

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

KARINA OLIVEIRA DA COSTA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO ENDOFÍTICO
PHOMOPSIS SP. EXTRAÍDO DA *BAUHINIA VARIEGATA* PARA PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.**

BRASÍLIA

2016

KARINA OLIVEIRA DA COSTA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO ENDOFÍTICO
PHOMOPSIS SP. EXTRAÍDO DA *BAUHINIA VARIEGATA* PARA PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

**Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin.

Brasília

2016

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

KARINA OLIVEIRA DA COSTA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DO FUNGO ENDOFÍTICO
PHOMOPSIS SP. EXTRAÍDO DA *BAUHINIA VARIEGATA* PARA PRODUÇÃO DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Aprovada em 29 de janeiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Maria de Fátima Borin (Presidente)
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
Universidade de Brasília**

**Profa. Dra. Janice Lisboa de Marco
Universidade de Brasília**

**Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni (suplente)
Universidade de Brasília**

Jamais colocarei meu nome em algo que não tenha em sí o que há de melhor em mim”.

Jonh Deere

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares pelo apoio irrestrito, em especial ao meu marido Adailton Rafael.

À professora Dra. Maria de Fátima Borin pela orientação e atenção a mim dispensada durante todo o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os professores e amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília pela amizade e ajuda sempre que necessária.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado e à CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) – Rede Pró-Centro Oeste – pelo apoio ao projeto de pesquisa.

RESUMO

COSTA, KARINA OLIVEIRA DA. Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Phomopsis sp.* extraído da *Bauhinia variegata* para produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante [dissertação]. 2016. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade de Brasília.

Variações no ambiente de crescimento de microrganismos podem ter impactos consideráveis sobre a quantidade e diversidade de metabólitos secundários produzidos por esses. Assim, a otimização de culturas microbianas, pode ter efeitos significativos quando se quer aumentar o rendimento de um determinado metabólito. Este trabalho foi realizado para avaliar a influência de alguns fatores nutricionais e ambientais sobre a produção de compostos fenólicos (flavonoides e polifenóis), assim como foi conduzida a otimização das condições experimentais que resultassem em uma atividade antioxidante mais elevada dos extratos dos metabólitos produzidos pelo fungo *Phomopsis sp.*, isolado a partir de folhas da *Bauhinia variegata*. Para a otimização da produção de polifenóis totais, flavonoides e da atividade antioxidante dos extratos (variáveis dependentes – respostas preditas), foi realizado um delineamento experimental fatorial 2^3 no modelo de faces centradas (DFC), com três variáveis independentes denominadas pH inicial do meio, temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$) e concentração de peptona no meio (g/L). As variáveis independentes foram codificadas em três níveis (-1, 0, +1). Utilizando-se a ferramenta de planejamento experimental com a metodologia de superfície de resposta (MSR) foi possível investigar a influência das variáveis independentes, assim como a forma de interação entre elas. O comportamento da produção de flavonoides e polifenóis, assim como da atividade antioxidante quando em diferentes condições ambientais foi eficientemente compreendido através de métodos estatísticos. Modelos polinomiais de segunda ordem foram utilizados para prever cada uma das três respostas. A análise de regressão da resposta atividade antioxidante mostrou que 93,9% da variação foi explicada pelo modelo. Estes resultados indicam que fatores nutricionais e ambientais desempenham um papel importante na produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante pelo fungo *Phomopsis sp.*

Palavras-chaves: Polifenóis. Flavonoides. *Phomopsis sp.* *Bauhinia variegata*. Otimização de produção.

ABSTRACT

COSTA, KARINA OLIVEIRA DA. Culture conditions optimization for the production of secondary metabolites with antioxidant activity by the endophytic fungi *Phomopsis sp.* extracted from *Bauhinia variegata* [dissertation]. 2016. Faculty of Health Sciences. University of Brasilia

