

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**HILLARY ANANDA GONÇALVES ANICETO**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO, TOXICIDADE E ESTUDOS QUÍMICOS DE  
EXTRATOS OBTIDOS DA OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DO ENDÓFITO  
*PREUSSIA C. F. AFRICANA***

**ALFENAS/MG**

**2025**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**HILLARY ANANDA GONÇALVES ANICETO**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO, TOXICIDADE E ESTUDOS QUÍMICOS DE  
EXTRATOS OBTIDOS DA OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DO ENDÓFITO  
*PREUSSIA C. F. AFRICANA***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jaine H. Hortolan Luiz

**ALFENAS/MG**

**2025**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Aniceto, Hillary Ananda Gonçalves.

Potencial antifúngico, toxicidade e estudos químicos de extratos obtidos da otimização do cultivo do endófito *Preussia c. f. africana* / Hillary Ananda Gonçalves Aniceto. - Alfenas, MG, 2025.

84 f. : il. -

Orientador(a): Jaine Honorata Hortolan Luiz.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Fermentação. 2. *Preussia africana*. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Atividade antioxidante. 5. Otimização de processos. I. Luiz, Jaine Honorata Hortolan, orient. II. Título.

**HILLARY ANANDA GONÇALVES ANICETO**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO, TOXICIDADE E ESTUDOS QUÍMICOS DE  
EXTRATOS OBTIDOS DA OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DO ENDÓFITO  
PREUSSIA C.F. AFRICANA**

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: 31 de janeiro de 2025.

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz  
Presidente da Banca Examinadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Ana Claudia Granato Malpass  
Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Profa. Dra. Graziela Domingues de Almeida Lima  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Jaine Honorata Hortolan Luiz, Professor do Magistério Superior**, em 11/02/2025, às 16:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifalmg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifalmg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1432124** e o código CRC **0FB8BE04**.

---

## AGRADECIMENTOS

A Deus toda honra e toda gloria, a minha mãezinha do céu e aos meus intercessores São José e Santa Therese.

Aos meus pais, sem eles eu não estaria aqui e é de suma importância saber que tenho eles ao meu lado.

A minha madrinha Sônia pelos conselhos e forças dadas durante este período.

A todos meus familiares e amigos que acreditam e torcem por mim.

Gratidão à minha orientadora Profa. Dra. Jaine pela paciência, disponibilidade, amizade, carinho e por transmitir seus ensinamentos. Ela tem sido fundamental no meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Dra. Daniela Hirata pela sua contribuição na realização deste trabalho.

As professoras Dra. Amanda Latércia da microbiologia e a Dra. Patrícia Lunardelli que foram essenciais na realização deste trabalho e por todo ensinamento compartilhado comigo.

Ao professor Dr. Masaharu Ikegaki e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Grant/Award Number: APQ-02122-22 e aos meus amigos Sarah, Gabriel e Rafaela pela parceria nos experimentos.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Biotecnologia por transmitirem seus ensinamentos e contribuir para nosso aprimoramento.

Aos técnicos Gustavo e Barbara do laboratório de Bioprocessos por nos auxiliarem e atender nossas demandas.

Aos meus parceiros de laboratório Lucas e Mateo por sua disponibilidade e partilha dos seus conhecimentos.

Aos meus amigos Mikaela, Eric, Laura, Ingrid, Maria Carolina, Gabriel, Juninho, Glayner, Viviane e Gustavo por todo apoio e por me fazerem sorrir quando mais precisei.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Financiamento 001.

Por último quero agradecer à UNIFAL-MG, aos professores e ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e a todos os órgãos de fomento, principalmente à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Fungos endofíticos são microrganismos capazes de biossintetizar substâncias com diferentes estruturas químicas, as quais podem apresentar diferentes atividades biológicas, sendo úteis no combate a diversas doenças. As doenças infecciosas estão entre as principais causas de mortalidade e incapacidade nos seres humanos em todo o mundo, e, dentre elas, aquelas causadas por fungos patogênicos estão aumentando, principalmente, entre populações imunocomprometidas. O diagnóstico e o tratamento dessas doenças têm desafiado a ciência, devido ao desenvolvimento de resistência desses patógenos aos antifúngicos utilizados em tratamentos. Nesse sentido, os estudos com fungos endofíticos se tornam de fundamental importância. O fungo do gênero *Preussia*, apesar de pouco estudado, até o momento, mostrou-se promissor em biossintetizar metabólitos secundários bioativos e com atividade antifúngica. O objetivo principal deste trabalho foi realizar um planejamento de experimentos (DOE) para melhorar a produção de metabólitos pelo fungo, variando-se as fontes de carbono e o número de inóculos, para que o microrganismo produzisse substâncias bioativas em quantidades adequadas para avaliar seu potencial antimicrobiano e para futuros estudos químicos. Foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^3$ , com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais, totalizando 17 ensaios. Após o cultivo do fungo foram obtidos extratos orgânicos clorofórmio e acetato de etila que foram avaliados quanto sua atividade antimicrobiana contra diferentes patógenos humanos, dentre eles *Staphylococcus aureus* e leveduras do gênero *Candida*. Os extratos foram avaliados quanto à presença de fenólicos totais e de flavonoides, bem como sua capacidade antioxidante frente ao sequestro de radicais DPPH. Validações de quatro experimentos foram realizadas, referentes às atividades antimicrobianas e às massas de extratos clorofórmio. Alguns extratos apresentaram atividade moderada contra *S. aureus*, com destaque para o ensaio 7 do extrato acetato de etila. Realizou-se um *screening* pelo método de difusão em ágar para avaliação de atividade contra as espécies de *Candida* para os 34 extratos, sendo selecionados os mais promissores por CIM. Os extratos apresentaram maior potencial contra *C. albicans* e *C. glabrata*, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) consideráveis, sendo a atividade contra *C. tropicalis* menos pronunciada. Os ensaios 5 e 7 em clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) apresentaram atividade contra *C. glabrata*, com CIM entre 50 – 100  $\mu\text{g/mL}$ , o ensaio 10 do  $\text{CHCl}_3$  destacou-se por apresentar a atividade antifúngica mais promissora entre todos os extratos de  $\text{CHCl}_3$ , com CIM entre 25 - 50  $\mu\text{g/mL}$  para *C. albicans* e *C. glabrata* e CIM e CMM entre 100 – 200  $\mu\text{g/mL}$  contra *C. tropicalis*. Os ensaios (2, 4, 5, 7, e 10) em acetato de etila mostraram boa atividade contra *C. glabrata*, com CIMs entre 50 - 100  $\mu\text{g/mL}$ . Os extratos obtidos apresentaram elevado potencial antioxidante, evidenciado pela alta capacidade de sequestro de radicais DPPH, a qual pode ser atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos, encontrados em maior quantidade nos extratos, e em menor proporção, flavonoides. Os extratos que apresentaram melhores atividades antifúngicas foram avaliados quanto sua toxicidade contra larvas de *Galleria mellonella* utilizando-se uma concentração de 800  $\mu\text{g/mL}$ , resultando em alta taxa de sobrevivências das larvas, o que sugere que os extratos avaliados podem ser utilizados em estudos futuros para purificação e identificação dos compostos, possivelmente, para obtenção ou desenvolvimento de novos medicamentos com atividade antifúngica e antibacteriana. Além disso, o planejamento de experimentos pode ser utilizado para maximizar a produção desses compostos, identificando as melhores condições de cultivo.

Palavras-chave: Fermentação; *Preussia africana*; Atividade antimicrobiana; Atividade antioxidante; Otimização de processos.

## ABSTRACT

Endophytic fungi are microorganisms capable of biosynthesizing substances with different chemical structures, which may have different biological activities and are useful in combating various diseases. Infectious diseases are among the main causes of mortality and disability in humans worldwide, and among them, those caused by pathogenic fungi are increasing, especially among immunocompromised populations. The diagnosis and treatment of these diseases have been challenging science, due to the development of resistance of these pathogens to the antifungals used in treatments. In this sense, studies with endophytic fungi have become of fundamental importance. The fungus of the genus *Preussia*, although little studied to date, has shown promise in biosynthesizing bioactive secondary metabolites with antifungal activity. The main objective of this study was to perform a design of experiments (DOE) to improve the production of metabolites by the fungus, varying the carbon sources and the number of inocula, so that the microorganism would produce bioactive substances in adequate quantities to evaluate its antimicrobial potential and for future chemical studies. A complete factorial design of  $2^3$  was performed, with 3 central points and 6 axial points, totaling 17 assays. After cultivation of the fungus, organic extracts of chloroform and ethyl acetate were obtained and evaluated for their antimicrobial activity against different human pathogens, including *Staphylococcus aureus* and yeasts of the genus *Candida*. The extracts were evaluated for the presence of total phenolics and flavonoids, as well as their antioxidant capacity against DPPH radical scavenging. Validations of four experiments were performed, referring to the antimicrobial activities and the masses of chloroform extracts. Some extracts showed moderate activity against *S. aureus*, with emphasis on assay 7 of the ethyl acetate extract. Screening was performed using the agar diffusion method to evaluate the activity against *Candida* species for the 34 extracts, and the most promising ones were selected to carry out minimum inhibitory concentrations (MIC) assays. The extracts showed greater potential against *C. albicans* and *C. glabrata*, with considerable MIC, with less pronounced activity against *C. tropicalis*. Assays 5 and 7 in chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) showed activity against *C. glabrata*, with MICs between 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$ ; assay 10 of  $\text{CHCl}_3$  stood out for presenting the most promising antifungal activity among all  $\text{CHCl}_3$  extracts, with MICs between 25 and 50  $\mu\text{g/mL}$  for *C. albicans* and *C. glabrata*, and MICs and MMCs between 100 and 200  $\mu\text{g/mL}$  against *C. tropicalis*. Assays (2, 4, 5, 7, and 10) in ethyl acetate showed good activity against *C. glabrata*, with MICs between 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$ . The extracts obtained showed high antioxidant potential, evidenced by the high DPPH radical scavenging capacity, which can be attributed mainly to the presence of phenolic compounds, found in greater amounts in the extracts, and flavonoids in smaller proportions. The extracts that showed promising antifungal activities were evaluated for their toxicity against *Galleria mellonella* larvae using a concentration of 800  $\mu\text{g/mL}$ , resulting in a high survival rate of the larvae, which suggests that the extracts evaluated can be used in future studies for compounds purification and identification, possibly for obtaining or developing new drugs with antifungal and antibacterial activity. Besides, DOE can be used to maximize the production of these compounds, identifying the best cultivation conditions.

Keywords: Fermentation; *Preussia Africana*; Antimicrobial activity; Antioxidant activity; Process optimization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química da anfotericina B.....	16
Figura 2 -	Estrutura química dos antifúngicos da classe dos azóis.....	17
Figura 3 -	Estrutura química das três equinocandinas utilizadas na prática clínica: micafungina caspofungina e anidulafungina.....	18
Figura 4 -	Estruturas química dos metabólitos isolados do gênero <i>Preussia</i> .....	23
Figura 5 -	Fermentação de <i>Preussia africana</i> em erlenmeyers em modo agitado.....	29
Figura 6 -	Fungo <i>Preussia africana</i> reativado em placas de Petri em meio ABD (a) e MEA (b).....	36
Figura 7 -	Efeitos padronizados em função das variáveis, considerando alfa = 5 % - Diagrama de Pareto.....	40
Figura 8 -	Resultados experimentais (eixo x) e preditos (eixo y) em relação às massas dos extratos clorofórmio.....	41
Figura 9 -	Superfícies de resposta e curva de contorno para as massas dos extratos clorofórmio.....	42
Figura 10 -	Gráfico de barras apresentando as concentrações de fenólicos totais para todos os ensaios referentes aos extratos de acetato de etila (em azul) e clorofórmio (em laranja) de <i>Preussia africana</i> .....	57
Figura 11 -	Gráfico de barras com os teores de flavonoides totais dos extratos AcOEt (em azul) e CHCl <sub>3</sub> (em laranja) de <i>Preussia africana</i> .....	58
Figura 12 -	Gráfico de barras comparando os valores de DPPH para extratos AcOEt (em azul) e CHCl <sub>3</sub> (em laranja) de <i>Preussia africana</i> .....	59
Figura 13 -	A) Gráfico de barras apresentando as concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e DPPH para os ensaios de validação referentes aos extratos de AcOEt obtidos de <i>Preussia africana</i> . B: Gráfico de barras apresentando as concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e DPPH para os ensaios de validação referentes aos extratos de CHCl <sub>3</sub> obtidos de <i>Preussia africana</i> .....	61

Figura 14 -	Extratos em clorofórmio (ensaios 1-17) revelados sob a luz em 254 nm (Eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:1, v:v)).....	64
Figura 15 -	Extratos em clorofórmio (ensaios 1-17) revelados sob a luz em 365 nm (Eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:1, v:v)).....	65
Figura 16 -	Extratos em acetato de etila (ensaios 1-17) revelados sob a luz UV 354 nm (Eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:1, v:v)).....	65
Figura 17 -	Extratos em acetato de etila (ensaios 1-17) revelados sob a luz UV 365 nm (Eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:1, v:v)).....	66
Figura 18 -	Teste de toxicidade em <i>Galleria mellonella</i> utilizando extratos de <i>Preussia africana</i> .....	67
Figura 19 -	Curva de calibração com trolox para determinação do sequestro de radicais DPPH.....	78
Figura 20 -	Curva de calibração utilizando ácido gálico para determinação de fenólicos totais.....	78
Figura 21 -	Curva de calibração utilizando quercetina como padrão para determinação de flavonoides totais.....	79
Figura 22 -	Extratos em clorofórmio (ensaios 1-17) revelados com cloreto férrico (Eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:1, v:v)).....	80
Figura 23 -	Extratos em clorofórmio (ensaios 1-17) revelados com ácido fosfomólfbdico (Eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:1, v:v)).....	80
Figura 24 -	Extratos em clorofórmio (ensaios 1-17) revelados com anisaldeído (Eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:1, v:v)).....	80
Figura 25 -	Extratos em acetato de etila (ensaios 1-17) revelados com ácido fosfomoblidico (Eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:1, v:v)).....	81
Figura 26 -	Extratos em acetato de etila (ensaios 1-17) revelados com ácido fosfomoblidico (Eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:1, v:v)).....	81
Figura 27 -	Extratos em acetato de etila (ensaios 1-17) revelados com anisaldeído (Eluente: CHCl <sub>3</sub> :MeOH (9:1, v:v)).....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atividade biológica de alguns metabólitos isolados do gênero <i>Preussia</i> .....	22
Tabela 2 -	Variáveis para o planejamento completo 2 <sup>3</sup> , níveis codificados e reais.....	30
Tabela 3 -	Matriz para o planejamento completo 2 <sup>3</sup> e respostas para cada ensaio.....	38
Tabela 4 -	Coeficientes de regressão obtidos para o DCCR para os extratos de clorofórmio, usando um nível de significância de 5%.....	39
Tabela 5 -	ANOVA para o DCCR, considerando alfa = 5%.....	40
Tabela 6 -	Atividade antimicrobiana dos extratos clorofórmio e acetato de etila do cultivo de <i>Preussia africana</i> contra o patógeno <i>S. Aureus</i> .....	44
Tabela 7 -	Medida dos halos de inibição dos extratos do <i>P. africana</i> contra espécies de <i>Candida</i> .....	46
Tabela 8 -	Atividade antimicrobiana dos extratos em clorofórmio do <i>Preussia africana</i> contra as <i>Candidas</i> após a triagem em difusão em ágar.....	47
Tabela 9 -	Atividade antimicrobiana dos extratos em acetato de etila do <i>Preussia africana</i> contra as <i>Candidas</i> após a triagem em difusão em ágar.....	48
Tabela 10 -	Ensaio de validação, variáveis usadas no meio de cultivo e massas dos extratos (mg).....	49
Tabela 11 -	Atividade antimicrobiana (CIM e CMM) dos extratos em clorofórmio e acetato de etila dos 4 pontos de validação contra os patógenos <i>S. aureus</i> e <i>E. Coli</i> .....	50
Tabela 12 -	Atividade antimicrobiana (CIM e CMM) dos extratos em clorofórmio e acetato de etila do <i>Preussia africana</i> contra as <i>Candidas</i> para os ensaios de validação.....	52
Tabela 13 -	Concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e DPPH para os extratos clorofórmio e acetato de etila após os cultivos de <i>Preussia africana</i> em diferentes meios.....	55
Tabela 14 -	Teor de fenólicos, flavonoides e DPPH para os pontos de validação.....	79

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1</b>	<b>Objetivos</b> .....	12
1.1.1	Objetivo geral.....	12
1.1.2	Objetivos específicos.....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Fungos endofíticos</b> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Doenças fúngicas e antifúngicos</b> .....	14
2.2.1	Medicamentos utilizados nos tratamentos de infecções fúngicas.....	15
<b>2.3</b>	<b>Importância dos fungos na área biotecnológica</b> .....	19
<b>2.4</b>	<b>Gênero <i>Preussia</i> e seus metabólitos</b> .....	20
<b>2.5</b>	<b>Otimização de processos</b> .....	25
<b>2.6</b>	<b>Análise por Cromatografia em Camada Delgada</b> .....	25
<b>2.7</b>	<b>Toxicidade em modelo sistêmico <i>Galleria mellonella</i></b> .....	26
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	28
<b>3.1</b>	<b>Obtenção e depósito do fungo endofítico estudado</b> .....	28
<b>3.2</b>	<b>Repique do fungo em meio sólido</b> .....	28
<b>3.3</b>	<b>Cultivo do fungo em meio agitado</b> .....	28
<b>3.4</b>	<b>Planejamento Experimental</b> .....	29
<b>3.5</b>	<b>Filtração e extração com solventes</b> .....	30
<b>3.6</b>	<b>Avaliação de atividade antimicrobiana</b> .....	30
3.6.1	Patógenos utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana.....	30
3.6.2	Triagem dos extratos para avaliação da atividade antifúngica – Teste de difusão em ágar.....	31
3.6.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM).....	31
<b>3.7</b>	<b>Atividade antioxidante e teor de flavonoides e fenólicos totais</b> .....	32
3.7.1	Ensaio de sequestro de radicais DPPH.....	32
3.7.2	Teor de fenólicos totais.....	33
3.7.3	Teor de flavonoides totais.....	34
<b>3.8</b>	<b>Avaliação química dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)</b> .....	34

<b>3.9</b>	<b>Toxicidade e índice de saúde do modelo sistêmico <i>Galleria mellonella</i>.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b>Repique do <i>Preussia africana</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>4.2</b>	<b>Ensaio do planejamento de experimentos e obtenção dos extratos orgânicos de <i>Preussia africana</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>4.3</b>	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4</b>	<b>Ensaio de validação.....</b>	<b>44</b>
<b>4.5</b>	<b>Atividade Antioxidante, teor de fenólicos e flavonoides totais.....</b>	<b>54</b>
4.5.1	Atividade antioxidante frente ao DPPH.....	54
4.5.2	Determinação do teor de fenólicos e flavonoides totais.....	54
4.5.3	Determinação do teor de fenólicos totais, flavonoides totais e DPPH para os pontos de validação.....	60
<b>4.6</b>	<b>Avaliação química dos extratos através da cromatografia em camada delgada.....</b>	<b>64</b>
<b>4.7</b>	<b>Avaliação de toxicidade in vivo no modelo sistêmico <i>Galleria mellonella</i>.....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>68</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Muitos medicamentos, utilizados na medicina atual, foram desenvolvidos a partir de plantas medicinais e de microrganismos, um clássico exemplo é a penicilina, que foi descoberta em 1928, acidentalmente a partir do fungo *Penicillium notatum*. Outro exemplo, foi a detecção do taxol produzido pelo fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, considerado um importante medicamento antitumoral, previamente isolado da planta *Taxus brevifolia* (Nisa *et al.*, 2015), além de muitos outros utilizados como medicamentos para o controle e/ou cura de doenças. A produção de metabólitos secundários realizada por determinados organismos em resposta aos estímulos externos é um importante campo para a descoberta desses novos medicamentos (Newman & Gragg, 2016), para enfrentar o desafio das doenças infecciosas, incluindo as causadas por fungos.

As doenças infecciosas são uma das principais causas de morte em todo o mundo. Estima-se que as infecções bacterianas resistentes aos medicamentos sejam responsáveis diretamente por 1,27 milhões de mortes e por aproximadamente 4,95 milhões de mortes por ano, com maior impacto onde os recursos são limitados. As doenças fúngicas invasivas (DFI) são uma grande ameaça global, aumentado especialmente nos indivíduos imunocomprometidos, seu diagnóstico e tratamento são dificultados pela disponibilidade limitada de medicamentos de alta qualidade e pelo surgimento da resistência aos antifúngicos utilizados. Apesar da preocupação crescente com as infecções fúngicas, estas recebem pouca atenção e recursos, resultando na falta de dados sobre a distribuição dos fungos e os padrões de resistência aos antifúngicos, sendo, portanto, difícil estimar o impacto de tais doenças (OMS, 2022).

Os antifúngicos existentes atualmente são limitados no mercado farmacêutico, o que torna a busca por princípios bioativos cada vez mais urgentes (El-Sayed *et al.*, 2024). Neste contexto, fungos do gênero *Preussia*, isolados de diversas fontes, mostraram-se promissores, pois, alguns estudos indicaram que espécies desses fungos são capazes de produzir substâncias bioativas, além de, algumas delas serem capazes de produzir metabólitos secundários com ação antimicrobiana (Xu *et al.*, 2019). Sendo assim, as buscas por novas substâncias para aplicações terapêuticas e farmacológicas tornam-se relevantes e justificam os estudos e investimentos com o endófito *Preussia africana*.

## 1.1 Objetivos

### 1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi realizar o cultivo do fungo endófito *Preussia africana*, isolado de *Handroanthus impetiginosus* (ipê) em meio agitado, com modificações nas condições de cultivo do fungo para otimizar a biossíntese de substâncias bioativas.

### 1.1.2 Objetivos específicos

Para cumprir o objetivo geral foi necessário realizar as etapas que se apresentam a seguir:

- a) Realizar o cultivo do fungo endófito *Preussia africana*, já identificado e isolado de *Handroanthus impetiginosus* (ipê rosa) e que se encontra preservado no laboratório de Bioprocessos;
- b) Realizar um planejamento experimental para otimizar o meio de cultura para que o fungo produza substâncias bioativas em quantidades suficientes para estudos posteriores;
- c) Realizar extrações líquido-líquido com solventes de polaridades diferentes (clorofórmio e acetato de etila) para extrair as substâncias biossintetizadas pelo fungo, presentes no caldo de fermentação.
- d) Determinar o potencial antimicrobiano e antioxidante dos extratos de diferentes polaridades, obtidos a partir do cultivo do fungo;
- e) Avaliar os extratos por cromatografia em camada delgada, utilizando diferentes reveladores para analisar o perfil químico;
- f) Validar os experimentos com maiores massas e com melhores atividades antimicrobianas.
- g) Avaliar a toxicidade *in vivo* de alguns extratos contra a larva *Galleria mellonella*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fungos endofíticos

Os fungos desempenham vários papéis nos ecossistemas, incluindo ciclagem de nutrientes, controle de populações de certas espécies e decomposição de madeira e substâncias tóxicas no solo. Devido a essa capacidade, o potencial biotecnológico de muitas espécies de fungos tem sido investigado (Da Silva *et al.*, 2018).

A palavra endófito vem do grego e significa literalmente "dentro da planta" (endo significa dentro, python significa planta) (Schulz & Boyle, 2005). Os microrganismos conhecidos como endofíticos incluem, principalmente, fungos e bactérias que estabelecem uma relação simbiótica com plantas, sem causar sintomas evidentes, durante toda sua existência ou em determinados períodos dela (Zhang *et al.*, 2020). Petrini (1991) propôs que os endófitos residem em diferentes partes das plantas e que, em certa fase de seu ciclo de vida, podem estabelecer-se em seus tecidos internos sem causar prejuízos visíveis ao seu hospedeiro. Dessa forma, patógenos latentes, conhecidos por viverem de forma assintomática, dentro dos tecidos do hospedeiro, com uma fase epífita em seu ciclo de vida, também são endófitos (Shen *et al.*, 2022).

Os endófitos também são capazes de desempenhar funções importantes para o desenvolvimento da planta, incluindo fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de hormônios vegetais como as auxinas e compostos voláteis promotores de crescimento (Hardoim *et al.*, 2015). Por outro lado, os hospedeiros oferecem a esses microrganismos nutrientes importantes para o seu desenvolvimento, como por exemplo o nitrogênio e carbono e um habitat seguro para sua sobrevivência (Fadiji & Babalola, 2020). Eles colonizam de forma sistêmica o apoplasto, vasos condutores e interior de tecidos vegetais, como folhas, caule, raízes, frutos e sementes (Rocafort *et al.*, 2020; Rodriguez *et al.*, 2009). Geralmente, muitas espécies endofíticas podem ser isoladas de uma única planta, podendo ser pelo menos uma delas, específica do hospedeiro (Chapla *et al.*, 2013).

