2016;15(1):145. doi: 10.1186/s12934-016-0543-2. PMID: 27544686; PMCID: PMC4992228.