Variations in microbial growth environment can have significant impacts on the quantity and diversity of secondary metabolites produced. Thus, the optimization of microbial cultures may have significant effects when one wants to increase throughput of a particular metabolite. This study was conducted to evaluate the influence of nutrition and environmental factors on the production of phenolic compounds (polyphenols and flavonoids), as well as optimization of the experimental conditions that would result in a higher antioxidant activity on the extracts of the metabolites produced by the fungus *Phomopsis sp.* isolated from *Bauhinia variegata* leaves. For optimization of the production of total polyphenols, flavonoids as well as extracts with high antioxidant activity (dependent variables - predicted responses) a factorial experimental design 2^3 was performed using a face-centered cubic design (FCD) of experiments, with three independent variables, namely initial pH, incubation temperature ($^{\circ}\text{C}$) and concentration of peptone (g/L). The independent variables were coded at three levels (-1, 0, +1). Using the experimental design tool with the response surface methodology (RSM) was possible to investigate the influence of the independent variables, as well as the form of interaction between them. Second order polynomial models were used to predict each of the three answers. The regression analysis of the antioxidant activity response showed that 93.9% of the variation was explained by the model. These results indicate that nutritional and environmental factors play an important role in production of secondary metabolites with antioxidant activity, which can be better understood and studied using mathematical and statistical methods. The production profile of flavonoids and polyphenols, as well as antioxidant activity of the extracts produced by *Phomopsis sp.* in different environmental conditions were efficiently predicted using statistical methods.

Keywords: Polyphenols. Flavonoids. *Phomopsis sp.* *Bauhinia variegata*. Production optimization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química básica dos flavonoides	7
Figura 2. Proteínas globais reguladoras envolvidas na regulação de agrupamentos de genes do metabolismo secundário de vários fungos. Essas proteínas reguladoras respondem a estímulos ambientais e modulam a expressão dos genes. Extraído e adaptado de Brakhage, 2013.	9
Figura 3. Cultivo do fungo <i>Phomopsis sp.</i> em cultura submersa realizado em 2 etapas.	16
Figura 4. Cultivo do fungo <i>Phomopsis sp.</i> em cultura submersa realizado em 1 etapa.	17
Figura 5. Quantidade de flavonoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$) nos extratos produzidos pelo cultivo do fungo sem a etapa de pré-inóculo.....	26
Figura 6. Quantidade de polifenóis ($\mu\text{g}/\text{mg}$) nos extratos produzidos em cultivo do fungo sem a etapa de pré-inóculo.....	26
Figura 7. Quantidade de flavonoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$) nos extratos produzidos pelo cultivo do fungo com a etapa de pré-inóculo.....	26
Figura 8. Quantidade de polifenóis ($\mu\text{g}/\text{mg}$) nos extratos produzidos pelo cultivo do fungo com a etapa de pré-inóculo.....	26
Figura 9. Curva Padrão de Quercetina (mg/mL) empregada no ensaio dos flavonoides.	27
Figura 10. Curva Padrão de Ácido Gálico (mg/mL) empregada no ensaio dos polifenóis.	27
Figura 11. Box-plot dos dados de concentração de peptona (g/L) no meio em relação à produção de polifenóis ($\text{mg EAG}/\text{mg}$).	31
Figura 12. <i>Box-plot</i> dos dados de concentração de peptona no meio em relação à produção de flavonoides ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$).	32
Figura 13. <i>Box-plot</i> dos dados de pH inicial do meio em relação à produção de polifenóis $\text{mg EAG}/\text{mg}$	35
Figura 14. <i>Box-plot</i> dos dados de pH inicial do meio em relação à produção de flavonoides $\mu\text{g EQ}/\text{mg}$	36
Figura 15. <i>Box-plot</i> dos dados de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) em relação à produção de polifenóis ($\text{mg EAQ}/\text{mg}$).	39
Figura 16. <i>Box-plot</i> dos dados de temperatura em relação à produção de flavonoides ($\mu\text{g EQ}/\text{mg}$).	40
Figura 17. Gráfico de Pareto para a variável resposta polifenóis, mostrando as variáveis da regressão em ordem de importância para o modelo. As variáveis que ultrapassam a linha vertical são significativas ao nível de significância de 5%.	47
Figura 18. $Y_{\text{predito}} \times Y_{\text{experimental}}$ da variável resposta polifenóis, mostrando a previsibilidade do modelo.	48
Figura 19. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis independentes x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio).....	49
Figura 20. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona no meio e temperatura de incubação).	50