A quantidade de fungos presentes em um determinado hospedeiro irá depender de alguns fatores, como a idade da planta, a sua contribuição genética e o meio ambiente no qual a planta se insere. A interação endófito-hospedeiro pode ser estabelecida de acordo com o crescimento dessa planta hospedeira, sua resistência em relação à fatores bióticos e abióticos, e principalmente pela sua produção de metabólitos secundários (Chapla *et al.*, 2013).

## 2.2. Doenças fúngicas e antifúngicos

Todos os anos, pelo menos 1,6 milhões de pessoas são levadas a óbito e mais de um bilhão de pessoas são afetadas por infecções fúngicas (Almeida *et al.*, 2019). Nos últimos anos, a frequência de infecções por fungos mostra-se cada vez mais presente na vida das pessoas. Estas infecções podem se manifestar de forma superficiais ou profundas, causando elevadas taxas de mortalidade. Infecções fúngicas profundas podem causar micoses invasivas, através da invasão do fungo em tecidos subcutâneos, mucosas e órgãos internos. Os casos de doenças fúngicas invasivas (DFI) estão aumentando à medida que grupos de risco aumentam, o que está relacionado a muitos fatores, incluindo avanços na medicina moderna e a disponibilidade de tratamentos e intervenções prejudiciais ao sistema imunológico, como a quimioterapia e a imunoterapia contra o câncer e transplante de órgãos sólidos. Novos grupos de risco DFI são continuamente detectados. Alguns exemplos incluem pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), doença hepática ou renal e infecções respiratórias virais (Revankar, 2021).

A pandemia da doença coronavírus (COVID-19) tem sido associada a um aumento na incidência de doenças fúngicas. Três grupos de infecções fúngicas associadas à COVID-19 como a aspergilose, mucormicose e candidemia foram descritas com consequências muitas vezes devastadoras (Raut & Huy, 2021). Atualmente, as DFI são causadas principalmente por espécies de *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus*, sendo que as drogas utilizadas em seus tratamentos são, principalmente, a equinomicina, flucitosina, polienos e os triazóis (Pathakumari *et al.*, 2020).

Já as infecções fúngicas superficiais geram as micoses cutâneas causadas por fungos patogênicos que parasitam a pele e os tecidos queratinizados como cabelos e unhas. A micose cutânea é uma das infecções fúngicas superficiais mais comuns, com uma incidência de aproximadamente 20-25% (Taha; Zaghloul, 2018), e são produzidas principalmente por espécies de *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, sendo que a infecção de pele mais comum em humanos é causada pela espécie *Trichophyton rubrum*.

Com o aumento da incidência de infecções fúngicas, com a falta de medicamentos antifúngicos disponíveis e com o surgimento de cepas fúngicas resistentes aos medicamentos disponíveis, o sucesso do tratamento em pacientes com infecção fúngica é um problema desafiador. Por exemplo, o patógeno *Candida auris* multirresistente a medicamentos tornou-se uma das principais ameaças à segurança da saúde pública global (Du *et al.*, 2020). Ao mesmo tempo, com o surgimento de cepas de *Aspergillus* resistentes aos azóis, as infecções causadas

por este gênero tornaram-se uma das preocupações globais de saúde pública (Jorge, 2021). Durante a pandemia de COVID-19, verificou-se que o número de pacientes com COVID infectados por *Aspergillus* chegou a 23,3% (Lai & Yu, 2021). Além disso, as cepas de fungos resistentes aos medicamentos não se limitam às infecções fúngicas profundas, mas também estão aumentando rapidamente em associação com infecções fúngicas superficiais. Verificou-se que a incidência de fungos superficiais resistentes à terbinafina variou de 16 a 77% na Índia (Singh *et al.*, 2020). Neste contexto, esforços devem ser feitos para se isolar ou se desenvolver novas drogas antifúngicas ou mesmo inibidores fúngicos, que sejam capazes de resolver ou minimizar essa problemática mundial relacionada às micoses.

### 2.2.1 Medicamentos utilizados nos tratamentos de infecções fúngicas

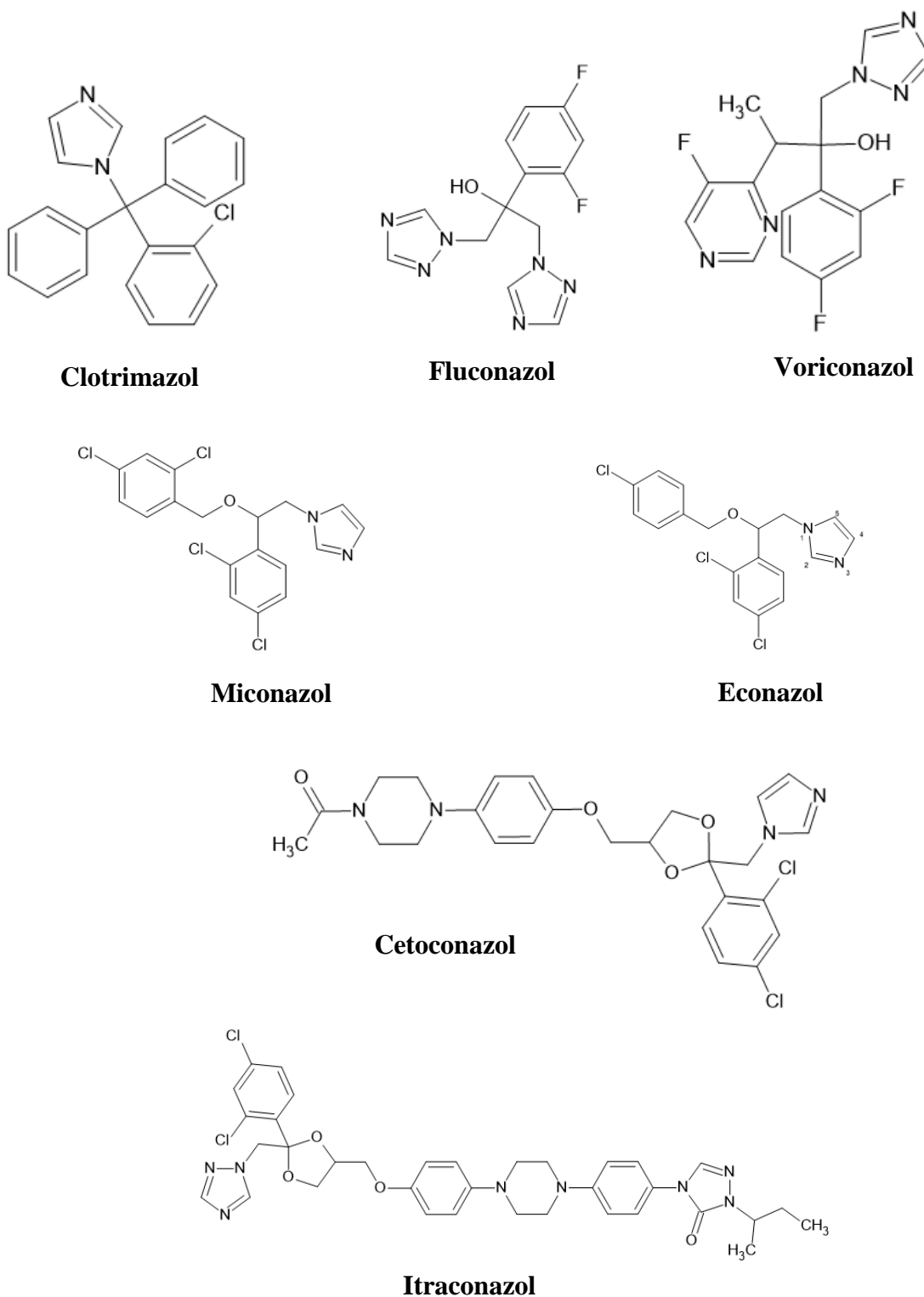
A morbidade e mortalidade causadas por infecções fúngicas crescem de maneira desordenada em todo o mundo devido ao aumento de transplantados, ao uso de agentes imunossupressores e ao surgimento de cepas fúngicas resistentes às drogas comercializadas, este fato remete à comunidade científica um grande desafio em termos de tratamento desse tipo de infecção, devido às limitações das classes de drogas disponíveis comercialmente. Por esse motivo, é imprescindível o estabelecimento de estratégias para identificar, isolar e projetar novos medicamentos antifúngicos.

Os últimos antifúngicos aprovados para uso humano datam do ano de 2002, após essa data não houve mais aprovações de novos tratamentos, possivelmente este problema seja justificado pela heterodoxia entre a taxa de mortalidade impelida pelas doenças fúngicas e os valores investidos em diagnósticos e tratamentos (Rodrigues & Nosanchuk, 2020). Os fármacos disponíveis usados contra as doenças fúngicas requerem um longo tratamento com diversos efeitos colaterais como: disfunções renais, problemas hepáticos, efeitos gastrintestinais, reações alérgicas, entre outros (Wheat *et al.*, 2016). Os antifúngicos disponíveis para tratamentos, são limitados no mercado farmacêutico, o que torna a busca por novas substâncias, uma área de grande importância. As classes antifúngicas existentes são os derivados azólicos, equinocandinas, poliênicos e análogos de nucleosídeos (Guzzetti *et al.*, 2017; Spampinato *et al.*, 2013).

A anfotericina B (Figura 1) pertence a um grupo de medicamentos antifúngicos chamados poliênicos, destinados ao tratamento de doenças invasivas graves. Ela atua diretamente na membrana celular dos fungos, pois apresenta alta afinidade pelo ergosterol, o que explica sua seletividade. Além disso, essa classe de medicamento afeta a permeabilidade



Figura 2 - Estrutura química dos antifúngicos da classe dos azóis

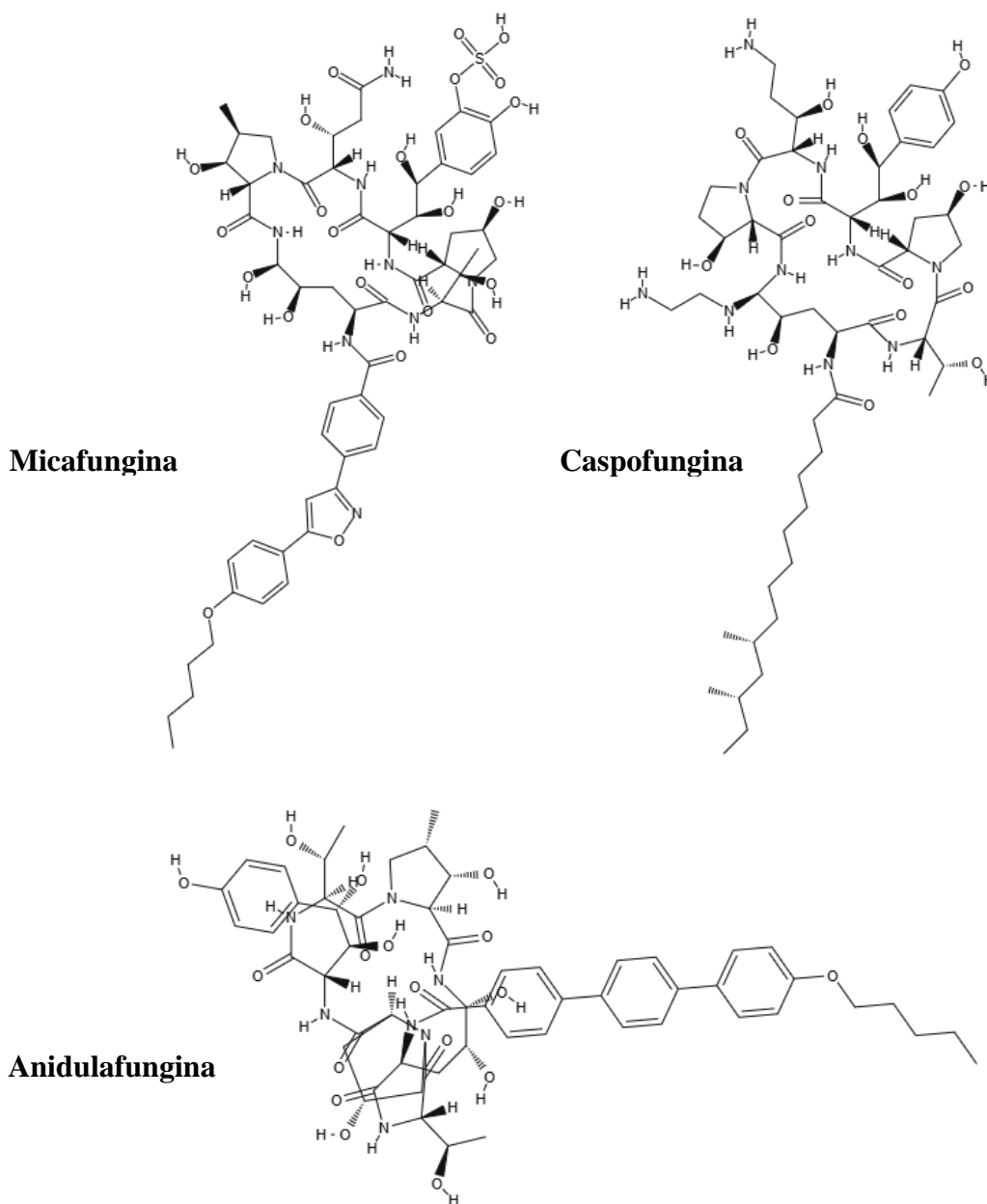


Fonte: Do Autor (2024).

As equinocandinas são uma nova classe de medicamentos antifúngicos, clinicamente utilizados, e são representados por anidulafungina, caspofungina e micafungina (Figura 3), os

quais são moléculas lipopeptídicas semi-sintéticas e atuam na inibição não competitiva da enzima (1,3)- $\beta$ -D-glicosintetase codificada pelo gene FKS1, impedindo a produção do polímero (1,3)- $\beta$ -D-glicano da parede celular fúngica, fragilizando-a e promovendo a exposição e ruptura de sua membrana plasmática (Robbins; Caplan; Cowen, 2017).

Figura 3 - Estrutura química das três equinocandinas utilizadas na prática clínica: micafungina, caspofungina e anidulafungina.



Fonte: Do Autor (2025).

### 2.3 Importância dos fungos na área biotecnológica

A biotecnologia microbiana ajudou a firmar de fato que os microrganismos exercem papéis relevantes na indústria, agricultura e medicina (Gouda *et al.*, 2016; Rajamanikyan *et al.*, 2017). Alexander Fleming, em 1929, descreveu pela primeira vez, a penicilina, substância produzida pelo fungo *Penicillium notatum*, capaz de combater doenças infecciosas causadas por bactérias. Outras substâncias produzidas a partir de metabólitos de fungos, com atividades farmacológicas diferentes podem ser destacadas: como a mevinolina, que atua como redutor de colesterol; as cefalosporinas, que são antibióticos; a ergometrina, um medicamento utilizado no tratamento de hemorragias no pós-parto; a ciclosporina, que é utilizada na prevenção contra a rejeição dos órgãos transplantados, entre outros exemplos (Pinto *et al.*, 2002; Takahaski & Lucas, 2008).

Várias classes de compostos, como, alcaloides, benzopirranonas, flavonoides, ácidos fenólicos, quinonas, esteroides, terpenoides, tetralonas, xantonas e outras podem ser produzidas pelos endófitos. Esses compostos podem apresentar diversas atividades biológicas como: antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, anti-inflamatória, entre outras (Bogas *et al.*, 2024). Esta característica dos microrganismos os torna importantes na área biotecnológica, pois, por meio deles podem ser gerados medicamentos de baixo custo ou outras substâncias que podem ser utilizadas em diferentes áreas trazendo benefícios para os seres humanos (Pal; Shaik; Begum, 2020).

Além disso, os fungos endofíticos atuam como agentes de biocontrole, colonizando o mesmo nicho ecológico que os patógenos de plantas. Eles podem atuar no controle de pragas e vetores que podem danificar as plantações (Fadiji, 2020; Rai *et al.*, 2021). Os compostos bioativos produzidos por esses endófitos, como os agentes antimicrobianos, hormônios (como auxina e giberelinas) e enzimas hidrolíticas (como celulasas, proteases e quitinases), são abundantes e essenciais para a sobrevivência e manutenção de endófitos nas plantas, bem como para a saúde da planta hospedeira e para a tolerância às condições estressantes (Eid *et al.*, 2019)

Vários fungos também têm sido usados na produção de alimentos há muitos anos. Produtos como o pão feito com a ajuda do fungo *Saccharomyces cerevisiae* e o queijo feito com a ajuda do *Penicillium roqueforti* são exemplos do papel que esses organismos desempenham na indústria de alimentos. A fermentação alcoólica ocorre desde os primórdios na produção de vinhos, pães e queijos. Esses microrganismos são de grande importância, pois desempenham papel essencial na inibição do crescimento de outros microrganismos que são

indesejáveis nos alimentos. O processo fermentativo pode gerar outros componentes como aromas, sabores, entre outros (Fadiji; Babalola, 2020, Takahashi, *et al.*, 2017).

#### 2.4 Gênero *Preussia* e seus metabólitos

O gênero "*Preussia*" engloba uma grande variedade de organismos coprófagos, microrganismos isolados de fezes de animais e outros meios como: madeira, solo e de plantas (Mapperson *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2019). Mapperson e colaboradores (2014) encontraram as espécies *Preussia africana*, *P. australis*, *P. minimos*, *P. cylindrica* e *P. funiculata*, as quais foram extraídas de folhas de plantas provenientes da Austrália.

Amostras de caule e espinhos do cacto *Melocactus ernestii* da Caatinga, coletadas por Ferreira-Silva e colaboradores (2021) levaram ao isolamento dos fungos *Preussia sp.* e *Preussia minimoides*. Enquanto um estudo realizado por Paudel *et al.*, (2018) demonstraram que fungos do gênero *Preussia* apresentam habilidade de produzir substâncias com atividades antibacterianas e antioxidantes sendo uma fonte promissora de novos produtos naturais com atividade biológica. Alguns estudos têm demonstrado que este gênero se caracteriza por produzir substâncias contra diversos patógenos humanos (Khan *et al.*, 2016).

No trabalho desenvolvido por Xu *et al.*, (2019), foi isolado o fungo *Preussia isomera* XL-1326 do caule da planta *Panax notoginseng*, o qual produziu um par de enantiômeros sesquiterpenóides raros de ocorrência natural, chamados de (+) - preuisolactona A e (-) - preuisolactona A, sendo que o enantiômeros (+) - preuisolactona A apresentou potencial antibacteriano contra *Micrococcus luteus*. Paudel *et al.*, (2018) realizou um estudo no qual o fungo *Preussia* isolado do líquen *Canoparmelia sp.*, foi capaz de produzir compostos com elevada atividade antioxidante em relação ao controle utilizado no estudo. Esse gênero é conhecido por produzir policetídeos e depsidonas bioativas. As similinas A e B e a preussomerina A apresentaram atividade antifúngica, ambas foram isoladas de *Preussia similis* (Noumeur *et al.*, 2017). A Tabela 1 apresenta alguns compostos isolados do gênero *Preussia* com suas respectivas atividades biológicas e na Figura 4 encontram-se as estruturas químicas dos compostos isolados do gênero *Preussia*, referentes à Tabela 1.

Chen *et al.*, (2009) em seu trabalho sobre os constituintes químicos do fungo endofítico *Preussia sp.* descreveu o isolamento de três análogos do espirobisnftaleno, espiropreussiona A, espiropreussiona B e espiropreussomerina A. A espiropreussiona B é um análogo do espirobisnftaleno e a espiropreussiona A é o segundo composto desta série com um esqueleto espiro-nonadieno. A espiropreussiona A apresentou citotoxicidade contra células cancerígenas

humanas de ovário A2780 e células de hepatoma humano BEL-7404 com valores de IC<sub>50</sub> de 2,4 e 3,0 µM, respectivamente, e fraca atividade contra *Staphylococcus aureus* com um valor MIC de 25 µM. Chen e colaboradores (2020) isolaram, do endófito *Preussia isomera* proveniente do *Panax notoginseng*, alcalóides, denominados (±) -preisomida, juntamente com cinco policetídeos já conhecidos, usando a estratégia de uma cepa-muitos compostos (OSMAC). Estruturalmente, a (±) -preisomida possui um raro anel tetra-hidro-2H-1,2-oxazina de ocorrência natural. Um dos policetídeos apresentou atividade antibacteriana contra *Enterococcus faecium* multi-resistente, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Enterococcus faecalis* multirresistente com um valor MIC de 25 µg. mL<sup>-1</sup> bem como atividade antifúngica moderada contra *Gibberella saubinetii* com um valor MIC de 50 µg. mL<sup>-1</sup>.

De acordo com o trabalho de Talontsi *et al.*, (2014), dois dibenzofuranos preussiafuranos A e B foram isolados do fungo *Preussia* sp. isolado de *Enantia chlorantha* Oliv. Os compostos apresentaram atividade antiplasmodial contra estágios eritrocíticos de *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina (NF54) e citotoxicidade moderada em linhagens celulares de fibras musculares L6 com valores de IC<sub>50</sub> iguais 8,67 e 14,8 µM, respectivamente.

A espécie *Preussia africana* foi proposta por Arenal *et al.*, (2005) com diversas análises morfológicas e moleculares isoladas de diferentes substratos, como esterco de cabra, zebra e folhas de *Viburnum tinus* L. *P. africana* também pode ser encontrado na forma de endófitos a partir de plantas de diferentes espécies (Brum *et al.*, 2012; Gonzalez-Menendez *et al.*, 2017). Um trabalho com a espécie *Preussia africana* indicou que o fungo foi capaz de produzir compostos bioativos citotóxicos para as células A549, causadoras de câncer de pulmão humano (Khan *et al.*, 2016). Segundo Khan *et al.*, (2016) existem poucos trabalhos sobre metabólitos secundários produzidos pelo gênero *Preussia*, dando margem para o investimento em pesquisas nesta área.

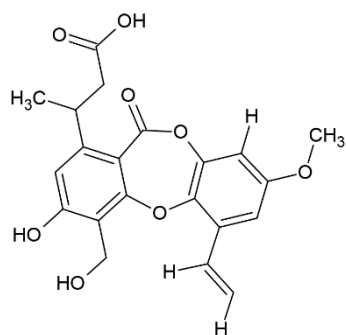
A equipe do laboratório Bioprocessos isolou a espécie *Preussia africana* de folhas sadias do ipê rosa, estudos preliminares indicaram que o fungo isolado apresentou potencial para biossintetizar antimicrobianos e enzimas (Souza *et al.*, 2018).

Tabela 1 - Atividade biológica de alguns metabólitos isolados do gênero *Preussia*

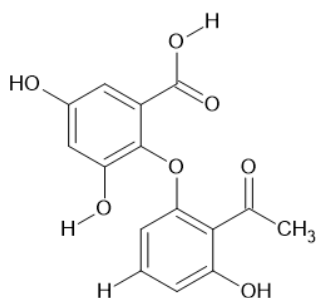
Metabólitos	Espécie	Atividade biológica	Referência
Auranticina A	<i>P. aurantiaca</i>	Antimicrobiana e antifúngica	Gonzalez-Menendez <i>et al.</i> , 2017
Ácido astérico	<i>Preussia sp.</i>	Antiplasmodial, antifúngica e antimicrobiano	Talontsi <i>et al.</i> , 2014
Preussomerina A	<i>P. isomera</i>	Antifúngica e antimicrobiana	Gonzalez-Menendez <i>et al.</i> , 2017
Preussiafurano A e B	<i>Preussia sp.</i>	Citotóxica	Talontsi <i>et al.</i> , 2014
Leptosina A e Leptosina C	<i>P. typharum</i>	Citotóxica	Du <i>et al.</i> , 2014
Similina A	<i>P. similis</i>	Antifúngica	Gonzalez-Menendez <i>et al.</i> , 2017
Culpina	<i>Preussia sp.</i>	Antifúngica e antibacteriana	Gonzalez-Menendez <i>et al.</i> , 2017
Ciperina	<i>P. fleischhakii</i>	Fitotóxica	Gonzalez-Menendez <i>et al.</i> , 2017
Sporminarina A e B	<i>P. minimoides</i>	Antifúngica	Gonzalez-Menendez <i>et al.</i> , 2017
Microsphaeropsona A	<i>P. minima</i>	Antifúngica	Xiong <i>et al.</i> , 2014
Sprovexina A	<i>P. vexans</i>	Antifúngica e antibacteriana	Soman. <i>et al.</i> , 1999
Terezina A	<i>P. teretispora</i>	Antifúngica e antibacteriana	Wang <i>et al.</i> , 1995
Preussocromona A	<i>P. africana</i>	Citotóxica	Zhang <i>et al.</i> , 2012
(+) - (-) - Preuisolactona A	<i>P. isomera</i>	Antibacteriana	Xu <i>et al.</i> , 2019

Fonte: Adaptado de Lustosa, 2023.

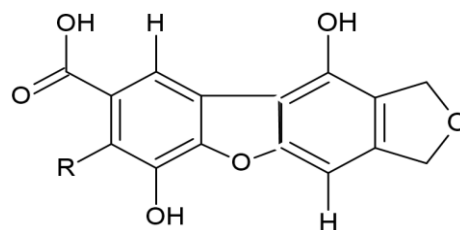
Figura 4 - Estruturas química dos metabólitos isolados do gênero *Preussia*



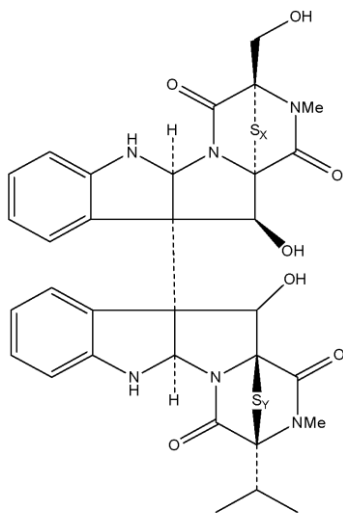
**Auranticina A**



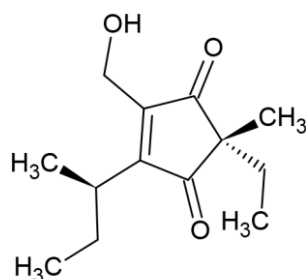
**Ácido astérico**



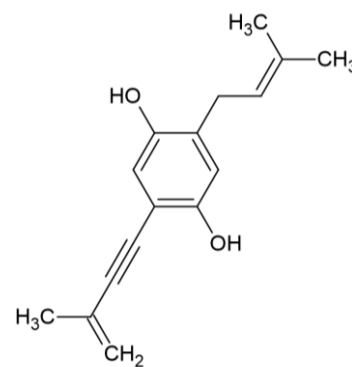
**Preussiafurano A e B**



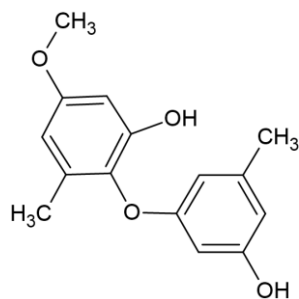
**Leptosina A e Leptosina C**



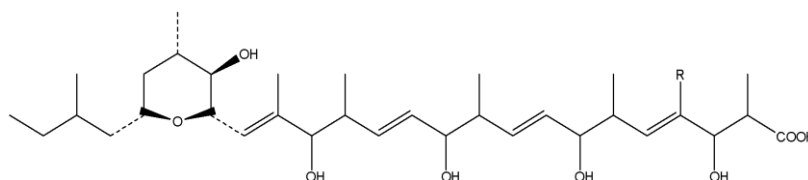
**Similina A**



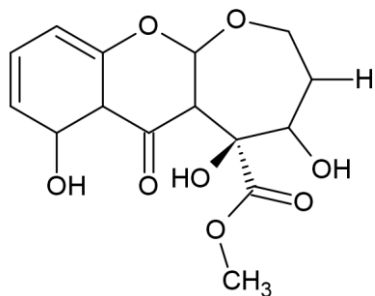
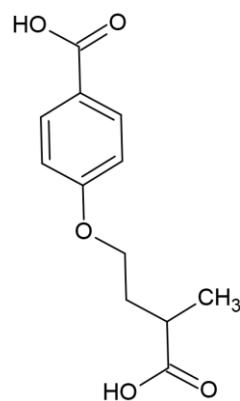
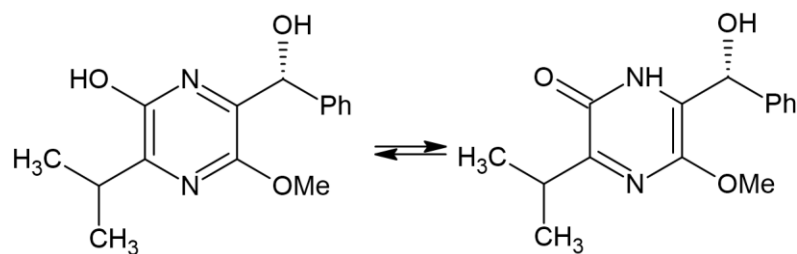
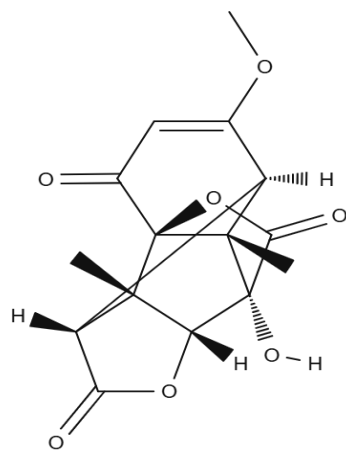
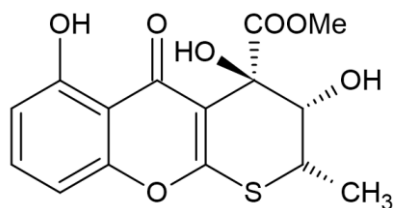
**Culpina**



**Ciperina**



**Sporminarina**

**Microsphaeropsona A****Sporovexina A****Terezina A****(+) Preuisolactona A****Preussocromona A**

Fonte: Do Autor (2024).

## 2.5 Otimização de processos

Algumas técnicas foram e estão sendo desenvolvidas para a busca de substâncias provenientes do metabolismo secundários de fungos endofíticos como, por exemplo, a fermentação, a modulação epigenética, a indução química, a co-cultura e a otimização de processos. Essas técnicas vêm sendo desenvolvidas para que as produções desses metabólitos sejam feitas em uma escala maior. A fermentação, por exemplo, é uma técnica bastante utilizada, mas que ainda necessita de estudos mais aprofundados para que o produto supra a demanda do mercado (Mahajan & Balachandran, 2015).

Outra técnica utilizada é a de otimização de processos. Otimizar um processo é fazer com que um experimento tenha uma maior precisão em relação ao produto, diminuindo o número de experimentos e de custos de procedimentos. Plackett e Burman em 1946 desenvolveram o chamado DOE - *Design of Experiments*, que é uma metodologia capaz de mostrar variáveis que possam influenciar em um determinado resultado final de um projeto, como por exemplo: temperatura, pH, os elementos presentes no meio de cultivo, assim como diversos outros fatores devem ser considerados cuidadosamente durante a otimização de um procedimento, sendo necessário selecionar as variáveis, melhorar as condições do experimento e validar o processo quando as condições estiverem otimizadas (Baco *et al.*, 2019, Plackett & Burman, 1946).

Otimizar as condições de um processo ajuda tanto no custo do produto quanto no custo da produção, no tempo e na efetividade de um projeto. Otimizar os meios de cultivo se faz essencial para que haja produção de moléculas alvo, com garantia de resposta em uma produção futura (Mahajan & Balachandran, 2015).

## 2.6 Análise por Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia planar, na forma de cromatografia em camada delgada ou em camada delgada de alta resolução (CCD, CCD-AR), continua sendo uma técnica de separação robusta e amplamente utilizada. Apresenta-se como um método simples, rápido, de baixo custo (Cai, 2014) e qualitativo para análise de misturas ou para encontrar componentes bioativos nas mesmas. O formato da CCD/CCD-AR também é um método único para preservar a separação, permitindo uma investigação adicional de componentes de interesse (incluindo quantificação/determinação de estrutura) separados no tempo e no espaço em relação à amostra original (Wilson & Poole, 2023).

Para se entender por que a CCD continua sendo um modo importante de separação ainda no século 21, mesmo quando técnicas como a cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas poderia reduzi-la a uma técnica insignificante, deve-se levar em consideração seus benefícios. A CCD proporciona um melhor arranjo para análise simultânea de maior número de amostras, com estratégias de detecção flexíveis e uma maior tolerância em relação às matrizes das amostras, não sendo necessário diluições e/ou pré-tratamento das amostras antes da análise. A economia de tempo e solventes para a CCD também é uma consequência de sua capacidade em separar múltiplas amostras em paralelo, com cada amostra ocupando um único ponto (ou linha) na fase estacionária, na qual várias amostras e padrões podem ser colocados lado a lado na camada delgada para separação simultânea com a mesma fase móvel. Além disso, muitas placas podem ser eluidas simultaneamente se for necessário ampliar a escala de análise destas amostras, apenas adicionando mais câmaras de eluição (Wilson & Poole, 2023).

## **2.7 Toxicidade em modelo sistêmico *Galleria mellonella***

Os testes toxicológicos são importantes para garantir a segurança e eficácia de novas substâncias farmacológicas ou com potencial farmacológico. Esses estudos abrangem uma série de testes *in vitro* como cultura em células e tecidos isolados, permitindo avaliações de parâmetros toxicológicos de forma ágil e barata. Os testes *in vivo*, por sua vez, fazem uso de animais para experimentação, e por esse motivo, oferecem informações mais completas sobre os efeitos sistêmicos de substâncias químicas (Silva *et al.*, 2021).

A Rede Nacional de Métodos Alternativos ao Uso dos Animais (RENAMA), classifica as larvas de *Galleria mellonella* como um modelo experimental oportuno, as quais têm sido amplamente utilizada nas últimas décadas como modelo para estudar a toxicidade de substâncias químicas, estudos de infecções bacterianas ou fúngicas e também para avaliar a eficácia de novos medicamentos, antes de prosseguir para estudos pré-clínicos em mamíferos, diminuindo o uso desses animais, e alinhando-se aos princípios da bioética. Esse modelo de inseto oferece vantagens sobre os modelos de mamíferos, pois não é necessária prévia aprovação ética para seus estudos, é facilmente manipulado, apresenta baixo custo, é um modelo de fácil reprodução em larga escala e permite uma rápida execução experimental, associada à capacidade de incubar esses insetos em temperaturas entre 25 e 37 °C. Além disso, o sistema imunológico dessas larvas se assemelha de certa forma ao sistema dos mamíferos, tornando-o apropriado aos estudos (Admella; Torrents, 2022; Loh *et al.*, 2013; Tsai; Loh; Proft,

2016; Serrano *et al.*, 2023).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Obtenção e depósito do fungo endofítico estudado

O fungo endofítico do gênero *Preussia* (identificado por biologia molecular: espécie *Preussia* c.f. *africana*), foi obtido de folhas saudáveis de *Handroanthus impetiginosus* (ipê rosa) coletado em Alfenas-MG. Alguns ramos da planta foram depositados no herbário da Unifal-MG com o número de exsicata 2745. A sequência parcial da região ITS1-5.8S-ITS2 apresentou 99-100% de similaridade com a mesma região ribossomal de algumas espécies de *Preussia* e foi depositada no Genbank (SAMN 06350896) (Souza *et al.*, 2018).

#### 3.2 Repique do fungo em meio sólido

O fungo *Preussia africana*, preservado de acordo com metodologia preconizada por Castellini (Capriles *et al.*, 1989) foi reativado em placas Petri contendo ágar batata dextrose (ABD) e em ágar malte (MEA), permanecendo sob observação por um período de 15 dias, dentro de caixa de isopor, em condições de temperatura ambiente.

#### 3.3 Cultivo do fungo em meio agitado

Após o cultivo do fungo em placa Petri (Item 3.2), o mesmo foi incubado em shaker a 27 °C, 250 rpm, por 15 dias, para que houvesse crescimento do microrganismo. Fragmentos de 5 mm de ágar malte com o fungo crescido foram introduzidos em erlenmeyers de 1000 mL. Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), para avaliação da produção de biomassa fúngica. Em cada erlenmeyer foi inserido 200 mL de caldo Czapek modificado, constituído por NaNO<sub>3</sub>: 2,0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,5 g; KCl: 0,5 g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,01 g; extrato de levedura: 1,0 g; água destilada: qsp 1000 mL; a quantidade de glicose e maltose (fontes de carbono) variaram de acordo com cada ensaio, bem como o número de fragmentos inoculados no erlenmeyer (Tabela 2). Os ensaios foram realizados em duplicata, totalizando 400 mL de caldo. A Figura 5 ilustra o cultivo em modo agitado de alguns dos ensaios realizados.

Figura 5 - Fermentação de *Preussia africana* em erlenmeyers em modo agitado



Fonte: Do Autor (2023).

### 3.4 Planejamento Experimental

Para se avaliar a influência dos constituintes do meio de cultivo foi utilizado um DCCR  $2^3$ , incluindo 3 repetições no ponto central e 6 pontos axiais, totalizando 17 ensaios, no qual as variáveis consideradas foram as concentrações ( $\text{g.L}^{-1}$ ) das fontes de carbono, (maltose e glicose) e o número de fragmentos para inocular o meio de cultivo. Como variáveis dependentes foram avaliadas as massas dos extratos orgânicos secos, utilizando solventes com diferentes polaridades: clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e acetato de etila ( $\text{AcOEt}$ ) expressos em miligramas (mg). A Tabela 2 indica os critérios avaliados no planejamento, em números codificados e reais, para os níveis inferior, intermediário e superior. O programa Protimiza *Experimental Design* foi utilizado para a análise de regressão e para gerar os gráficos. Para o número de fragmentos foram utilizados experimentalmente valores inteiros, arredondados de maneira adequada.

Tabela 2 – Variáveis para o planejamento completo  $2^3$ , níveis codificados e valores reais.

Variáveis	Níveis				
	-1,68	-1	0	+1	+ 1,68
x <sub>1</sub> Glicose (g.L <sup>-1</sup> )	30	32,02	35	37,98	40
x <sub>2</sub> Maltose (g.L <sup>-1</sup> )	0	4,05	10	15,95	20
x <sub>3</sub> No. de Fragmentos	2	2,81	4	5,19	6

x<sub>3</sub>: valores reais utilizados no experimento: para 2,81 foi utilizado (3) e para 5,19 foi utilizado (5)

Fonte: Do Autor (2023).

### 3.5 Filtração e extração com solventes

Após o período de cultivo do fungo, foi necessário retirar o micélio presente nos caldos, portanto, o caldo foi submetido à filtração à vácuo. Os filtrados, livres de células, foram utilizados para extrações líquido-líquido com clorofórmio e acetato de etila, na proporção de 1:1 ( $V_{\text{caldo}}$  400 mL:  $V_{\text{solvente}}$  400 mL). As extrações foram realizadas em duas ou três etapas. A fase orgânica foi evaporada, em rota-evaporador e, em seguida, em capela de exaustão.

### 3.6 Avaliação de atividade antimicrobiana

Os extratos orgânicos descritos no item 3.5 foram analisados quanto à atividade antimicrobiana, como descrito abaixo:

#### 3.6.1 Patógenos utilizados para avaliação da atividade antimicrobiana

Foram utilizados os seguintes patógenos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e algumas espécies de *Candida*, dentre elas: *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 90030) e *Candida tropicalis* (ATCC 750), disponíveis no banco de cepas do Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG. Algumas cepas de *Candida* foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Amanda Latércia Tranches Dias.

A metodologia utilizada para os ensaios de atividade antimicrobiana segue o

procedimento descrito por CLSI (2006, 2008), com pequenas modificações. Cada patógeno foi cultivado 24 horas antes da realização do experimento. Com a utilização de um espectrofotômetro, foram preparadas suspensões utilizando solução salina estéril de NaCl 0,9%, capaz de fornecer  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (75% de transmitância em 660 nm), correspondente à escala 0,5 de McFarland.

### 3.6.2 Triagem dos extratos para avaliação da atividade antifúngica – Teste de difusão em ágar

Para avaliação dos extratos contra espécies de *Candida* foi realizada, de maneira preliminar, uma triagem por meio do teste de difusão em ágar. Em placas de Petri foram adicionados cerca de 30 mL de meio ágar Müller Hinton (MH), após sua solidificação foi aplicada, de maneira homogênea por toda superfície do ágar, uma suspensão de cada microrganismo patogênico (*Candida albicans*, *C. glabrata* ou *C. tropicalis*), com o auxílio de *swab*. A seguir foram feitos furos no ágar, no qual foram adicionadas 40  $\mu$ L dos extratos provenientes da extração líquido-líquido. Os extratos foram preparados a partir da dissolução de 1 mg do mesmo em 125  $\mu$ L de etanol, fornecendo uma concentração de  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

As placas foram incubadas a 35°C e observadas após 24 horas, para medição do halo formado ao redor do poço indicando a inibição do crescimento do patógeno testado.

### 3.6.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

Em uma microplaca com 96 poços, foram adicionados 100  $\mu$ L de meio caldo Muller Hinton (CMH). Também, foram adicionados 20  $\mu$ L da amostra solubilizada em etanol e 80  $\mu$ L do mesmo meio ao primeiro poço de cada linha da placa. Na sequência iniciou-se a transferência de 100  $\mu$ L, partindo do primeiro poço para os demais poços, até o último, realizando-se, portanto, a diluição do extrato na placa. No último poço, um volume de 100  $\mu$ L foram descartados para que todos contivessem 100  $\mu$ L ao término da diluição. Após a diluição, 80  $\mu$ L de CMH e 20  $\mu$ L do inóculo preparado de acordo com o item 3.6.1 foram transferidos para todos os poços. O volume final em cada poço foi de 200  $\mu$ L. Foram reservados alguns poços para controle de crescimento do patógeno, de esterilidade do meio e do extrato, bem como, do solvente usado para dissolver o extrato (álcool etílico absoluto). Foram utilizadas duas concentrações iniciais para a diluição seriada: 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Nos experimentos em

que a concentração inicial era de 400 µg/mL, a diluição seriada iniciou-se a partir do primeiro poço. Já nos experimentos com concentração inicial de 800 µg/mL, a diluição seriada teve início a partir do segundo poço, que continha 400 µg/mL, após a mesma aplicação realizada para o primeiro poço. O experimento foi realizado em triplicata.

As microplacas foram reveladas com resazurina, que é um corante que indica a viabilidade das células com uma cor inicialmente azul, se após a incubação das placas a cor permanecer azul, isso indica que o extrato possui ação bacteriostática/fungistática contra o microrganismo testado, caso a cor se torne rosada, púrpura ou incolor, há um indicativo que o microrganismo é resistente ao extrato em análise (Sarker; Nahar & Kumarasamy, 2007). Para a revelação das microplacas contendo os patógenos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, estas foram mantidas a uma temperatura de 37°C por um período de até 24 horas, para então serem adicionados 20 µL de resazurina 0,2%. A leitura das microplacas foi realizada 2 horas após a adição do corante. Para a detecção do crescimento das espécies de *Candida*, as placas foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas. Após este período, 20 µL de resazurina a 0,2% foram adicionados a cada poço para indicar a viabilidade celular. A mudança de cor da resazurina foi avaliada 24 horas após a sua adição (Barros *et al.*, 2021).

Cada um dos extratos do fungo endofítico (1,0 mg) foi solubilizado em 125 µL de etanol. Os extratos foram dissolvidos com o auxílio do banho ultrassônico e homogeneizados no vórtex até se apresentarem completamente dissolvidos.

### **3.7 Atividade antioxidante e teor de flavonoides e fenólicos totais**

Os extratos foram avaliados quanto à sua capacidade em sequestrar os radicais DPPH, além disso, foram avaliados quanto aos seus conteúdos de fenólicos totais e de flavonoides totais.

#### **3.7.1 Ensaio de sequestro de radicais DPPH**

Os extratos do endófito *Preussia* foram preparados na concentração de cerca de 0,5 e 1,0 mg. mL<sup>-1</sup>. O DPPH é um radical estável centrado em nitrogênio cuja solução em etanol apresenta cor violeta entre 515-520 nm. Quando um substrato que pode doar um átomo de hidrogênio é adicionado à solução de DPPH, este é reduzido a difenil picril hidrazina, de cor amarela. O experimento foi realizado em microplacas de 96 poços, nos quais 66µL de cada

extrato foram adicionados à 134µL de DPPH (150µM) por meio de micropipeta e inseridos em cada poço, totalizando 200 µL em cada poço. Para o controle foram utilizados 66µL de etanol e 134µL de DPPH. O branco utilizado foi o etanol (200µL). Em seguida, para que a reação ocorresse, os reagentes foram agitados e mantidos em contato, no escuro, por 45 minutos. Utilizou-se leitor de ELISA, para realizar a leitura das microplacas, em 517 nm.

A capacidade antioxidante foi quantificada segundo as metodologias descritas por Souza *et al.* (2007) e Sucupira *et al.* (2012) com algumas modificações. Os resultados foram expressos em termos de equivalentes de Trolox (µmolET/g de extrato), utilizando a equação da reta obtida a partir da curva de calibração. Para a construção da curva, foram plotados: os valores de concentração de Trolox entre 20 - 140 µM, no eixo x em função da absorbância do Trolox, no eixo y.

A atividade antioxidante (%) foi determinada pela fórmula:

$$AA (\%) = (1 - Aa / Ac) * 100$$

AA (%): Atividade Antioxidante em %, Aa: Absorbância da amostra/extrato e Ac: Absorbância do controle.

### 3.7.2 Teor de fenólicos totais

Para a determinação do conteúdo de fenólicos totais utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu (FC) seguindo as metodologias descritas por Souza *et al.* (2007) e Chen *et al.* (2015) com modificações. Foram utilizadas microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 20µL de cada extrato fúngico nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg. mL<sup>-1</sup>. O ácido gálico (AG) foi usado como padrão, para construção da curva de calibração com concentrações variando entre 20 e 120 µg. mL<sup>-1</sup>. A água foi usada como branco e o etanol como controle. Foram adicionados o reagente FC (100µL) e a solução de carbonato de sódio 7,5% (75µL), sendo homogeneizados e mantidos no escuro por 40 minutos, a leitura dos poços foi realizada em 740 nm. Os valores de absorbância lidos foram utilizados para estimar o teor de fenólicos totais, a partir da curva de calibração. Os resultados foram expressos em microgramas de equivalência de ácido gálico (EAG) por mg de extrato.

### 3.7.3 Teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo o método colorimétrico apresentado por Meda *et al.*, (2005) e Sucupira *et al.*, (2012) com algumas modificações. Os extratos foram preparados nas concentrações de 1,0 - 5,0 mg. mL<sup>-1</sup>. Um volume de extrato de 100 µL ou de padrões de quercetina, juntamente com 100 µL de uma solução AlCl<sub>3</sub> 2% em metanol foram adicionados a uma microplaca de 96 poços. A mistura foi deixada em repouso por 10 minutos, para posterior leitura de absorbância em 415 nm. O branco foi obtido usando 100 µL de etanol juntamente com 100 µL de 2% AlCl<sub>3</sub> em metanol. Para determinar o teor de flavonoides, foi utilizada uma curva de calibração construída com o padrão de quercetina, solubilizada em etanol, em concentrações entre 0,25 e 10,00 µg. mL<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos foram expressos em microgramas de equivalente de quercetina (EQ) por mg de extrato.

### 3.8 Avaliação química dos extratos por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Este estudo foi realizado para monitorar as classes de compostos pela utilização de reveladores e o comportamento das substâncias, na presença de diferentes combinações de solventes durante a eluição, para futuros estudos de isolamento das substâncias presentes nos extratos. Para essa avaliação foram empregadas placas de cromatografia de Sílica-gel 60 sobre suporte de alumínio com indicador de UV F<sub>254</sub>. As placas de cromatografia foram visualizadas sob luz ultravioleta (UV) a 254 nm e 365 nm, e foram utilizados reveladores químicos para identificar as classes de compostos presentes, dentre eles:

- a) Solução de 20% de ácido fosfomolibdico em etanol P.A. aquecendo-se em seguida por 5 minutos em estufa a 120°C, para a identificação qualitativa de substâncias redutoras (MERCK, 1972).
- b) Revelador anisaldeído sulfúrico preparado segundo procedimento descrito na literatura (WAGNER; BLADT, 1996). Utilizado para detecção qualitativa de terpenos, açúcares, fenóis e esteróides.
- c) Revelador de cloreto férrico 1% (p/v), preparado conforme Farmacopéia Brasileira (2010), utilizado para detecção de compostos fenólicos.

Aproximadamente 10 mg de cada extrato foi pesado e em seguida diluído em 1 mL de solvente (clorofórmio ou acetato de etila). Para a aplicação das amostras nas placas cromatográficas foi utilizado um pipetador automático, ajustado com um volume de 2 µL.

### 3.9 Toxicidade e índice de saúde do modelo sistêmico *Galleria mellonella*

As larvas do modelo sistêmico *Galleria mellonella* foram criadas no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL/MG seguindo o protocolo desenvolvido por Jorjão et al. (2018), com algumas alterações. As larvas foram alimentadas com cera de abelha, mel e levedo de cerveja, fubá, farinha de soja torrada e leite em pó, sendo mantidas em uma incubadora DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio), com a temperatura controlada de 27 °C até o momento em que os testes foram realizados.