Figura 21. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis independentes x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação).....	50
Figura 22. Gráfico de Pareto para a variável resposta produção de polifenóis, mostrando somente as variáveis da regressão significativas ao nível de significância de 5% para o modelo.	51
Figura 23. $Y_{predito}$ x $Y_{experimental}$ da variável resposta produção de polifenóis apenas com coeficientes estatisticamente significativos, mostrando a previsibilidade do modelo.	52
Figura 24. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio).	53
Figura 25. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona no meio e temperatura de incubação).	53
Figura 26. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação).....	54
Figura 27. Gráfico de Pareto para a variável resposta produção de flavonoides, mostrando as variáveis da regressão em ordem de importância para o modelo. As variáveis que ultrapassam a linha vertical são significativas ao nível de significância de 5%.	55
Figura 28. $Y_{predito}$ x $Y_{experimental}$ da variável resposta produção de flavonoides, mostrando a previsibilidade do modelo.	56
Figura 29. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de flavonoides em relação às variáveis x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio).	57
Figura 30. Superfície de resposta da produção de flavonoides em relação às variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona e temperatura de incubação).	57
Figura 31. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de flavonoides em relação às variáveis x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação).....	58
Figura 32. Gráfico de Pareto para a variável resposta produção de flavonoides, mostrando somente as variáveis da regressão significativas ao nível de significância de 5% para o modelo.	59
Figura 33. $Y_{predito}$ x $Y_{experimental}$ da variável resposta produção de flavonoides apenas com coeficientes estatisticamente significativos, mostrando a previsibilidade do modelo.	60
Figura 34. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de flavonoides em relação às variáveis x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio).....	61
Figura 35. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de flavonoides em relação às variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona no meio e temperatura de incubação).	61
Figura 36. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de flavonoides em relação às variáveis x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação).....	62
Figura 37. Gráfico de Pareto para a variável resposta Atividade Antioxidante, mostrando somente as variáveis da regressão significativas ao nível de significância de 5% para o modelo.	66

Figura 38. $Y_{predito}$ x $Y_{experimental}$ da variável resposta atividade antioxidante (%) apenas com coeficientes estatisticamente significativos, mostrando a previsibilidade do modelo.	66
Figura 39. Superfície de resposta e gráfico plano da atividade antioxidante do extrato produzido em relação às variáveis x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio).....	67
Figura 40. Superfície de resposta e gráfico plano da atividade antioxidante do extrato produzido em relação às variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona no meio e temperatura de incubação).....	68
Figura 41. Superfície de resposta e gráfico plano da atividade antioxidante do extrato produzido em relação às variáveis x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis independentes, níveis decodificados e nome das respostas.	19
Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 2^3 (n = 3) no modelo de delineamento de faces centradas para a otimização da produção de polifenóis e flavonoides pelo fungo <i>Phomopsis sp.</i>	20
Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial 2^3 (n = 1) no modelo de delineamento de faces centradas para a otimização da produção de metabólitos com atividade antioxidante pelo fungo <i>Phomopsis sp.</i>	21
Tabela 4. Valores descritivos para a variável concentração de peptona em relação à variável resposta quantidade de polifenóis.	29
Tabela 5. Valores descritivos para a variável concentração de peptona em relação à variável resposta quantidade de flavonoides.....	30
Tabela 6. Valores descritivos para a variável pH inicial do meio em relação à variável resposta produção de polifenóis.....	33
Tabela 7. Valores descritivos para a variável pH inicial do meio em relação à variável resposta flavonoides.....	34
Tabela 8. Valores descritivos para a variável temperatura em relação à variável resposta polifenóis.	37
Tabela 9. Valores descritivos para a variável temperatura em relação à variável resposta flavonoides.....	38
Tabela 10. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2^3 , com 3 repetições para a variável resposta quantidade de polifenóis.	42
Tabela 11. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2^3 , com 3 repetições para a variável resposta quantidade de flavonoides.	43
Tabela 12. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2^3 , com 3 repetições para a variável resposta quantidade de polifenóis, selecionando os coeficientes significativos ao nível de significância de 5%.....	45
Tabela 13. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2^3 , com 3 repetições para a variável resposta quantidade de flavonoides, selecionando os coeficientes significativos ao nível de significância de 5%.	46
Tabela 14. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2^3 , com 1 repetição para a variável resposta atividade antioxidante (%).	63
Tabela 15. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2^3 , com 1 repetição para a variável resposta atividade antioxidante (%) selecionando-se os coeficientes significativos ao nível de significância de 5%.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
MSR	Metodologia de Superfície de Resposta
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH·	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EQ	Equivalente de Quercetina
DFC	Delineamento de Fases Centradas
DOE	<i>Design of Experiments</i>
pH	Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Os fungos endofíticos e seus metabólitos secundários.....	1
1.2. Atividade antioxidante de polifenóis e flavonoides	3
1.3. Influência das condições de cultivo na produção de metabólitos secundários.	8
1.4. Importância do uso de abordagens estatísticas na modificação das condições de cultivo visando ao aumento da produção de metabólitos secundários.....	9
1.4.1. O Planejamento Fatorial e o <i>Design of Experiments</i> (DOE).....	11
1.4.2. Análise ou Metodologia de Superfície de Resposta (MSR).....	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. Equipamentos.....	15
3.2. Métodos.....	15
3.2.1. Cultivo e conservação do fungo endofítico em meio sólido.	15
3.2.2. Cultivo do fungo em cultura submersa utilizando diferentes meios de cultura	16
3.2.3. Cultivo do fungo em cultura submersa em caldo Sabouraud-dextrose, com variação das condições de temperatura, pH e concentração de peptona.	17
3.2.4. Planejamento dos ensaios – planejamento fatorial 2 ³ em delineamento de faces centradas (DFC).	17
3.2.5. Obtenção do extrato dos metabólitos produzidos pelo fungo	22
3.2.6. Quantificação de polifenóis totais	22
3.2.7. Quantificação de flavonoides totais	22
3.2.8. Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	23
3.2.9. Análise Estatística.....	24
4. RESULTADOS	25
4.1. Triagem inicial dos meios de cultivo	25
4.2. Cultivo do fungo em cultura submersa, em caldo Sabouraud-dextrose, com variação de condições de temperatura, pH e concentração de peptona	28
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Os fungos endofíticos e seus metabólitos secundários