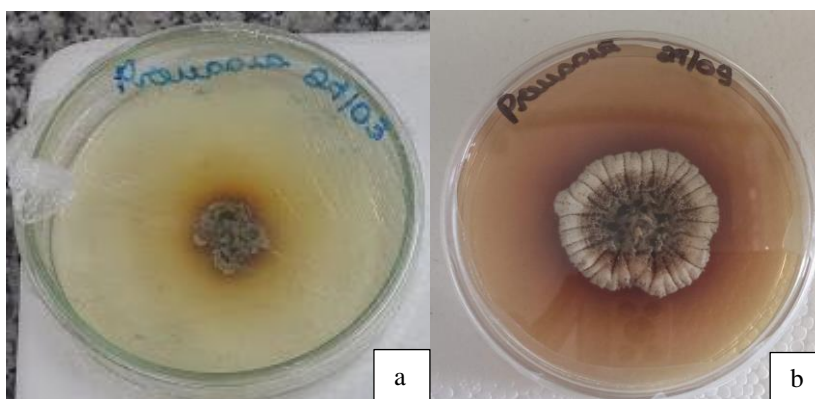
A toxicidade aguda foi avaliada utilizando o modelo sistêmico *G. mellonella*, de acordo com o que foi proposto por Sardi *et al.*, (2017), com alterações. Os extratos orgânicos (CHCl<sub>3</sub> e AcOEt) de *P. africana*, com atividades antimicrobianas promissoras foram avaliados quanto sua toxicidade frente às larvas de *G. mellonella* em concentrações de 800 µg/mL. Foram analisados seis extratos (CHCl<sub>3</sub>: 7C, 10C; e AcOEt: 4A, 7A, 12A e 13A). Para cada extrato foram selecionadas cinco larvas, pesando entre 0,25 e 0,30 gramas, sem apresentarem qualquer sinal de melanização. Dez microlitros de cada extrato ou do controle (Água destilada estéril e etanol 40%), foram injetadas na hemocele de cada larva através da última *proleg* usando uma Seringa Hamilton de 25 µL. As larvas foram mantidas a 27°C, na ausência de luz e analisadas depois de 24, 48 e 72 horas para verificar se as larvas apresentavam coloração marrom e se havia ausência de movimento ao toque. O gráfico de toxicidade foi elaborado e visualizado por meio do *software Prism*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Repique do *Preussia africana*

O fungo *Preussia africana* que estava preservado em água estéril foi reativado em placa Petri com ágar batata dextrose (ABD) e ágar malte (MEA). A Figura 6 mostra a fotografia do fungo nos dois meios sólidos.

Figura 6 - Fungo *Preussia africana* reativado em placas de Petri em meio ABD (a) e MEA (b).



Fonte: Do Autor (2023).

Ao observar a Figura 6 notou-se que após 15 dias de crescimento do fungo *P. africana* em ABD (a) e MEA (b), houve um crescimento melhor no ágar malte (MEA) em relação ao ágar batata dextrose (ABD). A presença de enzimas extracelulares como amilase  $\beta$ -glicosidase, celulase e protease, essenciais para a nutrição fúngica, neste meio, conforme descrito por Etim *et al.*, (2023), pode esclarecer essa diferença. Essas enzimas desempenham um papel crucial na nutrição fúngica, permitindo a degradação de alguns compostos orgânicos e a melhor assimilação de nutrientes. Os resultados obtidos de endófitos mostram a importância da escolha do meio de cultivo ideal para o crescimento dos fungos, uma vez que a composição nutricional do MEA pode fornecer uma rica fonte de nutrientes, como vitaminas e outros fatores promotores do crescimento dos fungos (Robbin; Hervey, 1958).

## 4.2 Ensaios do planejamento de experimentos e obtenção dos extratos orgânicos de *Preussia africana*

Com a finalidade de aprimorar as condições de crescimento do endófito *Preussia africana* e identificar as condições que forneciam maiores massas de extrato orgânico seco, usando acetato de etila e clorofórmio, foi realizado um DCCR 2<sup>3</sup>. Para cada condição de cultivo foram utilizados 2 erlenmeyers (1000 mL), com 200 mL de meio em cada um, totalizando 400 mL de caldo para cada experimento. Os seguintes componentes do meio Czapek permaneceram inalterados: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1,0 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,5 g; NaNO<sub>3</sub>: 2,0 g; KCl: 0,5 g; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,01 g; extrato de levedura: 0,5 g; água destilada: 1000 mL. Foram modificadas apenas as quantidades das variáveis independentes descritas na Tabela 2. De acordo com a matriz do planejamento completo, foram realizados 17 ensaios para o monitoramento das massas de extratos orgânicos obtidos em cada ensaio, modificando-se as quantidades de glicose, maltose e o número de fragmentos de inóculo. Os fragmentos inoculados foram obtidos a partir do meio sólido MEA.

Após o período de cultivo em 15 dias, os caldos de cultivo (400 mL), foram filtrados a vácuo para retirada do micélio. As massas dos extratos foram determinadas após a evaporação dos solventes em rota-evaporador. O valor do pH de cada caldo foi medido antes da extração líquido-líquido, os quais permaneceram entre 4,58 - 6,44, não apresentando grandes variações mesmo sendo alteradas as fontes de carbono e os números de fragmentos inoculados no meio. A Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento, indicando os níveis, valores reais, número de ensaios realizados, bem como as massas dos extratos acetato de etila e clorofórmio (mg).

Tabela 3 - Matriz para o planejamento completo  $2^3$  e respostas para cada ensaio.

Ensaio	Nível (Valor real)			Resposta (mg)	
	X <sub>1</sub> (glicose)	X <sub>2</sub> (maltose)	X <sub>3</sub> (inóculo)	Massa AcOEt (Y)	Massa Clorof. (Y)
1	-1 (32,02)	-1 (4,05)	-1 (2,81)	26,6	13,9
2	+1 (37,98)	-1 (4,05)	-1 (2,81)	57,4	94,8
3	-1 (32,02)	+1 (15,95)	-1 (2,81)	71,2	78,7
4	+1 (37,98)	+1 (15,95)	-1 (2,81)	53,4	64,5
5	-1 (32,02)	-1 (4,05)	+1 (5,19)	114,7	67,4
6	+1 (37,98)	-1 (4,05)	+1 (5,19)	86,2	73,1
7	-1 (32,02)	+1 (15,95)	+1 (5,19)	49,3	171,0
8	+1 (37,98)	+1 (15,95)	+1 (5,19)	69,6	51,3
9	-1,68 (30,0)	0 (10)	0 (4)	80,5	70,4
10	+1,68 (40,0)	0 (10)	0 (4)	165,7	98,4
11	0 (35)	-1,68 (0,0)	0 (4)	63,0	124,1
12	0 (35)	+1,68 (20,0)	0 (4)	29,9	189,0
13	0 (35)	0 (10)	-1,68 (2)	64,8	86,0
14	0 (35)	0 (10)	+1,68 (6)	59,7	91,5
15	0 (35)	0 (10)	0 (4)	128,0	70,0
16	0 (35)	0 (10)	0 (4)	144,3	78,4
17	0 (35)	0 (10)	0 (4)	125,9	81,6

Fonte: Do Autor (2023).

De acordo com o observado na Tabela 3, o ensaio 10 apresentou maior massa para o extrato acetato de etila (165,7 mg) e os ensaios 7, 12 com maiores massas para os extratos clorofórmio (171,0 e 189,0 mg, respectivamente). Com os dados obtidos a partir da Tabela 3 foi realizado o teste de aderência de Shapiro-Wilk para ambas as respostas de massas de extratos, os quais indicaram uma população normal, sendo possível realizar análise estatística.

#### 4.2.1 Avaliação estatística para os extratos clorofórmio

Com a obtenção das massas dos extratos provenientes da extração com clorofórmio foi possível calcular os coeficientes de regressão, nos quais os termos: linear  $x_2$  (maltose), quadrático  $x_2^2$  (maltose) e as interações entre as variáveis  $x_1.x_2$  (glicose e maltose) e  $x_1.x_3$  (glicose e número de inóculos) foram significativos para um nível de significância de 5%, isto é,  $p < 0,05$ , sendo que o termo linear  $x_3$ , considerado não significativo, foi utilizado para o ajuste do modelo. O termo das interações  $x_1.x_3$  e  $x_1.x_2$  apresentaram valores negativos indicando perda de rendimento do processo com a mudança de nível do menor para o maior. Os coeficientes de regressão para as variáveis encontram-se na Tabela 4.

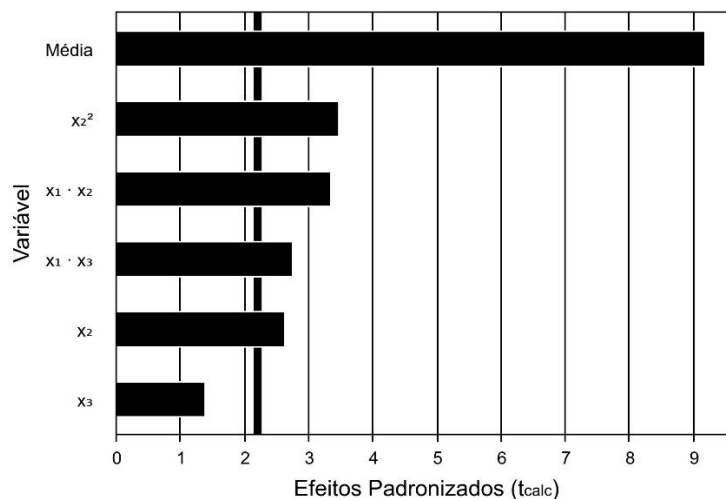
Tabela 4 - Coeficientes de regressão obtidos para o DCCR para os extratos de clorofórmio, usando um nível de significância de 5%.

	<b>Coeficientes</b>	<b>Erro padrão</b>	<b>p-valor</b>
<b>Média</b>	70,47	7,67	0,0000
$x_2$	16,51	6,30	0,0239
$x_2^2$	22,41	6,45	0,0052
$x_3$	8,80	6,30	0,1903
$x_1.x_2$	-27,56	8,24	0,0065
$x_1.x_3$	-22,59	8,24	0,0191

Fonte: Do Autor (2023).

Foi construído o Diagrama de Pareto (Figura 7) ilustrando os valores observados na Tabela 4, considerando-se o nível de significância de 5%.

Figura 7 - Efeitos padronizados em função das variáveis, considerando alfa = 5 % - Diagrama de Pareto.



Fonte: Do Autor (2023).

Para o cálculo da ANOVA (Tabela 5) foram utilizadas todas as interações significativas e o termo linear  $x_3$  para o ajuste do modelo ( $p > 0,05$ ). Desta forma, foi gerada a Equação 1, cujo valor de  $R^2$  foi de 0,78, indicando que ele descreve 78% dos dados experimentais e que pode ser utilizado para a construção de superfícies de resposta.

Equação 1:  $Y = 70.47 + 16.51 x_2 + 22.41 x_2^2 + 8.80 x_3 - 27.56 x_1 x_2 - 22.59 x_1 x_3$ , no qual o valor de Y indica a massa do extrato  $CHCl_3$ .

Tabela 5 - ANOVA para o DCCR, considerando alfa = 5 %.

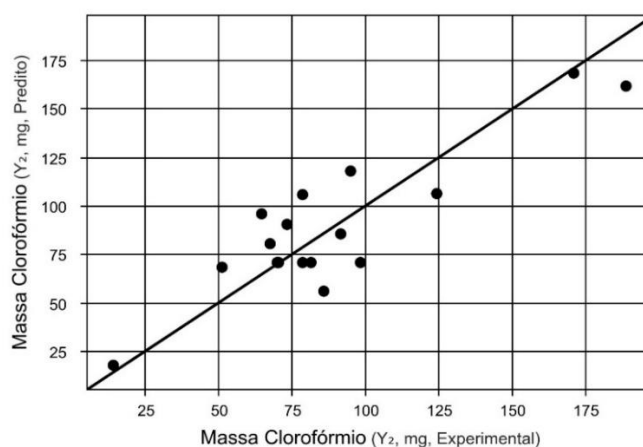
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	F calc	valor p
<b>Regressão</b>	21480,8	5	4296,2	7,9	0,0022
<b>Residual</b>	5968,9	11	542,6		
<b>Falta de ajuste</b>	5897,1	9	655,2	8,3	0,0529
<b>Erro puro</b>	71,8	2	35,9		
<b>Total</b>	27449,7	16			

$R^2=0,78$ ;  $F_{5:11;0,5} = 3,20$

Fonte: Da Autor (2024).

De acordo com a Tabela 5, o valor para  $F_{\text{calc}}$  foi de 7,9, sendo maior que o  $F_{\text{tab}} = 3,2$  e indicando que o modelo está adequado, o que possibilitou a construção dos gráficos de superfície de resposta. Os resultados experimentais referentes a esse estudo e os resultados preditos pelo modelo estatístico foram plotados no gráfico presente na Figura 8, facilitando sua visualização e comparação.

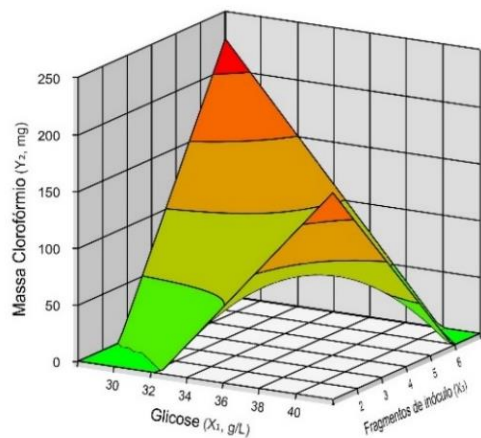
Figura 8 - Resultados experimentais (eixo x) e preditos (eixo y) em relação às massas dos extratos clorofórmio.



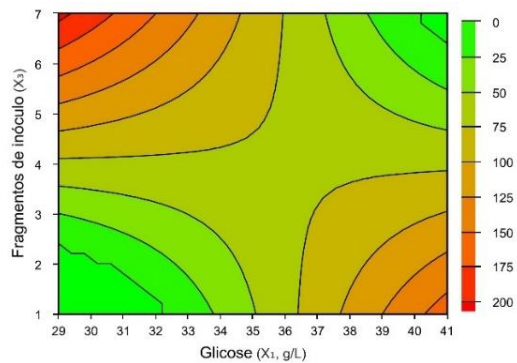
Fonte: Do Autor (2023).

Com a utilização da ferramenta estatística do planejamento experimental foi possível determinar as melhores quantidades das variáveis independentes para a produção de maior quantidade de extrato clorofórmio. Na Figura 9 estão desenhadas as superfícies de resposta e as curvas de contorno para o modelo de produção de massa de extrato clorofórmio, considerando-se as variáveis independentes glicose ( $x_1$ ), maltose ( $x_2$ ) e número de inóculos ( $x_3$ )

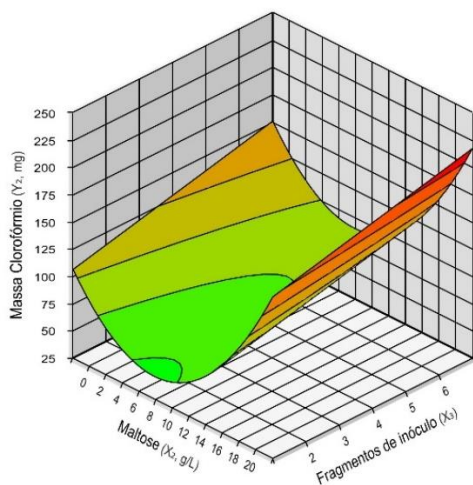
Figura 9 - Superfícies de resposta e curva de contorno para as massas dos extratos clorofórmio.



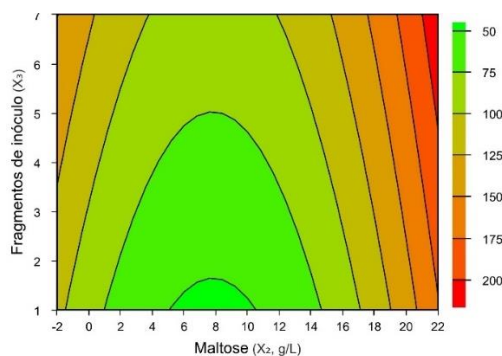
(a)



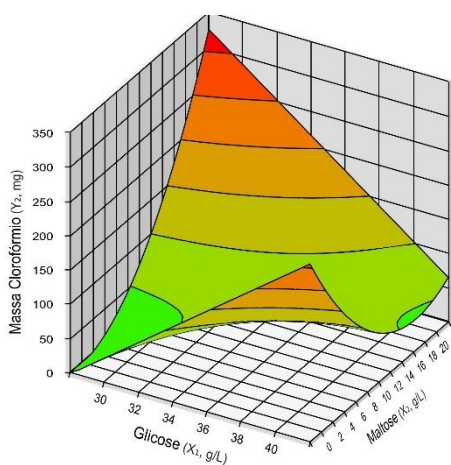
(b)



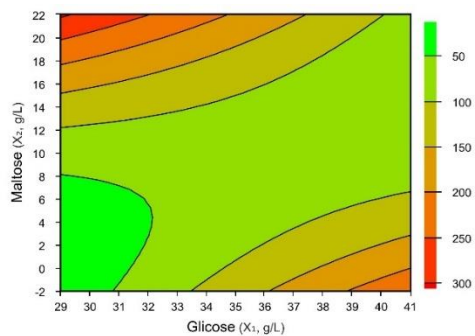
(c)



(d)



(e)



(f)

Fonte: Do autor, (2024).

Legenda:

- (a) Superfícies de resposta: glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) x número de fragmentos de inóculos.
- (b) Curva de contorno: glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) x número de fragmentos de inóculos.
- (c) Superfícies de resposta: maltose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) x número de fragmentos de inóculos.
- (d) Curva de contorno: maltose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) x número de fragmentos de inóculos.
- (e) Superfícies de resposta: glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) x maltose ( $\text{g.L}^{-1}$ ).
- (f) Curva de contorno: glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) x maltose ( $\text{g.L}^{-1}$ ).

Pela análise das superfícies de resposta e curvas de contorno em função da produção de massas secas de extratos clorofórmio, verificou-se que a faixa em que pode ocorrer a produção de maiores massas de extrato clorofórmio, considerando-se todos os gráficos, para a glicose encontra-se entre 29 e 30  $\text{g.L}^{-1}$ , para a concentração de maltose entre 20 e 22  $\text{g.L}^{-1}$  e para o número de fragmentos de inóculos entre 4 e 6.

O modelo estatístico foi validado com a realização de ensaios nas condições: 33  $\text{g.L}^{-1}$  glicose, 21  $\text{g.L}^{-1}$  maltose e 5 fragmentos. Os ensaios foram realizados em triplicata e foram obtidos os extratos clorofórmio e acetato de etila, dos quais foram avaliadas as atividades antimicrobiana e antioxidante. O ensaio 12 (35  $\text{g.L}^{-1}$  glicose, 20  $\text{g.L}^{-1}$  maltose e 4 fragmentos) do planejamento também foi validado, pois apresentou a maior massa de extrato clorofórmio. Os resultados referentes às validações serão apresentados no item 4.4, pois, também foram validados experimentos que apresentaram atividade antimicrobiana promissora.

### 4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos

Os resultados referentes à atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos contra *S. aureus* estão mostrados na Tabela 6. Os valores obtidos foram comparados aos parâmetros estabelecidos por Holetz e colaboradores (2002), que sugerem a atividade antimicrobiana de um extrato vegetal como forte para CIM inferior a 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , moderada para CIM entre 100 e 500  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , fraca entre 500 e 1000  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  e inativa para valores acima de 1000  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . Essa classificação proporciona um critério objetivo para avaliar o potencial antifúngico de novos compostos.

Tabela 6 - Atividade antimicrobiana dos extratos clorofórmio e acetato de etila do cultivo de *Preussia africana* contra o patógeno *S. aureus*.

Ensaio	CIM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )	CMM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )	CIM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )	CMM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )
	<i>S. aureus</i>			
	Extratos Clorofórmio		Extratos Acetato de etila	
1	>400	>400	<b>200-400</b>	> 400
2	>400	>400	>400	> 400
3	<b>200-400</b>	<b>200-400</b>	>400	> 400
4	>400	>400	>400	> 400
5	>400	>400	>400	> 400
6	>400	>400	>400	> 400
7	400	>400	<b>100-200</b>	> 400
8	>400	>400	>400	> 400
9	>400	>400	>400	> 400
10	>400	>400	>400	> 400
11	>400	>400	>400	> 400
12	>400	>400	>400	> 400
13	>400	>400	<b>200-400</b>	> 400
14	>400	>400	>400	> 400
15	>400	>400	>400	> 400
16	>400	>400	>400	> 400
17	>400	>400	>400	> 400
<b>Amoxicilina</b>	1,56-3,125	5-10	1,56-3,125	5 - 10

Fonte: Do Autor (2024).

De acordo com a Tabela 6, nota-se que o extrato  $\text{CHCl}_3$  do ensaio 3 apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, na concentração entre 200-400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , apresentando CMM na mesma concentração, indicando seu potencial bactericida contra uma bactéria Gram-positiva. Os demais extratos clorofórmio apresentaram valores de CIM > 400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , sendo bacteriostáticos na concentração avaliada.

Quanto aos extratos em acetato de etila, os ensaios 1 e 13 apresentaram valores de CIM entre 200-400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , enquanto o extrato 7 apresentou melhor valor de CIM entre 100-200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . Os demais extratos não apresentaram atividade na concentração avaliada. Os extratos 1, 7 e 13 apresentaram atividade moderada contra *S. aureus*, segundo os critérios preconizados por Holetz e colaboradores (2002),

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos de *Preussia africana* contra as espécies de *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, e devido ao grande número

de extratos (34 no total), realizou-se um ensaio preliminar de triagem em meio sólido, utilizando o método de difusão em ágar. A difusão em ágar é uma técnica clássica usada para avaliar a sensibilidade de microrganismos a uma variedade de substâncias, incluindo antibióticos, antifúngicos e compostos naturais como os metabólitos secundários de plantas. Em placas de Petri contendo um meio de cultura sólido previamente inoculados com o microrganismo de interesse, são feitos furos no ágar e através de uma micropipeta, é aplicada uma quantidade de extrato, antibiótico ou antifúngico, o qual será analisado após um período de incubação. A substância difunde-se pelo ágar, inibindo o crescimento microbiano em uma área ao redor do furo, formando um halo de inibição. Os resultados são expressos como a média do diâmetro do halo de inibição de crescimento dos microrganismos, gerado pela difusão da amostra após incubação (Roquete *et al.*, 2018). Além de ser um método de fácil execução e que permite testar uma grande quantidade de amostras simultaneamente, possui um custo-benefício adequado, sendo possível visualizar de forma direta a atividade antimicrobiana, comparando a atividade dos diferentes extratos de forma visual e qualitativa.

Alguns extratos que apresentaram halos de inibição foram selecionados para a avaliação antifúngica por CIM. A Tabela 7 apresenta os halos dos 17 ensaios realizados referentes aos extratos AcOEt e CHCl<sub>3</sub> (em negrito halos acima de 6 mm). Os ensaios selecionados para realização da CIM foram: 2, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 13 e 16 para ambos os extratos AcOEt e CHCl<sub>3</sub>.

Tabela 7 - Medida dos halos de inibição dos extratos do *P. africana* contra espécies de *Candida*.

<b>Ensaio Clorofórmio</b>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<b>Ensaio Acetato de etila</b>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Medida dos halos de inibição expressos em milímetros (mm)							
<b>1</b>	5,00	<b>6,25</b>	5,00	<b>1</b>	5,00	<b>15,75</b>	5,00
<b>2</b>	<b>6,50</b>	<b>9,50</b>	<b>6,25</b>	<b>2</b>	<b>7,25</b>	5,00	5,00
<b>3</b>	<b>6,75</b>	5,75	<b>6,25</b>	<b>3</b>	<b>6,25</b>	5,00	5,00
<b>4</b>	<b>10,25</b>	5,75	5,75	<b>4</b>	<b>14,50</b>	5,00	5,00
<b>5</b>	<b>7,00</b>	<b>10,25</b>	<b>10,50</b>	<b>5</b>	5,00	5,00	5,00
<b>6</b>	5,75	5,00	<b>6,50</b>	<b>6</b>	5,00	5,00	5,00
<b>7</b>	<b>6,00</b>	5,50	<b>7,00</b>	<b>7</b>	<b>6,00</b>	5,00	<b>7,50</b>
<b>8</b>	5,00	<b>7,00</b>	<b>7,25</b>	<b>8</b>	5,25	5,00	5,00
<b>9</b>	5,00	5,75	5,50	<b>9</b>	5,00	5,00	<b>6,50</b>
<b>10</b>	5,00	5,00	<b>7,00</b>	<b>10</b>	5,00	<b>22,50</b>	<b>6,25</b>
<b>11</b>	<b>8,75</b>	5,75	<b>9,50</b>	<b>11</b>	5,00	5,00	5,50
<b>12</b>	5,00	5,00	<b>8,50</b>	<b>12</b>	<b>6,00</b>	5,00	5,00
<b>13</b>	<b>7,50</b>	5,00	<b>7,75</b>	<b>13</b>	5,25	5,00	5,00
<b>14</b>	<b>7,25</b>	<b>7,25</b>	5,75	<b>14</b>	5,50	5,00	5,25
<b>15</b>	5,00	5,00	<b>6,50</b>	<b>15</b>	5,00	5,00	5,75
<b>16</b>	5,00	5,00	<b>6,00</b>	<b>16</b>	5,00	5,00	5,00
<b>17</b>	5,00	5,00	<b>7,00</b>	<b>17</b>	5,00	5,00	<b>7,25</b>
<b>Fluconazol</b>	30,00	25,00	25,00	<b>Fluconazol</b>	30,00	25,00	25,00

Fonte: Do Autor (2024).

Os extratos em clorofórmio apresentaram potencial antimicrobiano contra as cepas de *Candida* testadas (Tabela 8). O ensaio 4 inibiu o crescimento de *C. albicans* e *C. glabrata* com concentrações inibitórias mínimas (CIM) entre 200 e 400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . O ensaio 5 apresentou CIM entre 100 e 200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *C. albicans*, entre 50 e 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *C. glabrata* e entre 400 e 800  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *C. tropicalis*. O ensaio 7 apresentou CIM entre 200 e 400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *C.*

*albicans*, entre 50 e 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *C. glabrata* e *C. tropicalis*, e concentração microbicida mínima (CMM) entre 400 e 800  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *C. tropicalis*. Enquanto o ensaio 10 demonstrou maior atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *C. albicans* e *C. glabrata* em concentrações de 25 a 50  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  e de *C. tropicalis* em concentrações de 100 a 200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . A concentração microbicida mínima (CMM) para *C. tropicalis* foi similar à CIM. O ensaio 11 apresentou CIM entre 400 e 800  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *C. albicans* e entre 200 e 400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Os demais ensaios do extrato  $\text{CHCl}_3$  testados mostraram-se menos potentes, com concentrações inibitórias mínimas superiores a 800  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

Tabela 8 - Atividade antimicrobiana dos extratos em clorofórmio do *Preussia africana* contra as *Candidas* após a triagem em difusão em ágar.

Amostras	CIM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )			CMM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>
2C	>800	>800	>800	>800	>800	>800
4C	200-400	200-400	>800	>800	>800	>800
5C	<b>100-200</b>	<b>50-100</b>	400-800	>800	>800	>800
7C	200-400	<b>50-100</b>	400-800	>800	>800	400-800
10C	<b>25-50</b>	<b>25-50</b>	<b>100-200</b>	>800	>800	<b>100-200</b>
11C	400-800	200-400	200-400	>800	>800	>800
12C	>800	400-800	>800	>800	>800	>800
13C	>800	400-800	>800	>800	>800	>800
16C	>800	400-800	>800	>800	>800	>800
<b>Fluconazol</b>	3,125-6,25	3,125-6,25	3,125-625	5-10	5-10	5-10

Fonte: Do Autor (2024).

Os extratos em acetato de etila apresentaram atividade antifúngica contra as espécies de *Candida* testadas (Tabela 9). Os ensaios que apresentaram pronunciada atividade antifúngica foram o 2, 4, 5, 7 e 10 contra *C. glabrata* com CIM entre 50 e 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . Os mesmos ensaios, exceto o ensaio 7, também apresentaram atividade contra *C. albicans* com CIM entre 100 e 200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , dentre esses, os ensaios 4, 7 e 10 apresentaram ação fungicida contra, pelo menos, um dos patógenos avaliados, sendo o mais pronunciado o ensaio 10, que apresentou ação fungicida contra *C. glabrata* com MMC entre 50 e 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

Em estudo realizado por Vieira *et al.*, (2014), espécies do gênero *Preussia* se destacaram entre diversos fungos endofíticos por sua potente atividade antimicrobiana. Por exemplo, o

extrato fúngico do *Preussia africana* apresentou uma concentração inibitória mínima (CIM) de 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  contra *Paracoccidioides brasiliensis*. A espécie *P. pseudominima* mostrou CIM de 71  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  contra *Candida tropicalis* e 74  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  contra *Candida neoformans*. Além disso, em concentrações de 98 e 75  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , respectivamente, essa mesma espécie inibiu o crescimento de *P. brasiliensis* e *Cryptococcus gattii*.

Os resultados dessa pesquisa mostram que os extratos fúngicos obtidos a partir do *P. africana* apresentam uma potente atividade antifúngica contra algumas espécies de *Candida*. Ao comparar os resultados deste trabalho, com os de Vieira *et al.*, (2014), observou-se que os valores de CIM obtidos para alguns extratos foram inferiores aos encontrados para *P. africana* e *P. pseudominima* no trabalho de Vieira *et al.*, (2014) sugerindo uma atividade antifúngica ainda mais potente. No entanto a utilização de diferentes solventes de extração pode ter influenciado os resultados, uma vez que o clorofórmio e o acetato de etila apresentam diferentes polaridades e conseqüentemente, extraem diferentes classes de compostos.

Tabela 9 - Atividade antimicrobiana dos extratos em acetato de etila do *Preussia africana* contra as *Candidas* após a triagem em difusão em ágar.

Amostras	CIM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )			CMM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>
<b>2A</b>	<b>100-200</b>	<b>50-100</b>	400-800	>800	>800	>800
<b>4A</b>	<b>100-200</b>	<b>50-100</b>	200-400	100-200	>800	200-400
<b>5A</b>	<b>100-200</b>	<b>50-100</b>	200-400	>800	>800	>800
<b>7A</b>	200-400	<b>50-100</b>	200-400	200-400	>800	>800
<b>10A</b>	<b>100-200</b>	<b>50-100</b>	200-400	>800	50-100	>800
<b>11A</b>	400-800	400-800	>800	>800	>800	>800
<b>12A</b>	400-800	400-800	>800	400-800	>800	>800
<b>13A</b>	200-400	400-800	400-800	>800	>800	400-800
<b>16A</b>	400-800	200-400	>800	>800	>800	>800
<b>Fluconazol</b>	3,125-6,25	3,125-625	3,125-625	5-10	5-10	5-10

Fonte: Do Autor (2024).

#### 4.4 Ensaios de validação

Alguns ensaios foram utilizados para validação dos experimentos quanto suas massas e suas atividades antimicrobianas. Para os ensaios de validação de massa foi escolhido o ensaio 12 (35g/L de glicose, 20 g/L maltose e 4 fragmentos) e PO (ponto ótimo) obtida após a

realização do planejamento experimental, com exceção da glicose, que foi inserida em maior quantidade, por interpretação inadequada dos gráficos (33 g/L de glicose, 21 g/L maltose e 5 fragmentos). Já os ensaios 7 e 10 foram escolhidos devido sua promissora atividade antimicrobiana, esses extratos também foram avaliados quanto suas massas. Após o cultivo do fungo, os caldos dos ensaios de validação foram filtrados e particionados em clorofórmio e acetato de etila, suas massas foram obtidas. Todos os extratos e ensaios escolhidos para as validações foram avaliados quanto suas atividades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e contra as espécies de *Candida*.

Todos os ensaios de validação foram realizados em triplicata. Os resultados estão agrupados da seguinte forma: na Tabela 10 estão todas as massas dos extratos (CHCl<sub>3</sub> e AcOEt), enquanto na Tabela 11 estão as atividades antimicrobianas (CIM e MMC) contra *S. aureus* e *E. coli*, e na Tabela 12 contra as espécies de *Candida*, para os quatro extratos validados.

Tabela 10 - Ensaios de validação, variáveis usadas no meio de cultivo e massas dos extratos (mg).

Ensaios	Nível (Valor real)			Resposta (mg)	
	x <sub>1</sub> (glicose)	x <sub>2</sub> (maltose)	x <sub>3</sub> (inóculo)	Massa AcOEt (Y)	Massa Clorof. (Y)
PO1	(33)	(21)	(5)	120,1	122,1
PO2	(33)	(21)	(5)	123,5	117,3
PO3	(33)	(21)	(5)	121,0	124,6
12.1	(35)	(20)	(4)	64,0	197,6
12.2	(35)	(20)	(4)	47,2	189,4
12.3	(35)	(20)	(4)	50,8	191,0
7.1	(32)	(16)	(5)	106,4	133,9
7.2	(32)	(16)	(5)	109,2	137,6
7.3	(32)	(16)	(5)	80,5	117,6
10.1	(40)	(10)	(4)	73,3	87,7
10.2	(40)	(10)	(4)	75,8	97,7
10.3	(40)	(10)	(4)	76,8	81,4

Fonte: Do Autor (2024).

A Tabela 10 apresenta os resultados da validação dos ensaios, de acordo com a massa obtida para cada extrato, o ensaio PO não apresentou diferenças significativas entre as massas dos extratos obtidos com clorofórmio e acetato de etila. O ensaio 12 que apresentou a maior massa no planejamento de experimentos para o extrato em clorofórmio, manteve o comportamento na validação, porém, apresentou maior variabilidade nas massas das triplicatas em acetato de etila. Os ensaios 7 e 10, selecionados por sua proeminente atividade antimicrobiana, apresentaram comportamentos distintos na etapa de validação. O ensaio 7 exibiu um aumento nas massas nos experimentos de validação em relação ao planejamento inicial, enquanto o ensaio 10 apresentou uma diminuição de suas massas. Os ensaios 7 e 10, selecionados por sua proeminente atividade antimicrobiana, apresentaram comportamentos distintos na etapa de validação. O ensaio 7 exibiu um aumento nas massas das triplicatas em relação ao planejamento inicial, enquanto o ensaio 10 apresentou uma diminuição.

A qualidade e a quantidade dos dados utilizados em modelos preditivos exercem um papel crucial na precisão e confiabilidade das estimativas. Como apontado por Schemper (2003), amostras de pequeno porte podem resultar em estimativas instáveis e alta variabilidade, comprometendo a generalização dos resultados. Além disso, Mathai, Chen e Kichmair (2019) destacam a influência dos métodos de validação e de fatores externos, como mudanças ambientais, na variabilidade das previsões. Diante dessa complexidade, é fundamental interpretar os resultados dos modelos com cautela, reconhecendo as suas limitações.

Tabela 11 - Atividade antimicrobiana (CIM e CMM) dos extratos em clorofórmio e acetato de etila dos 4 pontos de validação contra os patógenos *S. aureus* e *E. coli*.

Amostras	CIM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )		CMM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>
<b>CHCl<sub>3</sub></b>				
<b>PO1</b>	200-400	200-400	>800	> 800
<b>PO2</b>	200-400	200-400	>800	> 800
<b>PO3</b>	200-400	200-400	>800	> 800
<b>12.1</b>	>400	200-400	>400	>400
<b>12.2</b>	>400	200-400	>400	>400
<b>12.3</b>	>400	200-400	>400	>400
<b>7.1</b>	400-800	400-800	>800	> 800
<b>7.2</b>	400-800	400-800	>800	> 800
<b>7.3</b>	400-800	200-400	>800	> 800
<b>10.1</b>	>400	200-400	>400	>400
<b>10.2</b>	>400	200-400	>400	>400
<b>10.3</b>	>400	200-400	>400	>400
<b>AcOEt</b>				

<b>PO1</b>	200-400	200-400	>800	200- 400
<b>PO2</b>	200-400	200-400	>800	200-400
<b>PO3</b>	200-400	200-400	>800	200-400
<b>12.1</b>	>400	>400	>400	>400
<b>12.2</b>	>400	>400	>400	>400
<b>12.3</b>	>400	>400	>400	>400
<b>7.1</b>	400-800	200-400	>800	> 800
<b>7.2</b>	400-800	200-400	>800	> 800
<b>7.3</b>	400-800	200-400	>800	> 800
<b>10.1</b>	>400	>400	>400	>400
<b>10.2</b>	>400	>400	>400	>400
<b>10.3</b>	>400	>400	>400	>400
<b>Amoxicilina</b>	3,125-6,25	3,125-6,25	5-10	20-40
<b>Cloranfenicol</b>	3,125-6,25	3,125-6,25	5-10	20-40

Fonte: Do Autor (2024).

O ponto ótimo tanto em clorofórmio quanto em acetato de etila apresentou CIM entre 200-400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *S. aureus* e *E. coli*, apresentando ação bactericida os extratos do ponto ótimo em acetato de etila na concentração entre 200-400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *Staphylococcus aureus*. Os ensaios 10 e 12 ( $\text{CHCl}_3$ ) apresentaram CIM entre 200-400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  contra *S. aureus*. Os ensaios 10 e 12 (AcOEt) apresentaram atividade contra o *S. aureus* e *E. coli* acima de 400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . O ensaio 7 em ambos os solventes apresentou CIM entre 400-800  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *S. aureus*. Para *E. coli* o ensaio 7 ( $\text{CHCl}_3$ ) apresentou CIM 400-800  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  e para o extrato AcOEt, apresentou CIM entre 200-400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

O estudo de Gurgel *et al.*, (2023) demonstrou o potencial do fungo endofítico *Botryosphaeria mamane CF3-13*, isolado da planta medicinal amazônica *Arrabidaea chica*, na produção de compostos com significativa atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Candida spp* (CIM = 0,312  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ). Os autores observaram concentrações inibitórias mínimas (CIMs) consideravelmente menores do que as obtidas em nosso estudo. Essa diferença pode ser atribuída a diversos fatores, como a espécie de fungo, o solvente de extração utilizado e as condições de cultivo empregadas. Enquanto nosso estudo comparou a eficácia de clorofórmio e acetato de etila na extração de compostos bioativos, Gurgel *et al.*, (2023) utilizaram apenas o acetato de etila. Além disso, a diversidade de metabólitos produzidos por cada espécie fúngica e seus respectivos mecanismos de ação podem influenciar significativamente a atividade antimicrobiana dos extratos.

A pesquisa de Bettucchie; Tiscorni (2013) demonstrou a atividade antimicrobiana de extratos do *Preussia africana* contra a *Xanthomonas campestris*. Os resultados deste trabalho,

ressaltam a diversidade dos compostos produzidos pelo *P. africana* e sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas, incluindo *X. campestris* e a *E. coli* que foi analisada neste trabalho. Alguns estudos na literatura demonstram o potencial do gênero *Preussia* na produção de compostos antifúngicos. Por exemplo, Noumeur *et al.*, (2017) isolaram as preussilidas A-F de *Preussia similis*, sendo a preussilida A e C as mais ativas contra *Mucor plumbeus*, com CIM de 150 e 37,5  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , respectivamente.

Tabela 12 - Atividade antimicrobiana (CIM e CMM) dos extratos em clorofórmio e acetato de etila do *Preussia africana* contra as espécies de *Candida* para os ensaios de validação.

Amostras	CIM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )			CMM ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ )		
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>
<b>CHCl<sub>3</sub></b>						
<b>PO1</b>	<b>50-100</b>	<b>25-50</b>	200-400	<b>50-100</b>	<b>25-50</b>	> 800
<b>PO2</b>	<b>50-100</b>	<b>25-50</b>	200-400	<b>50-100</b>	<b>25-50</b>	> 800
<b>PO3</b>	<b>50-100</b>	<b>25-50</b>	200-400	<b>50-100</b>	<b>25-50</b>	> 800
<b>12.1</b>	<b>25-50</b>	<b>25-50</b>	200-400	>800	>800	200-400
<b>12.2</b>	<b>25-50</b>	<b>25-50</b>	200-400	>800	>800	200-400
<b>12.3</b>	<b>25-50</b>	<b>25-50</b>	200-400	>800	>800	200-400
<b>7.1</b>	200-400	200-400	200-400	>800	>800	> 800
<b>7.2</b>	200-400	200-400	200-400	>800	>800	> 800
<b>7.3</b>	200-400	200-400	200-400	>800	>800	> 800
<b>10.1</b>	<b>50-100</b>	<b>25-50</b>	100-200	>800	>800	>800
<b>10.2</b>	<b>50-100</b>	<b>25-50</b>	100-200	>800	>800	>800
<b>10.3</b>	<b>50-100</b>	<b>25-50</b>	100-200	>800	>800	>800
<b>AcOEt</b>						
<b>PO1</b>	<b>50-100</b>	<b>50-100</b>	400-800	<b>50-100</b>	>800	>800
<b>PO2</b>	<b>50-100</b>	<b>50-100</b>	400-800	<b>50-100</b>	>800	>800
<b>PO3</b>	<b>50-100</b>	<b>50-100</b>	400-800	<b>50-100</b>	>800	>800
<b>12.1</b>	100-200	100-200	400-800	100-200	>800	400-800
<b>12.2</b>	100-200	100-200	400-800	100-200	>800	400-800
<b>12.3</b>	100-200	100-200	400-800	100-200	>800	400-800
<b>7.1</b>	100-200	100-200	200-400	100-200	>800	> 800
<b>7.2</b>	100-200	100-200	200-400	100-200	>800	> 800
<b>7.3</b>	100-200	100-200	200-400	100-200	>800	> 800
<b>10.1</b>	200-400	100-200	>800	>800	>800	>800
<b>10.2</b>	200-400	100-200	>800	>800	>800	>800
<b>10.3</b>	200-400	100-200	>800	>800	>800	>800
<b>Fluconazol</b>	3,125-6,25	3,125-6,25	3,125-6,25	5-10	5-10	5-10

Fonte: Do Autor (2024).

Os extratos foram avaliados contra as espécies *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (Tabela 12). Os extratos obtidos no ponto ótimo (PO) em clorofórmio apresentaram CIMs entre 25 e 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *C. albicans*, enquanto para os extratos em acetato de etila, esse valor variou entre 50 e 100  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . Esses resultados indicam que, em geral, os extratos em clorofórmio apresentaram maior atividade contra *C. albicans* quando comparados aos extratos em acetato de etila. O ensaio 12, por sua vez, mostrou-se eficaz contra *C. albicans* e *C. glabrata* em clorofórmio, com CIM entre 25 e 50  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ , entretanto, a atividade contra *C. tropicalis* foi menor tanto em clorofórmio quanto em acetato de etila.

Os extratos em clorofórmio (ensaio 7) apresentaram CIM entre 200 e 400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para todas as espécies de *Candida* testadas. Os extratos (ensaio 7) em acetato de etila apresentaram CIM entre 100 e 200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *C. albicans* e *C. glabrata*, e CMM de 100 a 200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  para *C. albicans*. Para *C. tropicalis* nos extratos em acetato de etila, a CIM ficou entre 200 e 400  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . O ensaio 10 apresentou maior atividade antifúngica contra *C. glabrata* quando o extrato foi obtido em clorofórmio, com CIM entre 25 e 50  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . No entanto, para *C. tropicalis*, a atividade foi menor, necessitando de concentrações mais elevadas para inibir o crescimento. O ensaio 12, por sua vez, mostrou-se eficaz contra *C. albicans* e *C. glabrata* em clorofórmio, com CIM entre 25 e 50  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ .

Chatterjee *et al.*, (2020) demonstraram o potencial antifúngico de extratos do fungo endofítico *Alternaria tenuissima* OE7, isolado de manjeriço, evidenciando a capacidade de inibir a proliferação de *Candida* e *Aspergillus*. Adicionalmente, esses autores observaram a inibição da formação de biofilme em *Candida albicans*. Ao comparar os resultados do presente estudo com aqueles de Chatterjee *et al.* (2020), observa-se que a diversidade de fontes botânicas e a escolha do solvente de extração influenciam significativamente a atividade antifúngica. A utilização de clorofórmio e acetato de etila permitiu a extração de compostos com diferentes polaridades, sendo que os extratos em clorofórmio demonstraram maior atividade contra *C. albicans*. Embora os valores de CIM obtidos nos dois estudos sejam comparáveis, a capacidade de inibir a formação de biofilme, evidenciada por Chatterjee *et al.*, (2020), destaca a importância de avaliar diferentes parâmetros da atividade antifúngica. Ambos os estudos corroboram o potencial dos extratos naturais como fontes de novos compostos antifúngicos, sugerindo que a diversidade química desses extratos confere a eles um amplo espectro de atividade biológica, possivelmente atuando em alvos como a permeabilidade da membrana celular, a síntese de ergosterol e processos metabólicos essenciais para o fungo.

Kharul e Darah (2019) demonstraram o potente efeito antifúngico do extrato de acetato de etila obtido do fungo endofítico *Ceratobasidium ramicola* IBRLCM127, isolado de *Curcuma mangga*. O extrato apresentou uma CIM de 2,5 mg/mL contra *Candida albicans* e exibiu efeito levedicida. Ao comparar esses resultados com os do presente estudo, observa-se que ambos indicam o potencial antifúngico de extratos fúngicos. No entanto, a CIM dos extratos avaliados neste trabalho variou entre 25 e 100 µg/mL para *C. albicans*, sugerindo diferenças na composição química e na potência dos compostos bioativos presentes. A observação do efeito levedicida por Kharul e Darah (2019) reforça a importância de investigar os mecanismos de ação dos compostos presentes nos extratos fúngicos, uma vez que a capacidade de matar as células fúngicas é crucial para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

Xu et al. (2019) isolaram as (±) preusolactonas A de *Preussia isomera*, apresentando atividade antifúngica moderada contra *Alternaria alternata* com CIM de 163,4 µM.

A produção de metabólitos secundários por um organismo vivo certamente é influenciada pela genética dele, mas sua expressão pode ser mediada também pelo ambiente no qual ele se insere. Além disso, a síntese de antimicrobianos por microrganismos é, frequentemente, causada pela exaustão de um nutriente, principalmente fontes de carbono e nitrogênio, por uma diminuição na taxa de crescimento do microrganismo ou mesmo pela adição de um indutor ao meio de cultivo (Upadhyay; Bhattacharyya & Ray, 2020).

#### **4.5 Atividade Antioxidante, teor de fenólicos e flavonoides totais**

Os extratos orgânicos acetato de etila e clorofórmio, obtidos a partir da extração líquido-líquido com o meio de cultivo do fungo *Preussia africana*, foram avaliados quanto seu potencial antioxidante, utilizando o sequestro de radicais DPPH, além de serem avaliados seus teores de fenólicos e flavonoides totais.

##### **4.5.1 Atividade antioxidante frente ao DPPH**

Para a determinação da atividade antioxidante utilizando-se o método de sequestro de radicais DPPH, foi construída uma curva de calibração utilizando-se como padrão o trolox (T). A partir do gráfico no Apêndice A foi obtida a equação  $y = -0,0045x + 0,675$  por regressão linear cujo coeficiente de regressão foi igual a 0,9983. A equação de reta permitiu o cálculo da concentração de antioxidantes presentes em cada micropoço da placa de 96 poços, expressas em concentração equivalente de trolox (µM). A partir desta concentração, calculou-

se a atividade antioxidante do extrato em equivalente de trolox por grama de extrato ( $\mu\text{molTE/g}$  extrato).

#### 4.5.2 Determinação do teor de fenólicos e flavonoides totais

Para a análise de fenólicos totais foi construída uma curva de calibração utilizando-se o ácido gálico (AG) como padrão. Foi obtida a equação  $y = 0,0057x - 0,0227$ , através da regressão linear Apêndice B, com  $R^2 = 0,9905$ . Com a equação da reta foi calculada a concentração de compostos fenólicos totais em cada micropoço expressa em equivalente de ácido gálico ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ), e ao se considerar a concentração do extrato utilizada foi possível calcular o teor de fenólicos totais expressos em microgramas de equivalente de AG por miligrama de extrato ( $\mu\text{gEAG/mg}$  extrato).

A determinação de flavonoides totais foi realizada com o auxílio da curva de calibração obtida utilizando-se como padrão a quercetina (Q). Os padrões de quercetina em diferentes concentrações geraram a equação da reta  $y = 0,1696x - 0,0389$  com  $R^2 = 0,9951$  Apêndice B. Esta equação da reta permitiu o cálculo da concentração de flavonoides totais em cada micropoço expressas em equivalente de quercetina ( $\mu\text{g. mL}^{-1}$ ), ao se considerar a concentração de cada extrato utilizada, foi possível calcular o teor de flavonoides totais expressos em microgramas de equivalente de quercetina por miligrama de extrato ( $\mu\text{gEQ/mg}$  extrato).

Abaixo encontram-se tabelados (Tabela 13) os valores de concentração correspondentes ao ensaio antioxidante frente ao DPPH e para os teores de fenólicos e flavonoides totais para ambos os extratos  $\text{CHCl}_3$  e  $\text{AcOEt}$  de todos os ensaios realizados no planejamento de experimentos.

Tabela 13 - Concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e DPPH para os extratos clorofórmio e acetato de etila após os cultivos de *Preussia africana* em diferentes meios.