Endófitos são microrganismos que vivem associados ao tecido de uma planta viva. Dentre esses microrganismos incluem-se as bactérias e os fungos que vivem nos tecidos vegetais, sem lhes causar quaisquer efeitos negativos imediatos evidentes (YANG *et al.*, 2001). Eles protegem a planta do estresse fotossintético, espécies reativas de oxigênio, lesões e de alguns herbívoros, e ainda, podem causar outras modificações fisiológicas em seus hospedeiros, como torná-los mais resistentes ao estresse hídrico (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Estes microrganismos são reconhecidos como fontes potenciais de novos produtos naturais para a exploração na medicina, agricultura, indústria química e farmacêutica (SADRATI *et al.*, 2013; ZAFERANLOO *et al.*, 2014).

O tipo de interação que ocorre entre um fungo endofítico e a planta hospedeira é geralmente mutualística, ou seja, a planta proporciona nutrientes para o microrganismo, enquanto esse produz metabólitos que a protegem contra o ataque de insetos, animais ou outros microrganismos patogênicos. Esta relação endofítica, portanto, não é considerada patogênica, tendo em vista que esses microrganismos apenas conferem à planta adaptabilidade para sobreviver em condições ambientais adversas (NATH *et al.*, 2012). Assim, os fungos endofíticos não são considerados saprófitas, uma vez que estão associados com tecidos vivos, e podem, de alguma forma, contribuir para o bem estar da planta (RODRIGUEZ *et al.*, 2009).

Azevedo e colaboradores (1998) afirmam que todos os microrganismos que habitam, pelo menos por um período de seu ciclo de vida, o interior de uma planta, podem ser considerados como endófitos. Para os autores, a distinção entre os endófitos, epífitas (aqueles que vivem na superfície das plantas) e fitopatógenos (aqueles que causam doenças em plantas) é, em sua essência, didática. Existe uma diferença tênue entre eles, que muitas vezes depende das condições fisiológicas momentâneas dos vegetais onde estes se encontram. Trata-se, portanto, de uma tarefa difícil estabelecer limites para discriminar cada categoria.