Ensaio	DPPH ( $\mu\text{molTE/g}$ extrato)		Fenólicos ( $\mu\text{gGAE/mg}$ extrato)		Flavonoides ( $\mu\text{gQE/mg}$ extrato)	
	AcOEt	$\text{CHCl}_3$	AcOEt	$\text{CHCl}_3$	AcOEt	$\text{CHCl}_3$
1	145,93	201,63	51,24	25,62	0,25	0,10
2	235,11	224,59	172,53	87,50	2,03	0,41
3	257,48	198,96	81,77	19,30	0,54	0,23
4	235,11	205,63	220,95	38,54	3,74	0,07
5	200,89	262,96	52,06	220,01	0,08	0,53
6	153,19	205,63	32,29	20,82	0,27	0,09
7	258,81	267,11	83,64	201,88	0,89	0,72
8	206,22	193,63	177,56	47,85	0,08	0,10
9	189,33	237,93	123,87	48,08	1,15	0,16

10	244,89	136,30	166,83	140,48	1,86	0,47
11	132,00	124,59	186,56	206,80	0,73	0,79
12	139,85	264,74	174,51	212,41	0,65	1,41
13	237,48	274,52	186,09	78,73	0,44	0,55
14	212,00	258,96	209,72	136,97	0,79	0,29
15	205,93	264,15	212,06	127,26	1,02	0,11
16	261,93	231,26	170,19	172,53	0,66	0,32
17	258,81	267,56	167,79	147,15	0,84	1,09

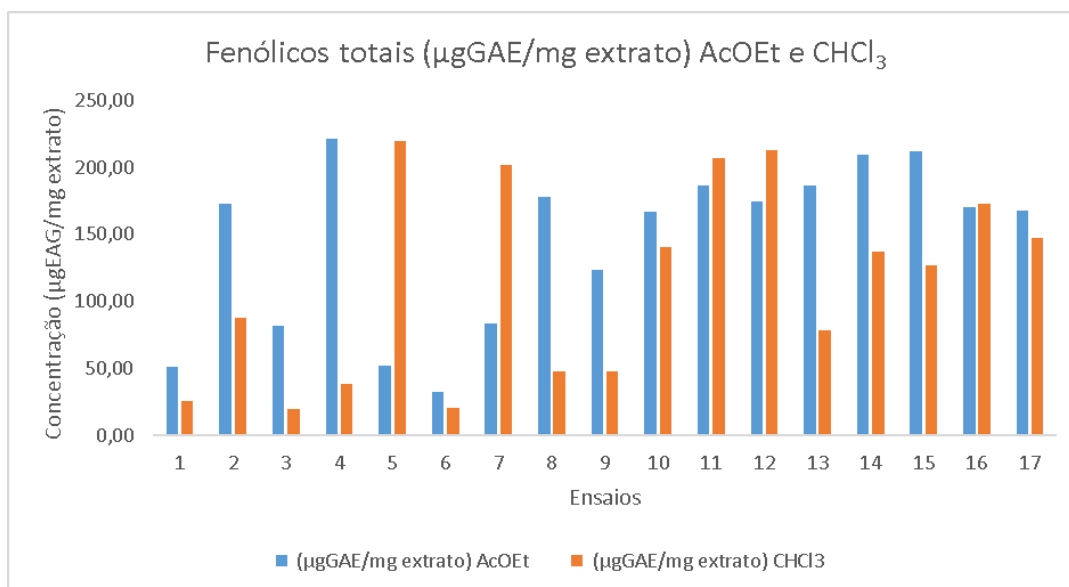
Fonte: Do Autor (2024).

De acordo com a Tabela 13, observou-se que dentre os ensaios dos extratos AcOEt, os que apresentaram maiores valores para teor de fenólicos totais foram os ensaios 4 e 15 (220,9 e 212,1  $\mu\text{gGAE/mg}$  extrato), enquanto para os flavonoides o maior valor foi o do ensaio 4 (3,7  $\mu\text{gQE/mg}$  extrato). O maior valor encontrado para a atividade antioxidante frente ao DPPH foi para o ensaio 16 com 261,9  $\mu\text{molTE/g}$  extrato. Os ensaios 4 e 15 também apresentaram valores significativos de atividade frente ao DPPH, o que corrobora a presença de fenólicos totais elevada.

Para os ensaios dos extratos  $\text{CHCl}_3$ , o maior valor encontrado para fenólicos foi para o ensaio 5 (220,0  $\mu\text{gGAE/mg}$  extrato), para flavonoides foi o ensaio 12 (1,4  $\mu\text{gQE/mg}$  extrato), enquanto para o DPPH foi o ensaio 13 (274,5  $\mu\text{molTE/g}$  extrato). O ensaio 5 também apresentou valor de DPPH elevado (262,9  $\mu\text{molTE/g}$  extrato) corroborando novamente a presença de fenólicos, uma vez que a atividade frente ao DPPH pode estar relacionada a grupos fenólicos presentes nas moléculas (Moazzen *et al.*, 2022), porém, deve-se considerar que não apenas os compostos fenólicos podem gerar atividade antioxidante (Zhou *et al.*, 2023).

Para uma melhor visualização dos resultados apresentados na Tabela 13, os valores de atividades relacionadas ao DPPH, presença de fenólicos totais e flavonoides, foram apresentados através de gráficos de barras para facilitar a comparação entre os resultados obtidos. Comparou-se a quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos acetato de etila e clorofórmio para cada ensaio do planejamento experimental (Figura 10).

Figura 10 - Gráfico de barras apresentando as concentrações de fenólicos totais para todos os ensaios referentes aos extratos de acetato de etila (em azul) e clorofórmio (em laranja) de *Preussia africana*.

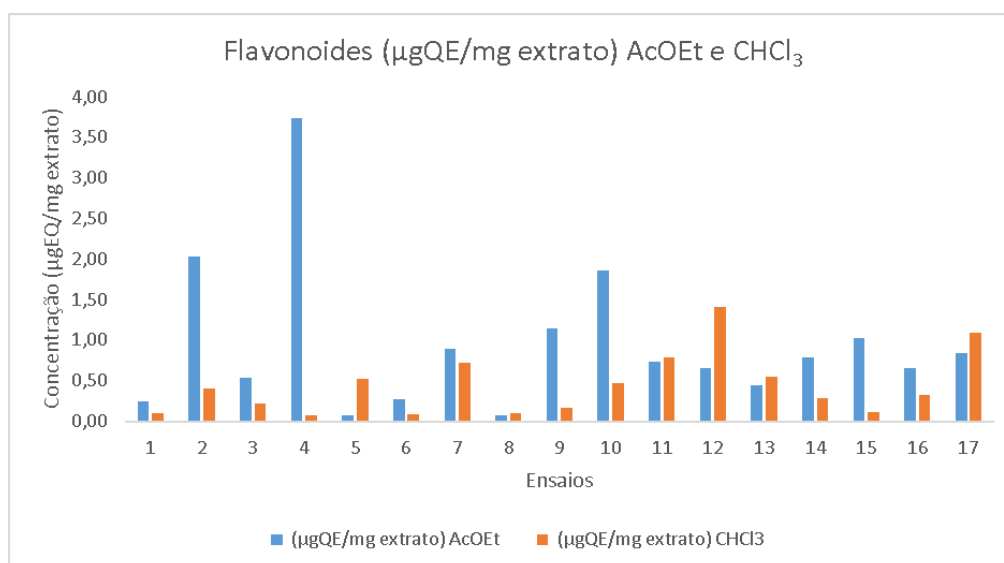


Fonte: Do Autor (2024).

É possível observar que os maiores valores de teores de fenólicos totais são para os ensaios 4, 14 e 15 dos extratos AcOEt e para os ensaios 5, 7, 11 e 12 dos ensaios CHCl<sub>3</sub>.

Os teores de flavonoides totais para todos os ensaios dos extratos (CHCl<sub>3</sub> e AcOEt) foram inferiores quando comparados aos valores de fenólicos totais. Na Figura 11 podem ser observadas maiores quantidade de flavonoides totais para extratos AcOEt, dentre eles, os ensaios 4 e 2 com maiores valores 3,74 e 2,03 µgEQ/mg extrato, respectivamente.

Figura 11 - Gráfico de barras com os teores de flavonoides totais dos extratos AcOEt (em azul) e CHCl<sub>3</sub> (em laranja) de *Preussia africana*.



Fonte: Do Autor (2024).

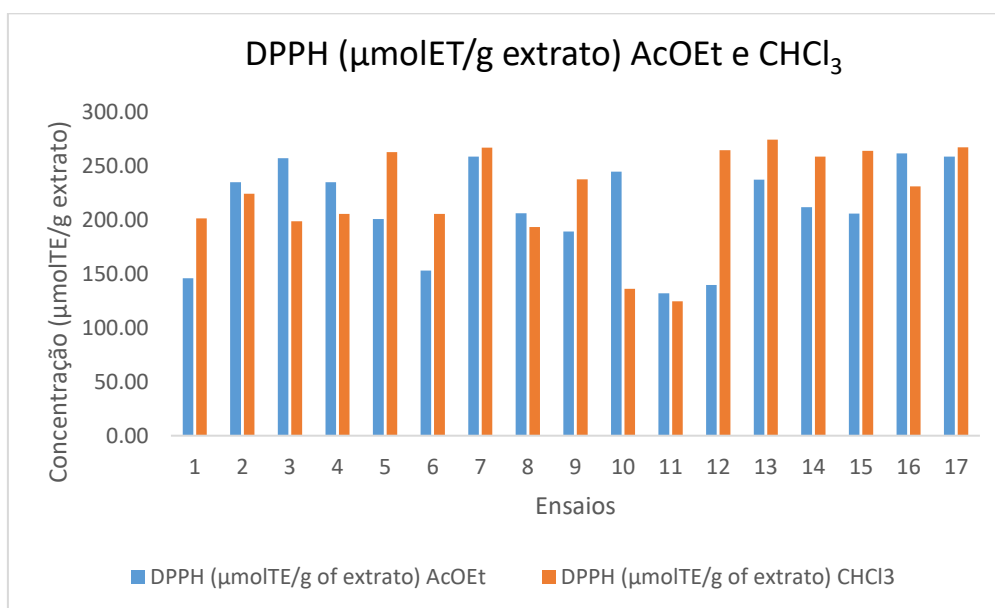
De acordo com o trabalho apresentado por Gupta *et al.*, (2023), alguns estudos têm mostrado que os fungos endofíticos são capazes de produzir uma grande variedade de compostos com atividades antioxidantes. Alguns destes compostos já foram isolados e caracterizados, como, por exemplo, os ácidos fenólicos, as xantonas, os flavonoides, terpenoides e policetídeos, tornando a bioprospecção de fungos endofíticos uma área promissora, para a descoberta de novos compostos antioxidantes.

No trabalho realizado por Da Silva *et al.*, (2020), foram isolados cerca de 315 fungos da planta *Passiflora incarnata*, dentre eles 60 fungos foram selecionados para analisar seus constituintes químicos. Alguns dos fungos foram cultivados em meio agitado e após o cultivo seus compostos presentes no meio, foram extraídos utilizando acetato de etila e butanol. Cada extrato foi avaliado quanto aos teores de fenólicos e flavonoides totais. Os teores de fenólicos para os extratos AcOEt ficaram entre 103,62 e 208,43 µg EAG/mg extrato, enquanto os teores de flavonoides totais para os extratos AcOEt apresentaram valores entre 1,05 e 139,84 µg EQ/mg extrato. Os autores concluíram que os fungos endofíticos avaliados são capazes de produzir flavonoides, porém, em menores quantidades comparando-se aos fenólicos. No estudo do endófito *Preussia africana* observou-se o mesmo padrão, maiores quantidades de fenólicos comparados aos flavonoides, porém, poucos são os trabalhos sobre os compostos antioxidantes do fungo do gênero *Preussia*, o que torna este trabalho relevante no sentido de se investigar mais a presença desses compostos. No trabalho de Nourmeh *et al.*, 2017 por exemplo, o

*Preussia similis*, isolada da planta medicinal *Globularia alypum*, produz uma série de policetideos bicíclicos conhecidos como preussídeos A-F, esses compostos exibem propriedades de eliminação de radicais que ajudam a neutralizar os radicais livres e prevenir danos oxidativos às células. Embora não tenha sido estudado diretamente em *Preussia*, outros fungos endófitos como *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides* e *Alternaria brassicae* isoladas da árvore *Taxus wallichiana*, mostraram que o alto teor de fenóis totais e flavonoides correlaciona-se com a forte atividade antioxidante. Sugerindo que os mecanismos semelhantes podem estar presentes no gênero *Preussia* (Gauchan *et al.*, 2020).

Os extratos orgânicos (AcOEt e CHCl<sub>3</sub>) do endófito *Preussia africana* também foram avaliados quanto ao potencial antioxidante, nos quais foram utilizados o sequestro de radicais de DPPH. Na Figura 12 é possível comparar os valores obtidos para a avaliação do sequestro de radicais DPPH para todos os ensaios de ambos os extratos.

Figura 12 - Gráfico de barras comparando os valores de DPPH para extratos AcOEt (em azul) e CHCl<sub>3</sub> (em laranja) de *Preussia africana*.



Fonte: Do Autor (2024).

Ao analisar o gráfico (Figura 12) observou-se que quase todos os extratos tanto AcOEt como CHCl<sub>3</sub> apresentaram valores de DPPH elevados, a maioria com valores superiores a 200 µmolTE/g extrato, exceto para o ensaio 11 que apresentou os menores valores para DPPH em ambos os extratos (132,0 µmolTE/g extrato AcOEt e 124,6 µmolTE/g extrato CHCl<sub>3</sub>). Também, se observou que o ensaio 11 foi o único dentre os 17 ensaios do planejamento, no

qual não foi inserido, como fonte de carbono, a maltose, podendo, sua falta estar relacionada à diminuição na produção de compostos que apresentam capacidade em sequestrar o radical DPPH. Porém, ao se analisar o teor de fenólicos totais, o ensaio 11 apresenta quantidades de fenólicos comparáveis aos ensaios com maiores valores de fenólicos totais e que na avaliação contra o DPPH apresentaram capacidade de sequestro de radicais DPPH maiores em relação ao ensaio 11.

A otimização do meio de cultivo de um microrganismo era realizada, antes da década de 70, usando métodos clássicos, que eram caros, demorados, além, de serem necessários muitos experimentos para se obter uma condição adequada para bons rendimentos da substância alvo. No entanto, com o aprimoramento do uso da estatística moderna, a otimização do meio se tornou mais eficaz e rápida em fornecer resultados. Para projetar um meio de produção, as condições de fermentação mais adequadas (pH, temperatura, velocidade de agitação etc.) e os nutrientes apropriados do meio (por exemplo, carbono, nitrogênio etc.) devem ser identificados e otimizados para se conseguir melhores rendimentos. Neste sentido, a fonte de carbono, um dos componentes mais importantes do meio, é fundamental como fonte de energia para o microrganismo, para seu crescimento, e para que ele produza os metabólitos, tanto primários para sua sobrevivência, como os secundários, que podem atuar em sua proteção em relação ao ambiente onde vive. Assim, a taxa na qual a fonte de carbono é metabolizada pode interferir na formação de biomassa e/ou na produção de metabólitos primários ou secundários. Além da taxa de assimilação da fonte de carbono pelo microrganismo, a natureza da fonte de carbono também pode influenciar no tipo e na quantidade da substância biossintetizada (Singh *et al.*, 2017). Um nutriente rapidamente metabolizado, como a glicose, pode permitir elevadas taxas de crescimento celular, em contrapartida pode inibir a produção de muitos metabólitos secundários (Marwick *et al.*, 1999).

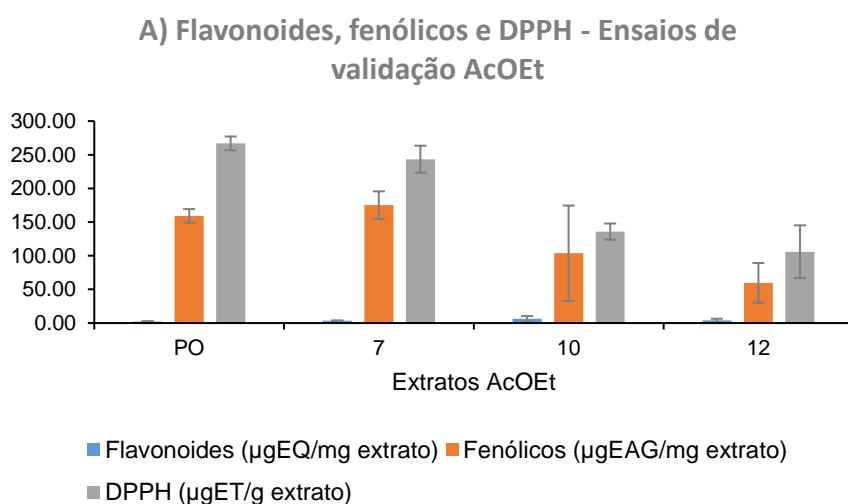
De acordo com Marwick *et al.*, (1999), ao se estudar a produção de antibióticos por bactérias marinhas, foi observado que fontes de carbono de assimilação lenta, como a galactose, faziam aumentar a produção de antibióticos. O mesmo ocorria na produção de penicilina, na qual a glicose apresentava um efeito de inibição na produção do antibiótico. A partir de mais estudos, descobriu-se que a lactose se apresentava como uma fonte alternativa de carbono, de assimilação lenta, o que ajudava na produção do antibiótico, portanto, para o processo de produção de penicilina foi estabelecido o uso da lactose durante a fermentação.

4.5.3 Determinação do teor de fenólicos totais, flavonoides totais e DPPH para os pontos de

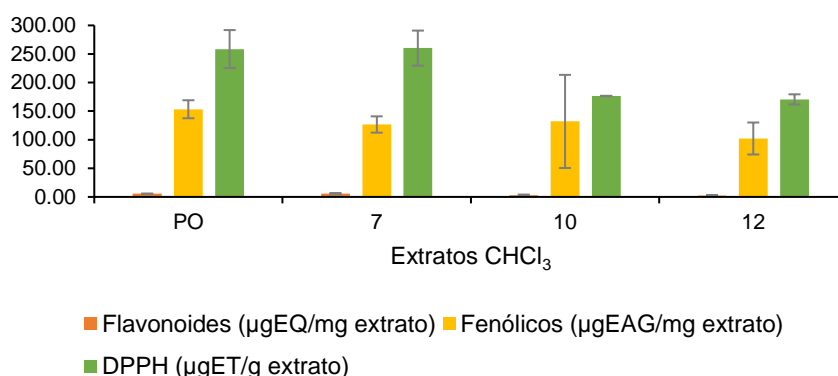
validação.

Os ensaios utilizados para validação de massas para  $\text{CHCl}_3$  (PO e ensaio 12) e para atividade antimicrobiana (ensaios 7 e 10) também foram avaliados quanto aos teores de fenólicos e flavonoides totais e quanto à capacidade de sequestrar os radicais DPPH. Foram avaliados ambos os extratos  $\text{CHCl}_3$  e AcOEt em triplicata. Os valores obtidos se encontram no Apêndice C. A Figura 13 A e B apresentam os gráficos em barras juntamente com os desvios calculados para as triplicatas dos pontos utilizados para validação para ambos os extratos orgânicos.

Figura 13: A) Gráfico de barras apresentando as concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e DPPH para os ensaios de validação referentes aos extratos de AcOEt obtidos de *Preussia africana*. B: Gráfico de barras apresentando as concentrações de fenólicos totais, flavonoides totais e DPPH para os ensaios de validação referentes aos extratos de  $\text{CHCl}_3$  obtidos de *Preussia africana*.



### B) Flavonoides, fenólicos e DPPH - Ensaios de validação CHCl<sub>3</sub>



Fonte: Do Autor (2024).

Quanto aos ensaios de validação, a quantidade de flavonoides totais apesar de ter aumentado para alguns ensaios da validação em relação aos valores obtidos no planejamento de experimentos, continuaram inferiores quando comparadas aos fenólicos totais, como é possível observar nos gráficos da Figura 13 A e B.

Segundo os autores Muthukrishnan *et al.*, 2022, e Tian *et al.*, 2017 os fungos endofíticos isolados de *Opisthoppappus taihangensis*, estudados por eles, apresentaram capacidade em produzir diferentes flavonoides, indicando que as condições de cultivo podem influenciar significativamente o perfil e a quantidade de flavonoides produzidos. Os autores concluíram que os fungos endofíticos provenientes de *O. taihangensis* apresentaram um grande potencial biotecnológico para a produção desses compostos de alto valor agregado (Muthukrishnan *et al.*, 2022; Tian *et al.*, 2017).

Com a análise dos gráficos é possível notar que os ensaios referentes ao ponto ótimo (PO) em relação aos teores de fenólicos totais indicaram valores muito próximos aos obtidos no planejamento de experimentos (Validação: 159,2 e 153,3 µgGAE/mg extrato, para AcOEt e CHCl<sub>3</sub>, respectivamente). Isso foi observado para os valores médios encontrados para o sequestro de radicais DPPH (Validação: 266,9 e 258,6 µgET/g extrato, para AcOEt e CHCl<sub>3</sub>, respectivamente). Para o ensaio 12, para o extrato CHCl<sub>3</sub> os valores encontrados para o DPPH também ficaram próximos ao esperado (Validação: 170,6 µgET/g extrato) enquanto para o extrato AcOEt os 3 valores encontrados foram totalmente diferentes para a triplicata e inferiores ao mesmo ensaio do planejamento. As quantidades de fenólicos do mesmo extrato também foram inferiores aos primeiros experimentos, se destacando o extrato AcOEt. Para os ensaios 7 e 10 escolhidos para validação devido sua atividade antimicrobiana, os valores encontrados

para DPPH (ensaio 7) foram próximos aos primeiros experimentos realizados no planejamento experimental. Enquanto, para o ensaio 10 os valores obtidos nos ensaios de validação foram discrepantes dos obtidos no planejamento, sendo difícil para comparação.

O potencial antioxidante de um extrato não pode ser previsto com apenas um único ensaio antioxidante. Vários métodos são necessários para avaliar as atividades antioxidantes e, neste trabalho, apenas foi avaliada a capacidade de sequestro de radicais DPPH, frente aos extratos obtidos por diferentes fermentações do endófito *Preussia*. Embora o ensaio de DPPH seja o mais utilizado, variáveis como a presença de luz, a razão radical DPPH/antioxidante, a presença de oxigênio, o pH e o tipo de solvente podem afetar a precisão dos resultados (Yeo *et al.*, 2019). Interessante destacar que nem sempre a molécula com maior número de grupos hidroxila ligados ao anel aromático, irá apresentar maior capacidade de sequestro de radicais DPPH. Algumas substâncias como o ácido carnósico, que possui dois grupos hidroxila fenólicos apresentou uma capacidade antioxidante maior do que o ácido rosmariniano com quatro grupos hidroxila fenólicos (Erkan *et al.*, 2008).

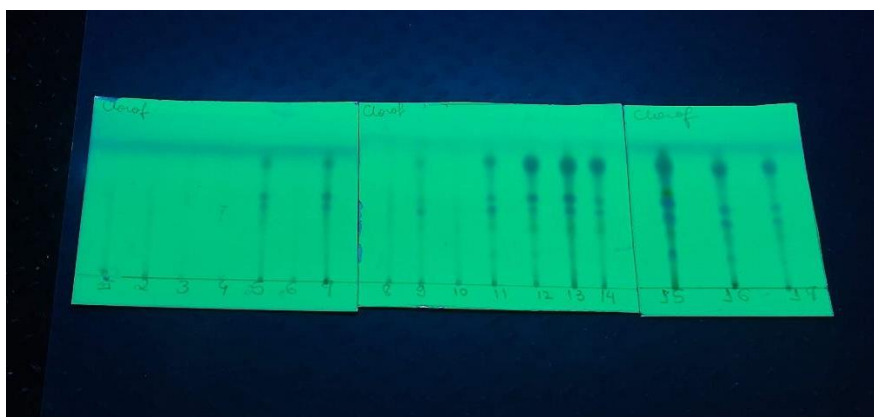
O mecanismo de ação dos antioxidantes pode ser diferente entre os compostos. Ao avaliar a relação estrutura-atividade dos antioxidantes fenólicos, sugere-se que a substituição na posição *para* com um grupo etil ou n-butil no lugar de um grupo metil no anel fenólico, proporciona uma melhoria na atividade antioxidante (Gordon, 1990). A presença de vários grupos hidroxila também pode contribuir para o aumento desta atividade, da mesma forma, que a presença de um segundo grupo hidroxila na posição *orto* ou *para* (derivado de 1,2-dihidroxibenzeno) como no caso das moléculas catecol e hidroquinona, que fazem com que ocorra melhor eficiência de sequestro de radicais (Heijnen *et al.*, 2001). Já em derivados de dihidroxibenzeno, a atividade antioxidante aparece devido ao radical semiquinoide, inicialmente produzido, podendo originar uma quinona. Além disso, a presença de um grupo carbonila no anel C e a ligação dupla em um flavonoide pode melhorar a estabilidade de seu radical, aumentando sua atividade (Heim *et al.*, 2002). Outro fator que pode atuar na atividade antioxidante é a própria concentração do antioxidante, a qual pode ser afetada de maneira inversa, isto é, em maiores concentrações, os antioxidantes fenólicos geralmente perdem sua atividade e agem como pró-oxidantes, facilitando as reações de iniciação de radicais (Moazzen *et al.*, 2020).

#### 4.6 Avaliação química dos extratos através da cromatografia em camada delgada

Todos os extratos AcOEt e CHCl<sub>3</sub> foram analisados por CCD, vários eluentes foram testados, e o que melhor separou alguns constituintes dos extratos foi a mistura CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1, v:v).