Segundo Azevedo (2000), os fungos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no século XIX, sendo Bary (1866) quem primeiro teria feito uma

distinção entre esses organismos e os patógenos das plantas. Ainda segundo o autor, microrganismos endofíticos podem ser encontrados não apenas nas partes aéreas dos vegetais, mas também nas raízes, e esta é uma das principais portas de entrada desses microrganismos.

De acordo com Zhang e colaboradores (2006), é crescente o interesse de cientistas no estudo dos fungos endofíticos por estes serem potenciais produtores de novos compostos biologicamente ativos. Nas últimas duas décadas, muitos compostos bioativos importantes com função antimicrobiana (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2008), inseticida, citotóxica (NEWMAN;CRAGG, 2015) e anticancerígena (NATH *et al.*, 2012) foram descobertos a partir do isolamento e estudo de fungos endofíticos.

Muitos metabólitos secundários obtidos são produzidos por fungos, sendo esta produção maior do que a de qualquer outra classe de microrganismos endofíticos, porém, isso pode ser uma consequência da alta frequência de isolamento desses organismos das plantas (ZHANG *et al.*, 2006).

Os produtos naturais extraídos de fungos endofíticos apresentam um amplo espectro de atividade biológica, e podem ser agrupados em várias categorias, dentre elas alcaloides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides e lignanas, fenol e ácidos fenólicos, metabólitos alifáticos, lactonas, entre outras (ZHANG *et al.*, 2006).

As plantas medicinais são colonizadas por uma grande diversidade de espécies de fungos do gênero *Phomopsis*, com grande variabilidade morfológica e genética intra e interespecíficas. Esses microrganismos são comumente encontrados como patógenos ou endofitos de plantas que podem servir de hospedeiros alternativos para patógenos de culturas economicamente importantes.

Porém, os fungos do gênero *Phomopsis* ocorrem frequentemente como endofíticos, sem causar danos aparentes para o hospedeiro, mas, em condições adversas, podem se tornar patogênicos quando em desequilíbrio com este (AZEVEDO *et al.*, 2000).

O gênero *Phomopsis* é conhecido por ser uma fonte rica e diversificada de metabólitos secundários bioativos de diversas estruturas diferentes, dentre eles antifúngicos, antimaláricos e herbicidas (NATH *et al.*, 2012).

Alguns desses compostos já apresentaram atividade citotóxica significativa *in vitro* e atividade antituberculose. No entanto, muitos ainda estão sem aplicação

devido a sua elevada toxicidade (RUKACHAISIRIKUL *et al.*, 2008; HUSSIAN *et al.*, 2009)

Chapla e colaboradores (2014), corroboram com o exposto afirmando que o estudo do fungo endofítico do gênero *Phomopsis* torna-se importante devido à grande produção de metabólitos secundários bioativos produzidos por esses microrganismos, justificando o estudo químico permanente desses metabólitos.

1.2. Atividade antioxidante de polifenóis e flavonoides

Considera-se que um organismo encontra-se em estado de estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio entre sistemas pró-oxidantes e antioxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica (BARBOSA *et al.*, 2010).

A formação de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio desempenha um papel relevante no organismo, tendo grande importância em uma ampla variedade de doenças. As espécies radicalares e outras espécies reativas podem causar a oxidação de biomoléculas como proteínas, aminoácidos, lipídios e DNA, provocando lesão e morte celular. Espécies reativas de oxigênio (ERO), que são formadas durante a respiração aeróbica celular normal, são a principal causa de danos às células (MCCORD 2000).

O excesso das espécies reativas pode ser combatido por antioxidantes produzidos pelo organismo ou adquiridos de forma exógena. Denominam-se antioxidantes as substâncias, que mesmo em pequenas concentrações, retardam significativamente ou inibem a oxidação de um substrato (BARREIROS *et al.*, 2006).

Uma grande variedade de plantas é intensamente estudada para obtenção de novas fontes de antioxidantes naturais. Existem mais de 8.000 compostos ativos originários de plantas e, dentre os mais importantes, destacam-se os flavonoides, carotenoides, taninos, tocoferóis e outros compostos fenólicos e polifenólicos, havendo evidências de que estes compostos possam exercer as suas funções antioxidantes na promoção da saúde humana (JOACHIM *et al.*, 2004; JORGE *et al.*, 2013).

Dentre as diferentes classes de compostos fitoquímicos, os polifenóis, e em particular os flavonoides, compõem o grupo mais amplo e apresentam maior atividade antioxidante quando comparados a carotenóides e vitaminas, pois possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais livres (BARREIROS *et al.*, 2006; FAZAL *et al.*, 2014).

Os polifenóis exibem notável capacidade para controlar e modular ERO, a toxicidade de metais, inflamações, apoptose, transdução de sinal, canais iônicos e neurotransmissores (BHULLAR *et al.*, 2013). A maioria das características benéficas de compostos fenólicos tem sido atribuída à sua atividade antioxidante, sendo aqueles oriundos de fontes alimentares considerados potentes eliminadores de radicais livres, apresentando importante papel na função antioxidante envolvida na proteção contra a peroxidação lipídica (D'ARCHIVIO *et al.*, 2010; LIYANA-PATHIRANA *et al.*, 2005).

Compostos polifenólicos também podem afetar a modulação da atividade de proteases, especialmente metaloproteinases de matriz. Esta propriedade está associada com a capacidade desses compostos sequestrarem íons de metais polivalentes, que são co-fatores ou fatores catalíticos no centro reativo da enzima (RATZ-ŁYKO *et al.*, 2015).

Os compostos polifenólicos pertencem ao grupo de insumos mais utilizados na cosmetologia moderna, sendo os ativos dermatocosméticos com propriedades antirradical e anti-idade mais empregados na indústria, principalmente devido a suas propriedades antioxidantes. Deve-se considerar também, que além desta função, os compostos polifenólicos apresentam, devido à sua propriedade anti-inflamatória, influência no processo normal de diferenciação e proliferação das células basais da camada epidérmica (RATZ-ŁYKO *et al.*, 2015).

Tanto os efeitos antioxidantes como os pró-oxidantes dos polifenóis em processos celulares fisiológicos já foram descritos. Como antioxidantes, os polifenóis podem melhorar a sobrevivência celular e como pró-oxidantes podem, por exemplo, induzir a apoptose e impedir o crescimento de tumores (SCALBERT *et al.*, 2005).

Os polifenóis também são considerados quimioprotetores do câncer por alguns autores, tendo em vista sua capacidade de extinguir ou impedir a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, as quais desempenham papéis importantes na carcinogênese (YANG *et al.*, 2001).

Uma das principais dificuldades em elucidar os efeitos dos polifenóis sobre a saúde é o grande número de compostos fenólicos encontrados. As principais diferenças da influência de fatores estruturais já estão melhor compreendidas, entretanto o principal fator que prejudica o estudo sobre os polifenóis é a considerável diversidade e complexidade de suas estruturas químicas (SILVA *et al.*, 2007).

Inúmeros fatores podem afetar a quantidade de polifenóis nas plantas e, por conseguinte, a biodisponibilidade posterior em humanos. Dentre eles destacam-se os fatores ambientais, como a exposição ao sol, chuva, diferentes tipos de cultura e produção de frutos pelas plantas. Além disso, o grau de maturação desses afeta as concentrações e proporções de vários compostos polifenólicos em formas diferentes (D'ARCHIVIO *et al.*, 2010).

Durante muitos anos, os polifenóis e outros compostos foram estudados com o objetivo de proteger componentes celulares contra lesões oxidativas por meio da eliminação de espécies reativas, graças às suas propriedades antioxidantes (SCALBERT *et al.*, 2005). Atualmente, este conceito representa uma visão simplista do seu modo de ação, tendo em vista ser mais provável que as células respondam aos polifenóis através de interações diretas com receptores ou enzimas envolvidas na transdução de sinal, podendo resultar na alteração do estado redox da célula e, por consequência, desencadear uma série de reações redox-dependentes (MANACH *et al.*, 2004). Scalbert e colaboradores (2005) corroboram com esse conceito ao afirmarem que os mecanismos de ação dos polifenóis vão muito além da modulação de estresse oxidativo, envolvendo também mecanismos celulares intrínsecos.