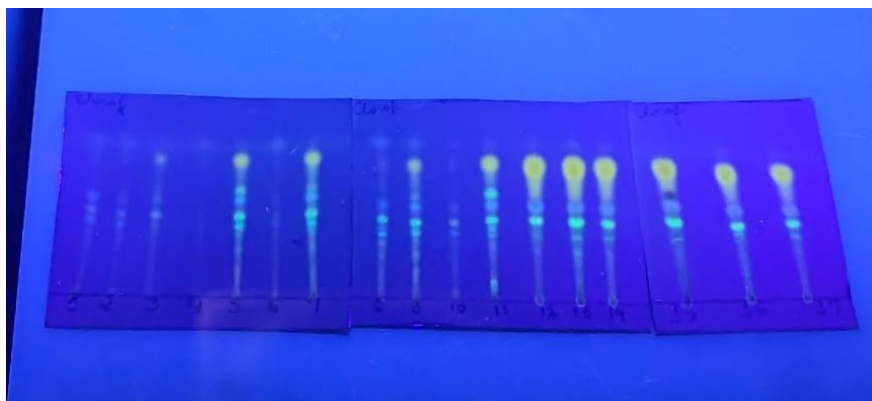
Os extratos CHCl<sub>3</sub>, Figuras 14 e 15 mostraram que os ensaios 5, 7, 11-17 apresentaram manchas mais intensas comparando-se aos demais extratos sob a presença da luz UV em 254 e 365 nm, indicando a presença de substâncias com grupos cromóforos e fluorescentes, respectivamente. Compostos com maior valor de R<sub>f</sub> emitiram luz amarela enquanto compostos com menores valores de R<sub>f</sub> emitiram luz em tonalidades azuladas. Também foi possível observar manchas marrons/acinzentadas reveladas com FeCl<sub>3</sub>, indicando a presença de grupos fenólicos (ensaios 12-17). A identificação da presença de compostos fenólicos, evidenciada pela reação com FeCl<sub>3</sub>, corrobora os resultados quantitativos. Com os reveladores ácido fosfomolibdico e anisaldeído, foi possível observar manchas azuladas (ensaios 5, 9, 11-17) e manchas alaranjadas (ensaios 5,11, 13, 15), respectivamente. As CCDs referentes aos reveladores FeCl<sub>3</sub>, ácido fosfomolibdico e anisaldeído encontram-se no Apêndice D.

Figura 14 – Extratos em clorofórmio (ensaios 1-17) revelados sob a luz UV 254 nm (Eluente: CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1, v:v)).



Fonte: Do Autor (2024).

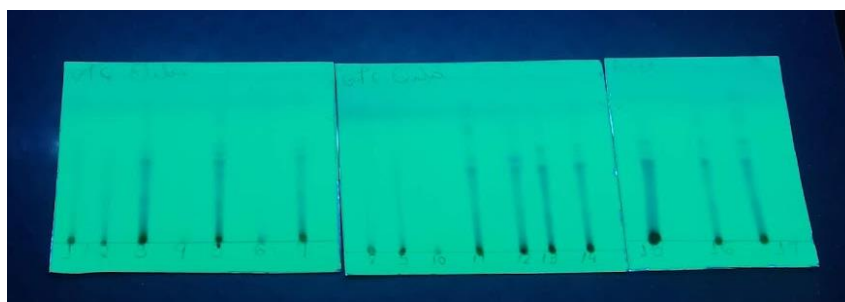
Figura 15 - Extratos em clorofórmio (ensaios 1-17) revelados sob a luz em 365 nm (Eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1, v:v)).



Fonte: Do Autor (2024).

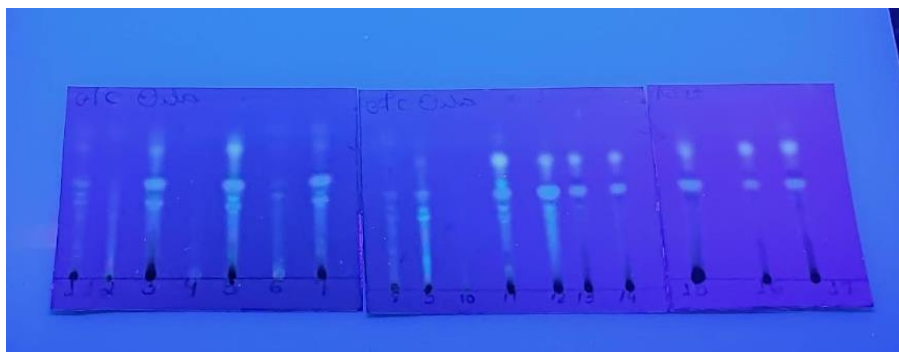
Já para os extratos AcOEt, figuras 16 e 17 os ensaios 3, 5, 7, 9, 11-17 apresentaram as manchas mais intensas sob a luz UV em 254 e 365 nm. Foi possível observar manchas acinzentadas nos mesmos ensaios reveladas com  $\text{FeCl}_3$ , que corrobora os resultados quantitativos e sugere que esses extratos possuem um alto potencial antioxidante devido à presença de fenólicos. As revelações com ácido fosfomolibdico, que indicam a presença de substâncias redutoras, e com anisaldeído que pode indicar a presença de açúcares, terpenos e esteróides apresentaram maior intensidade no ponto de origem. O eluente utilizado não foi capaz de eluir esses compostos mais polares que revelaram com estes reveladores químicos Apêndice E.

Figura 16 - Extratos em acetato de etila (ensaios 1-17) revelados sob a luz UV 254 nm (Eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1, v:v)).



Fonte: Do Autor (2024).

Figura 17 - Extratos em acetato de etila (ensaios 1-17) revelados sob a luz UV 365 nm (Eluente: CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1, v:v)).



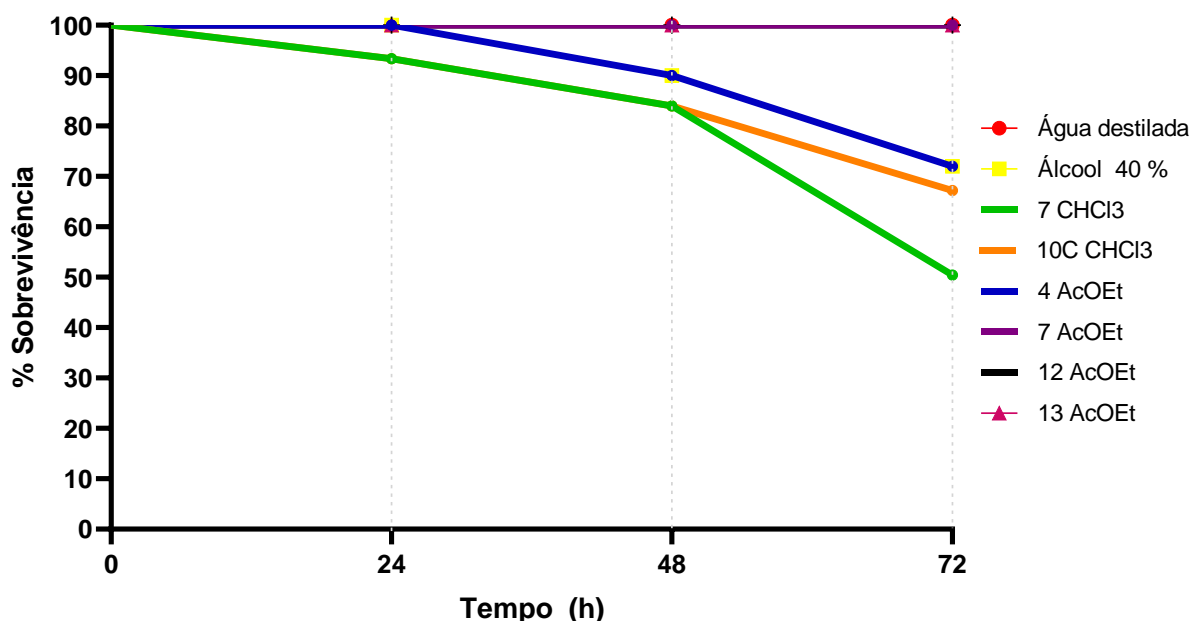
Fonte: Do Autor (2024).

#### 4.7 Avaliação de toxicidade *in vivo* no modelo sistêmico *Galleria mellonella*

Com o intuito de avaliar a toxicidade utilizou o modelo sistêmico *Galleria mellonella*, foram selecionados os ensaios 7 e 10 em CHCl<sub>3</sub> e 4, 7, 12 e 13 em AcOEt que apresentaram melhores respostas nas atividades antimicrobianas.

Avaliou-se a toxicidade dos extratos em larvas de *Galleria mellonella* na concentração de 800 µg/mL, sendo a maior concentração testada nas atividades antimicrobianas, pelo período de 24, 48 e 72 horas (Figura 18). Após 72 horas os ensaios (7, 12 e 13) em acetato de etila nenhuma larva morreu, sendo que o ensaio 7, do extrato AcOEt, demonstrou atividade antifúngica promissora contra *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, com CIM entre 200-400 µg/mL para as duas primeiras espécies e entre 50-100 µg/mL para a última. No entanto, a CMM para *C. albicans* e *C. tropicalis* foi significativamente mais alta (400-800 µg/mL), indicando um efeito predominantemente fungistático. O ensaio 13, também em acetato de etila, apresentou perfil semelhante para *C. tropicalis* (CIM e CMM entre 400-800 µg/mL). Os ensaios 4 (acetato de etila) e 10 (clorofórmio) demonstraram baixa toxicidade. A amostra 7 (clorofórmio) apresentou um perfil de toxicidade maior. Esses resultados evidenciam a complexidade da composição química dos extratos e a necessidade de estudos mais aprofundados para isolar e identificar os compostos responsáveis pelas diferentes atividades biológicas observadas. O controle de álcool 40% apresentou certa toxicidade contra as larvas, de 5 larvas 4 sobreviveram após 72 horas. De acordo com os resultados de Allegra *et al.*, (2018), os autores mostraram que de 10 larvas, 20% delas expostas ao etanol 40%, não sobreviveram.

Figura 18 - Teste de toxicidade em *Galleria mellonella* utilizando extratos de *Preussia africana*



Fonte: Do Autor (2024).

Adicionalmente o extrato com maior atividade antifúngica não apresentou toxicidade em larvas *G. mellonella*. Este modelo mostrou-se uma ferramenta valiosa para avaliar a toxicidade de extratos naturais e fármacos, devido as larvas possuírem um sistema imune inato complexo, incluindo mecanismos celulares (hemócitos) e humorais (moléculas antimicrobianas, melanização), facilidade de manejo, baixo custo comparado a modelos de mamíferos, o uso de *G. mellonella*, representa uma redução significativa nos custos com animais, alojamento e insumos, rápida obtenção de resultados e é considerado uma alternativa mais ética em relação ao uso de vertebrados. A capacidade de incubar as larvas em temperaturas semelhantes a fisiologia humana torna este modelo relevante para estudos de produtos químicos, contribuindo para minimizar a exposição humana a substâncias nocivas. (Gimarino *et al.*, 2024).

A curva de sobrevivência é o principal indicador utilizado em estudos com larvas de *G. mellonella* para avaliar a taxa de toxicidade de substâncias químicas. Ao analisar a curva, pode-se determinar quantas larvas sobrevivem ao tempo da análise, após a exposição a uma determinada substância (Tsai *et al.*, 2016; Serrano *et al.*, 2023). Os testes realizados neste estudo indicam ausência ou baixa toxicidade dos extratos, mesmo na maior concentração (800  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), sugerindo um potencial promissor para aplicações farmacológicas.

## 5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Levando-se em consideração os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que o endófito do gênero *Preussia* apresenta um grande potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos e reforça a importância da exploração da biodiversidade microbiana.

O DCCR foi eficaz para otimizar a produção de extratos em clorofórmio do *Preussia africana*, a validação dos ensaios permitiu confirmar alguns resultados do planejamento inicial, mas também revelou variações cruciais que precisam ser levadas em consideração, salientando que esses métodos estão sujeitos a variações e que diversos fatores externos podem afetar os resultados.

A atividade antifúngica evidenciada pelos extratos, principalmente contra espécies de *Candida*, é propícia e abre perspectivas para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de infecções fúngicas. A baixa toxicidade dos extratos analisadas na *Galleria mellonella* ressalta a capacidade da aplicação desses extratos na área da saúde, após a identificação dos compostos presentes.

A correlação entre a atividade antioxidante e o teor de fenólicos dos extratos sugere que os compostos fenólicos desempenham um papel crucial na atividade antioxidante observada. Essa informação é pertinente para direcionar futuros estudos de isolamento e purificação dos compostos bioativos responsáveis pelos efeitos observados.

No entanto, são necessárias pesquisas adicionais para elucidar o mecanismo de ação dos compostos bioativos, identificar os compostos específicos responsáveis pelas atividades observadas e otimizar os processos de produção em larga escala. Além disso, os investimentos em estudos de farmacocinética e farmacodinâmica são essenciais para avaliar o potencial terapêutico desses compostos.

Em suma, este estudo demonstra o potencial do fungo endófito *Preussia africana* como uma fonte promissora de novos compostos bioativos com aplicações na área da saúde, especialmente no desenvolvimento de novos antifúngicos.

## REFERÊNCIAS

- ADMELLA, J.; TORRENTS, E. Um método simples para o isolamento e cultivo de hemócitos de *Galleria mellonella*. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 23, n. 24, p. 13483, 2022.
- ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M. L.; COELHO, C. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, p. 214, 2019.
- ALLEGRA, E.; TITBALL, R. W.; CARTER, J *et al.* As larvas de *Galleria mellonella* permitem a discriminação de produtos químicos tóxicos e não tóxicos. **Chemosphere**, [S. l.] v. 198, p. 469-72, 2018.
- ARENAL, F.; PLATAS, G.; PELÁEZ, F. Duas novas espécies de *Preussia* definidas com base em evidências morfológicas e moleculares. **Diversidade Fúngica**, [S. l.], v. 20, p. 1-15, 2005.
- BARROS, I. L. E.; VEIGA, F. F.; CORRÊA, J. L.; JARROS, I. C.; NEGRI, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. Standardization of resazurin use in susceptibility testing of natural products against yeasts in planktonic cells and <sup>1</sup> in biofilms formation. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá-SP, Brasil, v. 43, n. 1, p. e55700, 2021.
- BETTUCCI, L.; TISCORNIA, S. Fungos endofíticos de *Myrtaceae* nativas uruguaias: produção de enzimas, atividade antimicrobiana e fitotóxica. **Revista Internacional de Ciências**, [S. l.] v. 2, n. 2, p. 96-103, 2013.
- BOGAS, A. C. *et al.*, Endophytic fungi: an overview on biotechnological and agronomic potential. **Brazilian Journal of Biology**, [S. l.] v. 84, p. e258557, 2024.
- BRUM, M. C. P.; ARAÚJO, W. L.; MAKI, C.S.; AZEVEDO, J. L. Fungos endofíticos de *Vitis labrusca* L. ("Niágara Rosada") e seu potencial para o controle biológico de *Fusarium oxysporum*. **Genética e Pesquisa molecular**, Piracicaba-SP, Brasil, v.11, p. 4187-4197, 2012.
- CAESAR, L. K.; CECH, N. B. Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2. **Natural Product Reports**, [S. l.] v. 36, n. 6, p. 869-888, 2019.
- CAI, L. Thin Layer Chromatography. In: CURRENT PROTOCOLS ESSENTIAL LABORATORY TECHNIQUES. **John Wiley & Sons**, [S. l.] p. 6.3.1-6.3.18, 2014.
- CAPRILLES, C.H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani: 20 yaers). **Mycopathologia**, [S. l.]v. 106, p. 73-79, 1989.

CARNEIRO, F. A. M.; REIS, L. L. Influência de diferentes variáveis na fermentação do endófito *Preussia africana* para produção de antimicrobianos. Trabalho de conclusão de curso. (Química). Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG, Alfenas, 2019.

COLLINS, C. H. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 889-890, 2006.

COSTA, M.; SANTOS, R.; GUALBERTO, S.; SILVA, S. L. Fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de extratos de *Croton argyrophyllus* KUNTH (*Euphorbiaceae*). **Enciclopédia Biosfera**, [S.l.], v. 14, n. 25, 2017.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAÚJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Revista Virtual de Química**, Araraquara-SP, Brasil. v. 5, p 421-437, 2013.

CHATTERJEE, S.; GHOSH, R.; MANDAL, N. C. Inhibition of biofilm- and hyphal-development, two virulent features of *Candida albicans* by secondary metabolites of an endophytic fungus *Alternaria tenuissima* having broad spectrum antifungal potential. **Microbiological Research**, Jena, v. 232, p. 126386, 2020.

CHEN, X.; SHI, Q.; LIN, G.; GUO, S.; YANG, J. Spirobisnaphthalene analogues from the endophytic fungus *Preussia sp.* **Journal of Natural Products**, [S.l.], v. 72, n. 9, p. 1712-1715, 2009.

CHEN, L. I.; CHENG, C. W.; LIANG, J. Y. Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for quantitatively measuring total phenols. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 170, p. 10-15, 2015.

CHEN, H.; ZHAO, W.; LIU, Q.; CHEN, H.; ZHAO, W.; YANG, D.; YANG, X. (±) - Preisomide: A new alkaloid featuring a rare naturally occurring tetrahydro-2H-1,2-oxazin skeleton from an endophytic fungus *Preussia isomera* by using OSMAC strategy. **Fitoterapia**, [S.l.], v. 141, 2020.

CHOWDHARY, K.; KAUSHIK, N.; COLOMA, A. G. et al. Endophytic fungi and their metabolites isolated from Indian medicinal plants. **Phytochemistry Reviews**, Goiânia-GO, Brasil, v. 11, p. 467-485, 2012.

CHUDZIK, B. et al. A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *C. albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. **European Biophysics Journal**, Lublin, Poland, v. 44, p. 77-90, 2015.

DA SILVA, M. H. R. et al. Endophytic fungi from *Passiflora incarnata*: an antioxidant compound source. **Archives of Microbiology**, Berlin, Alemanha, v. 202, n. 10, p. 2779–2789, 2020.

DU, L.; ROBLES, A. J.; KING, J. B.; MOOBERRY, S. L.; CICHEWICZ, R. H. Cytotoxic dimeric epipolythiodiketopiperazines from the ascomycetous fungus *Preussia Typharum*. **Journal of Natural Products**, Estados Unidos, v.77, p. 1459-1466, 2014.

DU, R. H.; LIANG, L. R.; YANG, C. Q.; WANG, W.; CAO, T. Z.; LI, M.; GUO, G. Y.; ZHENG, C. L.; ZHU, Q.; HU, M.; LI, X. Y.; PENG, P.; SHI, H. Z. Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. **European Respiratory Journal**, Beijing, China, v. 55, p. 2000524, 2020.

EID, A. M.; SALIM, S. S.; HASSAN, S. D.; ISMAIL, M. A.; FOUDA, A. Papel dos endófitos na saúde das plantas e no manejo do estresse abiótico. In: KUMAR, V.; PRASAD, R.; KUMAR, M.; CHOUDHARY, D. K., eds. Microbioma na saúde e doença das plantas: desafios e oportunidades. **Springer**, Singapura, p. 119-144, 2019.

EL-SAYED, E.-S. R.; OLIVEIRA, A.; POMARAŃSKA, O.; MYKHAILOVA, D.; DUNAL, A.; DUDEK, A.; SATAM, S.; OLIVEIRA, T.; ŁYCZKO, J.; OLEJNICZAK, T. Fungos endofíticos de bioprospecção de plantas florestais para metabólitos bioativos com potenciais antibacterianos, antifúngicos e antioxidantes. **Moléculas**, [S.l.], v. 29, n. 24, p. 4746, 2024.

ETIM, D.; ANIETE, B.; INI-IBEHE, N.; UMANA, E.; NANCY, I. Evaluation of the Influence of Culture Media and Neem Cake Extract on the Growth Rate of Three Soil Borne Fungi (*Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride* and *Sclerotium rolfsii*). **South Asian Journal of Research in Microbiology**, [S.l.], v. 16, n. 4317, 2023.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chem**, Antalya, Turquia, v. 110, p. 76–82, 2008.

FALCI, D. R.; DA ROSA, F. B.; PASQUALOTTO, A. C. Comparison of nephrotoxicity associated with different lipid formulations of amphotericin B: a real-life study. **Mycoses**, Porto Alegre, Brasil v. 58, n. 2, p. 104-112, 2015.

FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Mmabatho, África do Sul, v. 8, p. 467, 2020.

FERREIRA-SILVA, A.; MENDES HUGHES, F.; ROSA, C. A.; LUIZ, & ROSA, H. Higher turnover of endophytic fungal assemblages in the tissues of globose cactus *Melocactus ernestii* from Brazilian semi-arid biome. **Springer Berlin**, [S.l.] v. 85, p. 79-91, 2021.

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, [S.l.] , v. 18, n. 1, p. 115–146, 2009.

GAUCHAN, D.; KANDEL, P.; TULADHAR, A.; ACHARVA, A.; KADEL, U.; BARAL, A.; SHAHI, A.; GARCÍA-GIL, M. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and cytotoxic

properties of bioactive compounds produced from endophytic fungi of Himalayan yew (*Taxus wallichiana*) in Nepal. **F1000Research**, [S.l.] v. 9, 2020.

GIAMMARINO, A.; BELLUCCI, N.; ANGIOLELLA. *Galleria mellonella* como modelo para o estudo de patógenos fúngicos: vantagens e desvantagens. **Pathogens**, Roma, Itália, v. 13, p. 233, 2024.

GONZALEZ-MENENDEZ, V.; MARTIN, J.; SILES, J. A.; et al. Biodiversidade e quimiotaxonomia de isolados de *Preussia* da Península Ibérica. **Progresso micológico**, [S.l.] v. 16, p. 713-728, 2017.

GORDON, M. H. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: **Food Antioxidants**. Springer Netherlands, p. 1–18, 1990.

GOUDA, S.; DAS, G.; SEN, S. K.; SHIN, H. S.; PATRA, J. K. Endophytes: a treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Frontiers in Microbiology** [S.l.], v. 7, p. 1538, 2016.

GUPTA, A.; MESHARAM V.; GUPTA, M.; GOYAL, S.; QURESHI, K.A.; JAREMKO, M.; SHURKLA, K. K. Fungal Endophytes: Microfactories of Novel Bioactive Compounds with Therapeutic Interventions; A Comprehensive Review on the Biotechnological Developments in the Field of Fungal Endophytic Biology over the Last Decade. **Biomolecules**, [S.l.] v. 13, p. 1038, 2023.

GURGEL, R.; DE MELO PEREIRA, D.; GARCIA, A.; DE SOUZA, A.; DA SILVA, T.; DE ANDRADE, C.; DA SILVA, W.; NUNEZ, C.; FANTIN, C.; DE LIMA PROCÓPIO, R.; ALBUQUERQUE, P. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Endophytic Fungi Associated with *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae). **Journal of Fungi**, [S.l.] v. 9, 2023.

GUZZETTI, L. B. *et al.* Candidemias em pediatria: distribuição de espécies y sensibilidad a los antifúngicos. **Revista Argentina de Microbiología**, [S.l.] v. 49, p. 320-322, 2017.

HARDOIM, P. R. *et al.* The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S.l.] v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HEIJNEN, C. G.; HAENEN, G. R. M.; VEKEMANS, J. A.J.; BAST, A. Peroxynitrite scavenging of flavonoids: structure-activity relationship. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* [S.l.] v. 10 (4), p.199–206, 2001.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILVA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem**, Durham, Estados Unidos, v. 13 (Issue 10), p. 572–584, 2002.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the

treatment of infectious diseases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

JORGE, A. J. Aspergilose: resistência e impactos futuros. In: MEHDI, R. A., ed. *Aspergillus e Aspergilose: Avanços em genômica, desenvolvimento de medicamentos, diagnóstico e tratamento*. **InterchOpen**, [S.l.] 2021.

JORJÃO, A. L.; et al. From moths to caterpillars: ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, São Paulo- SP, Brasil, v. 9, n. 1, p. 383-389, 2018.

JUDONG, Y.; SHAHIDI, F. Revisiting DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay as a useful tool in antioxidant evaluation: a new IC<sub>100</sub> concept to address its limitations. **J. Food Bioact**, [S.l.] v. 7, p. 36 - 42, 2019.

KHAN, A. L.; ASAF, S.; KHAN, R. A.; AL-HARRASI, A.; AL-RAWAHI. A; LEE, I. J. First draft genome sequencing of indole acetic acid producing and plant growth promoting fungus *Preussia* sp. BSL10, **Journal of Biotechnology**, [S.l.] v. 225, p. 44-45, 2016.

KHARUL, A. M. A. R.; DARAH, I. *Ceratobasidium ramicola* IBRLCM127, an endophytic fungus isolated from *Curcuma mangga* Valeton & Zijp with strong anti-candidal activity. **International Journal of Medical, Health, Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, Kelantan, Malaysia v. 1, n. 2, p. 123-135, 2019.

KRUYS, A.; WEDIN, M. Relações filogenéticas e avaliação de caracteres taxonômicos tradicionalmente utilizados em *Sporormiaceae* (*Pleosporales*, *Dothideomycetes*, *Ascomycota*), utilizando filogenias multigênicas. **Sistemática e Biodiversidade**, [S.l.] v. 7, p. 465-478, 2009.

LOH, J. M. S. et al. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A *streptococcus*. **Virulence**. [S.l.] v. 4, n. 5, p. 419-428, 2013.

LUSTOSA, M. C. G. Estudo metabólico e atividades biológicas de extratos produzidos pelos fungos endofíticos *Preussia* sp. e *Phyllosticta* sp. isolados de *Platonia insignis* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 33, n. 2, p. 200-210, 2023.

MAPPERSON, R. R. et al. The diversity and antimicrobial activity of *Preussia* sp. endophytes isolated from Australian dry rainforests. **Current Microbiology**, Brisbane, Austrália, v. 68, n. 1, p. 30-37, 2014.

MARWICK, J D.; WRIGHT, P. C.; BURGESS, J. P. Bioprocess intensification for production of novel marine bacterial antibiotics through bioreactor operation and design. **Mar.Biotechnol.** Japão, v. 1, p. 495-507, 1999.

MATHAI, N.; CHEN, Y. & KIRCRHMAIR J. Validation strategies for target prediction methods. **Briefings in Bioinformatics**, [S.l.] v. 21, p. 791 - 802, 2019.

MERCK, E. Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y papel. **Darmstadt: Merck**, Darmstadt p. 130, 1972.

MOAZZEN, A.; OZTINEN, N.; AK-SAKALLI, E.; KOSAR, M. Structure-antiradical activity relationships of 25 natural antioxidant phenolic compounds from different classes.

**Heliyon**. Turquia, v. 8, p. 10467, 2022.

MUTHUKRISHAN, S.; PRAKATHI, P.; SIVAKUMAR, T.; THIRUVENGADAM, M.; JAVAPRAKASH, B.; BASKAR, V.; REBEZOV, M.; DEKHO, M.; ZENGIN, G.; SHARIATI, M. Bioactive Components and Health Potential of Endophytic Micro-Fungal Diversity in Medicinal Plants. **Antibiotics**, [S.l.] v.11, 2022.

NOUMEUR, S. R.; HELALY, S. E.; JANSEN, R.; GEREKE, M.; STRADAL, T. E. B.; HARZALLAH, D.; STADLER, M. Preussilides A–F, bicyclic polyketides from the endophytic fungus *Preussia similis* with antiproliferative activity. **Journal of Natural Products**. [S.l.] v. 80, p. 53, 2017.

**ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE**. Lista de patógenos fúngicos prioritários da OMS para orientar a pesquisa, o desenvolvimento e as ações de saúde pública. Acesso em: 28 dez. 2023.

PAL, P. P.; SHAIK, A. B.; BEGUM, A. S. Prospective Leads from Endophytic Fungi for Anti-Inflammatory Drug Discovery. **Planta Médica**, India, v. 86 n. (13/14), 941-959, 2020.

PAUDEL, B., BHATTARAI, K., & BHATTARAI, H. D. Antimicrobial and antioxidant activities of two polyketides from lichen-endophytic fungus *Preussia sp.* **Zeitschrift für Naturforschung C**. Kathmandu, Nepal, v. 73, n. 3-4, p. 161-163, 2018.

PATHAKUMARI, B.; LIANG, G.; LIU, W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. **Biomed Pharmacother**, [S.l.] 2020.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.S. Produtos Naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, [S.l.] v. 25, p.45-51, 2002.

RAI, N., KESHRI, P. K., VERMA, A., SWARNIL, C., KAMBLE, P. M., PRADEEP, M., SUVAKANTA, B., SANTOSH, K. S., VIBHAV, G. Endófitos fúngicos associados a plantas como fonte de compostos bioativos naturais, **Micologia**, [S.l.] 2021.

RAJAMANIKYAM, M.; VADLAPUDI, V.; UPADHYAYULA, S. M. Fungos endofíticos como novos recursos de terapêutica natural. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S.l.] 2017.

RAUT, A.; HUY, N. T. Rising incidence of mucormycosis in patients with COVID-19: another challenge for India amidst the second wave? **The Lancet Respiratory Medicine**, Mumbai, India, v. 9, p. 77, 2021.

REVANKAR, S. G. Visão geral das infecções fúngicas. **MD, Wayne State University School of Medicine**, [S.l.] 2021.

ROCAFORT, M.; FUDAL, I.; MESARICH, C. H. Apoplasmic effector proteins of plant-associated fungi and oomycetes. **Current Opinion in Plant Biology**, França, v. 56, p. 9-19, 2020.

ROBBINS, W & HERVEY, A. Wood, Tomato and Malt Extracts and Growth of Some Basidiomycetes. **Mycologia**. Nova York, Estados Unidos, v. 50, p. 745-752, 1958.

ROBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L.E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**. Toronto, Canadá, v.71, p.753-775, 2017.

RODRIGUEZ, R. J. et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **The New Phytologist**, Estados Unidos, v. 182, n. 2, p. 314-330, 2009.

RODRIGUES, M. L.; NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, Brasil, v. 14, n. 2, p. e 0007964, 2020.

ROQUETE, T.; BRAGA, V.; SEIBERT, J.; SOUZA, G.; TEIXEIRA, L. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 50-59, abr. 2018.

SARDI, J. C. O. et al. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into the mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. **Microbial Pathogenesis**, Brasil, v. 105, p. 280 – 287, 2017.

SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, [S.l.] v. 42, p. 321-324, 2007.

SERRANO, I.; VERDIAL, C.; TAVARES, L et al. O modelo virtuoso da *Galleria mellonella* para experimentação científica. **Antibióticos**, Lisboa, Portugal v. 12, p. 505, 2023.

SINGH, V.; HAQUE, S.; NIWAS, R.; SRISTAVA, A.; PASUPULETI, M.; TRIPATHI, C. K. M. Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. **Front. Microbiol.** [S.l.] v. 7, p. 2087, 2017.

SILVA, M. et al. A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil. **Research, Society and Development**, Bauru, v. 10, n. 12, p. e538101220137, 2021.

SOMAN, A. G.; GLOER, J. B.; KOSTER, B.; MALLOCH, D. Sporovexins A-C and a new preussomerin analog: antibacterial and antifungal metabolites from the coprophilic fungus *Sporormiella vexans*. **Journal of Natural Products**, [S.l.] 1999.

SOUZA, C. M. M.; SILVA, H.R.; VIEIRA, G.M.; AYRES, M.C.C. COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de 5 plantas medicinais. **Química Nova**, [S.l.] v. 30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, I.M.; BASSI, G.J.; LUIZ, J.H.H.; HIRATA, D.B. Isolation and Screening of Extracellular Lipase Producing Endophytic Fungi from *Handroanthus impetiginosus*. **Asian**

**Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, Alfenas, Brasil, v. 4, n.2, p. 1-10, 2018.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

SCHEMPER, M. Predictive accuracy and explained variation. **Statistics in medicine**, Áustria v. 22, 2003.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Alemanha, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SPAMPINATO, C. et al. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative anti-fungal agents. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, p. 204237, 2013.

TSAI, C. J. et al. *Galleria mellonella* infection models for studying bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, Nova Zelândia, v. 7, n. 3, p. 214–229, 2016.

TAHA, M.; ZAGHLOUL, A. B. Superficial Fungal Infections. In: ORFANOS, C. E.; ZOUBOULIS, C. C.; ASSAF, C. (Ed.). Pigmented Ethnic Skin and Imported Dermatoses: A Text-Atlas. **Springer International Publishing**, [S.l.] p. 37-51, 2018.

TALONTSI, F. M.; LAMSHOFT, M.; DOUANLA-MELI, C.; KOUAM, S. F.; SPITELLER, M. Antiplasmodial and Cytotoxic Dibenzofurans from *Preussia* sp. harboured in *Enantia chlorantha* Oliv, **Fitoterapia**, [S.l.] v. 93, p. 233-238, 2014.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 31, n. 7, p. 1807–1813, 2008.

TAKAHASHI, J. A.; LIMA, G. S.; SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; SILVA, H. A. F.; GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Química Virtual**, Belo Horizonte, v. 9, 2017.

TIAN, X. J.; HUANG, C. Y.; HUANG, J. Y. Identification of flavonoids and flavonoid-producing endophytic fungi isolated from *Opisthoppappus taihangensis* (Ling) Shih. **Bangladesh Journal of Botany**, [S.l.] v. 46, p. 1063–1070, 2017.

UPADHYAY, A.; BHATTACHARYYA, B.; RAY, L. Value added secondary metabolites from a microorganism. **Journal of Advanced Microbiology**, Odisha, Índia, v. 4, p. 90-105, 2020.

VALENTE, L. M.M.; ALVES, F.F.; BEZERRA, G.M.; ALMEIDA, M.B.S.; MAZZEI, J.L.; D'AVILA, L.A.; SIANI, A.C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Rio de Janeiro, v. 16, p. 216-223, 2006.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. **International Journal of Microbiology**, Lausanne, Suíça, 2012.

VIEIRA, M. L. A.; JOHANN, S.; HUGHES, F. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. A diversidade e a atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Baccharis trimera* (Asteraceae) do cerrado brasileiro. **Canadian Journal of Microbiology**, Minas Gerais, v. 60, n. 12, p. 847-856, 2014.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. 2. ed. Heidelberg: **Springer**, Munique, Alemanha, p. 359, 1996.

WANG, Y.; GLOER, J. B.; SCOTT, J. A.; MALLOCH, D. Terezines A-D: new amino acid-derived bioactive metabolites from the coprophilous fungus *Sporormiella terestispora*. **Journal Of Natural Products**, [S.l.] v. 58, p. 93-99, 1995.

WILSON, I. D.; POOLE, C. F. Planar chromatography – Current practice and prospects. **Journal of Chromatography**, [S.l.] p. 1214-123553, 2023.

WHEAT, L. J. et al. Histoplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Estados Unidos, v. 30, n. 1, p. 207-227, 2016.

XIONG, Z. Q.; YANG, Y. Y.; LIU, Q. X.; SUN, C. C.; JIN, Y.; WANG, Y. Endophytes in the plant *Huperzia serrata*: fungal diversity and discovery of a new pentapeptide. **Archives of Microbiology**, Xangai, China, 2014.

XU, L. L. et al. (+) -and (-) -Preisolactone A: A Pair of Caged Norsesquiterpenoidal Enantiomers with a Tricyclo [4.4.0<sup>1,6</sup>.0<sup>2,8</sup>] decane Carbon Skeleton from the Endophytic Fungus *Preussia isomera*. **Organic Letters**, [S.l.] v. 21, n. 4, p. 1078-1081, 2019.

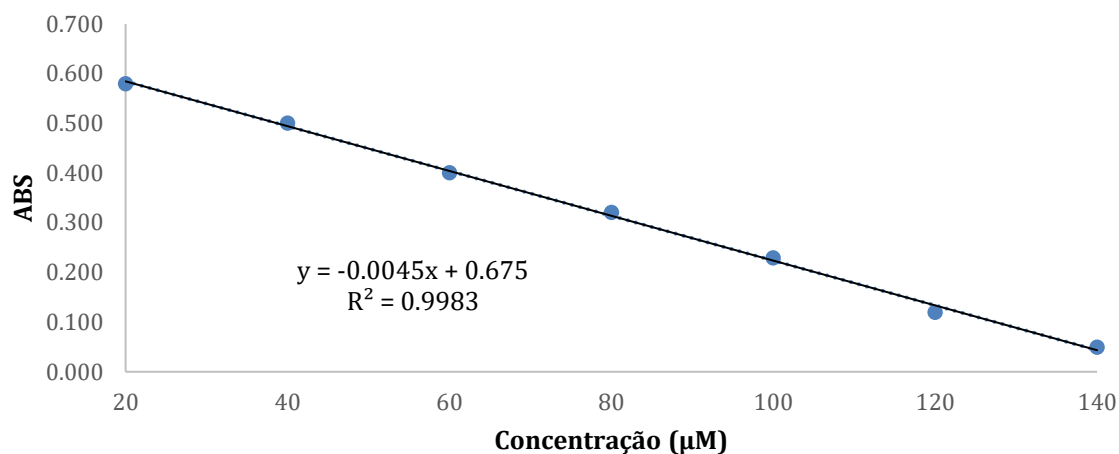
ZHANG, F.; LI, L.; NIU, S.; SI, Y.; GUO, L.; JIANG, X.; CHEN, Y. A thiopyranochromone and other chromone derivatives from endolichenic fungus *Preussia africana*. **Journal of Natural Products**, China, v. 75, p 230-237, 2012.

ZHANG, X. G. et al. Diversity and bioactivity of endophytes from *Angelica sinensis* in China. **Frontiers in Microbiology**, Gansu, China, v. 11, p. 1489, 2020.

ZHOU, L. et al. Extraction and characterization of bioactive compounds from diverse marine microalgae and their potential antioxidant activities. **Chemistry and Biodiversity**. [S.l.] v. 20, e202300602, p. 1-11, 2023.

## APÊNDICE A – CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO DPPH

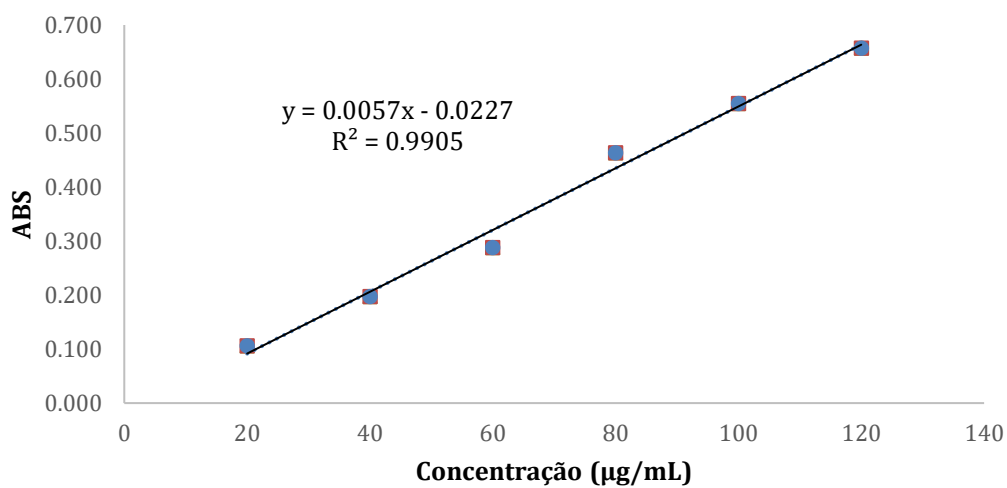
Figura 19 - Curva de calibração com trolox para determinação do sequestro de radicais DPPH.



Fonte: Do Autor (2024)

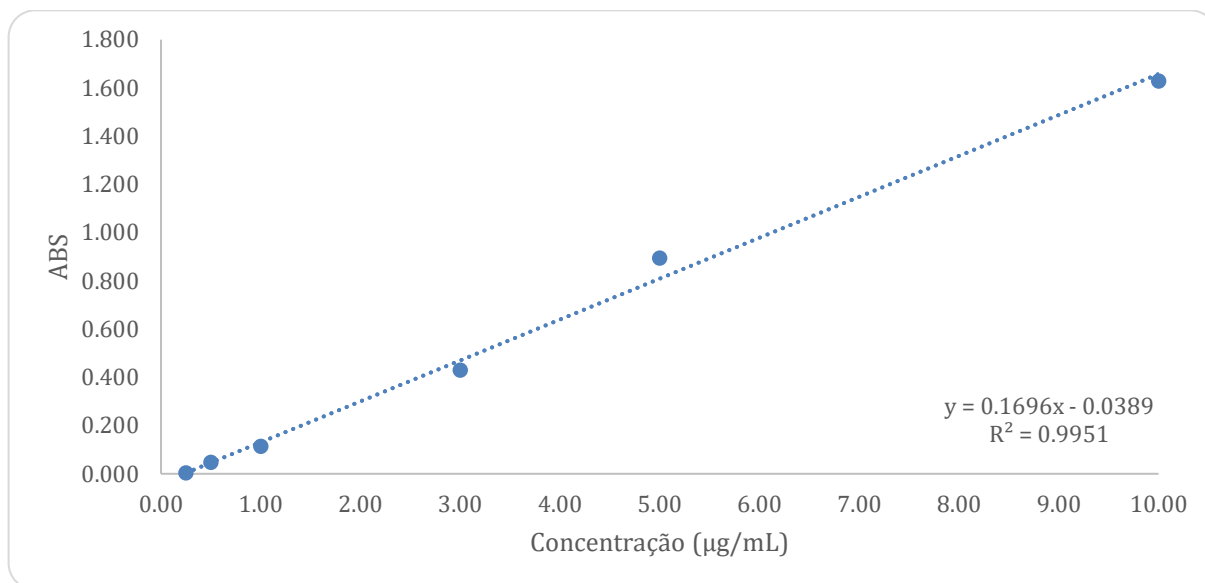
## APÊNDICE B – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS

Figura 20 - Curva de calibração utilizando ácido gálico para determinação de fenólicos totais.



Fonte: Do Autor (2024).

Figura 21 - Curva de calibração utilizando quercetina como padrão para determinação de flavonoides totais.



Fonte: Do Autor (2024).

### APÊNDICE C – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS, FLAVONOIDES E DPPH PARA OS PONTOS DE VALIDAÇÃO

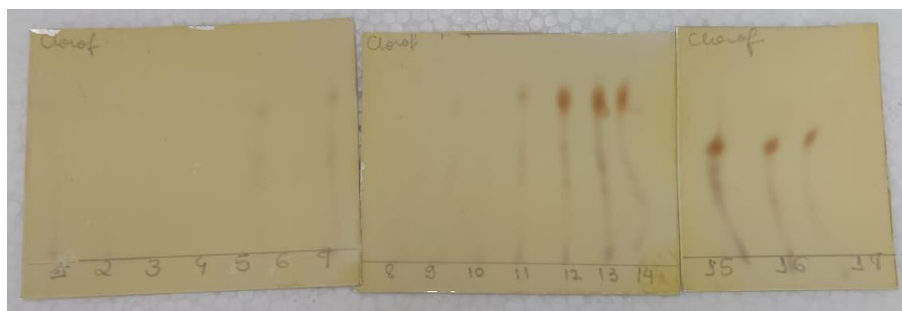
**Tabela 14** - Teor de fenólicos, flavonoides e DPPH para os pontos de validação

Extratos	Flavonoides (µgQE/mg extrato)		Fenólicos (µgGAE/mg extrato)		DPPH (µgET/g extrato)	
	AcOEt	Desvio Padrão	AcOEt	Desvio Padrão	AcOEt	Desvio Padrão
PO	2,24	0,09	159,15	10,14	266,86	10,34
7	3,39	0,58	175,22	20,50	260,30	20,07
10	6,32	4,09	103,77	70,83	176,49	12,04
12	3,95	2,45	59,69	29,51	170,62	39,18
Extratos	CHCl <sub>3</sub>	Desvio Padrão	CHCl <sub>3</sub>	Desvio Padrão	CHCl <sub>3</sub>	Desvio Padrão
PO	5,55	0,41	153,35	15,77	258,57	33,28
7	5,67	1,18	126,68	14,24	260,30	30,67
10	3,00	1,13	132,07	81,44	176,49	0,37
12	2,65	0,58	102,17	27,97	170,62	8,37

Fonte: Do Autor (2024).

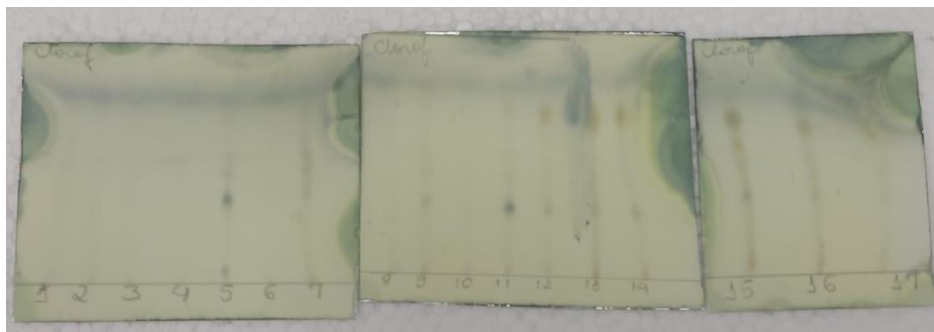
## APÊNDICE D – AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) DOS EXTRATOS DE CLOROFÓRMIO

Figura 22 - Extratos em clorofórmio (ensaios 1-17) revelados com cloreto férrico (Eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1, v:v)).



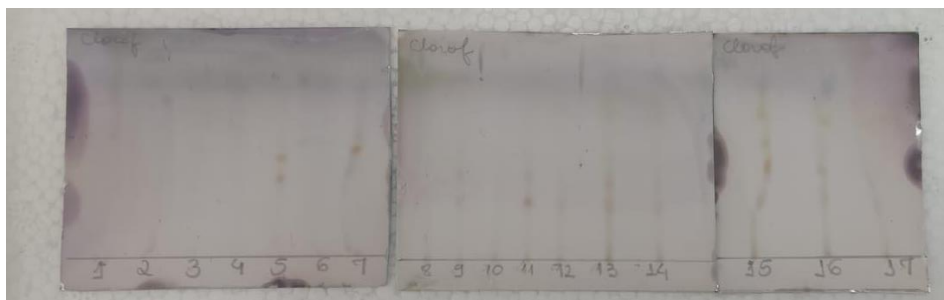
Fonte: Do Autor (2024).

Figura 23 - Extratos em clorofórmio (ensaios 1-17) revelados com ácido fosfomolibdico (Eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1, v:v)).



Fonte: Do Autor (2024)

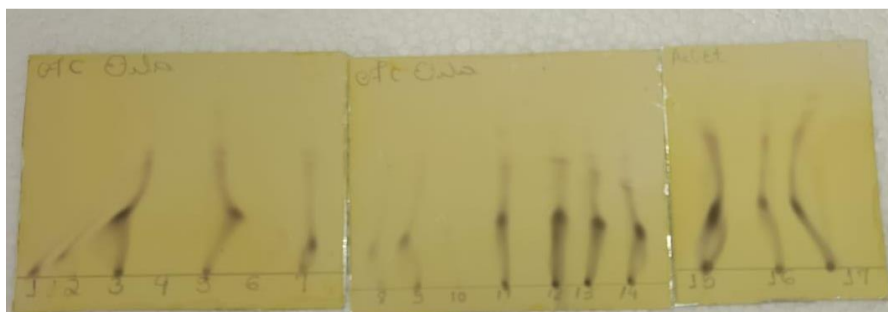
Figura 24 - Extratos em clorofórmio (ensaios 1-17) revelados com anisaldeído (Eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1, v:v)).



Fonte: Do Autor (2024).

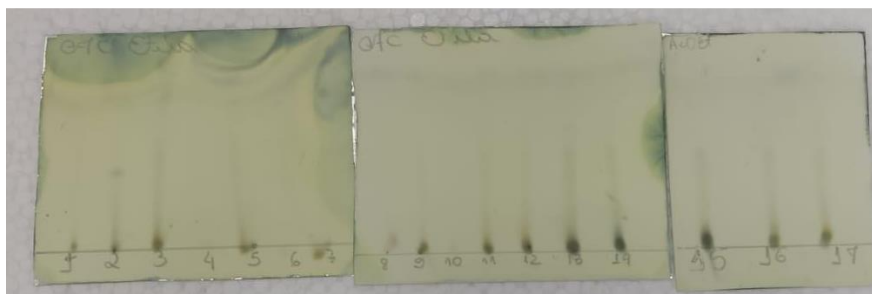
## APENDICE E - AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA

Figura 25 - Extratos em acetato de etila (ensaios 1-17) revelados com cloreto férrico (Eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1, v:v)).



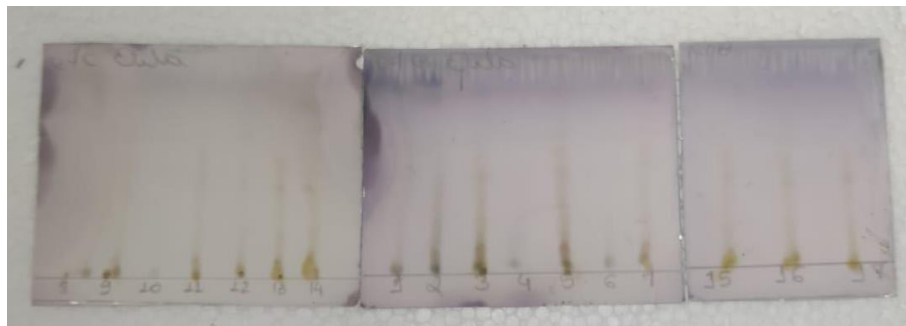
Fonte: Do Autor (2024).

Figura 26 - Extratos em acetato de etila (ensaios 1-17) revelados com ácido fosfomoblídico (Eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1, v:v)).



Fonte: Do Autor (2024).

Figura 27 - Extratos em acetato de etila (ensaios 1-17) revelados com anisaldeído (Eluente:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1, v:v)).



Fonte: Do Autor (2024).