Uma pesquisa recente mostrou que os polifenóis dietéticos poderiam ser utilizados no tratamento de manifestações patológicas de distúrbios neurológicos devido a sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHULLAR *et al.*, 2013). Entretanto, segundo D'Archivio e colaboradores (2010), muitas das evidências sobre os efeitos benéficos dos polifenóis advêm de pesquisas realizadas *in vitro* ou em modelos animais, utilizando concentrações muito mais elevadas do que aquelas geralmente encontradas nas dietas humanas. Os autores afirmam ainda que mesmo que um composto apresente forte atividade antioxidante *in vitro* não terá importância científica nenhuma se este mesmo composto não apresentar atividade *in vivo* ou se não conseguir atingir seu sítio alvo. Para os autores os

polifenóis mais abundantes em nossa dieta não serão, necessariamente, aqueles que terão o melhor perfil de biodisponibilidade.

De acordo com Yang e colaboradores (2001) os flavonoides são a maior classe de compostos fenólicos com mais de 5.000 compostos descritos. Eles são principalmente classificados em flavonas, flavonóis (quercetina), isoflavonas, flavanonas e antocianinas. Todos estão estruturalmente relacionados com o composto progenitor flavona (2-fenilbenzopirona).

Embora os flavonoides tenham sido extensivamente estudados, até agora só foram discutidos compostos que podem ser encontrados na natureza. No entanto, alguns organismos hospedeiros possuem a capacidade de bioconversão de moléculas das quais eles se alimentam, para produzir flavonoides não-nativos, denominados flavonoides não naturais (TRANTAS *et al.*, 2015).

Os flavonoides são antioxidantes efetivos devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica. A atividade de sequestro está diretamente ligada ao potencial de oxidação dos flavonoides e das espécies a serem sequestradas. Quanto menor o potencial de oxidação do flavonoide, maior é sua atividade como sequestrador de radicais livres. A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica. Além destes efeitos importantes, os flavonoides têm propriedades estabilizadoras de membrana, podendo afetar alguns processos do metabolismo intermediário (BARREIROS *et al.*, 2006).

Barreiros e colaboradores (2006) afirmam ainda que a atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores: reatividade como agente doador de H ou elétrons, estabilidade do radical flavanoil formado, reatividade frente a outros antioxidantes, capacidade de quelar metais de transição, solubilidade e interação com as membranas celulares.

É sabido que os flavonoides podem ser encontrados em quase todas as plantas terrestres, compreendendo um grande grupo de compostos naturais provenientes do metabolismo de fenilpropanóide, que evoluiu em plantas para produzir um variado número de estruturas de flavonoides inter-relacionadas (TRANTAS *et al.*, 2015). Nos últimos anos, os flavonoides tornaram-se importantes alvos de pesquisa na indústria farmacêutica, a qual está continuamente à procura de

novas maneiras de produzir medicamentos seguros e eficientes, assim como desenvolver novas formulações.

Além disso, culturas de células microbianas podem ser utilizadas como bio-fábricas, oferecendo suas máquinas metabólicas com a finalidade de otimizar as condições e aumentar a produtividade de um flavonoide específico de interesse (TRANTAS *et al.*, 2015).

A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 1). Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides como flavonóis (quercetina), flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianidina.

Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação. Os flavonoides de origem natural apresentam-se, frequentemente, oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares.

Esta forma conjugada, também, é chamada heterosídeo. São denominados O-heterosídeos quando a ligação se dá por intermédio de uma hidroxila e de C-heterosídeos quando a ligação se dá com um átomo de carbono (SIMÕES *et al.*, 2007).

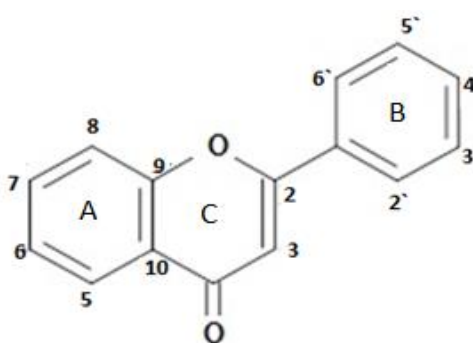


Figura 1. Estrutura química básica dos flavonoides

1.3. Influência das condições de cultivo na produção de metabólitos secundários.

Os parâmetros de cultivo são fatores críticos para a produção de metabólitos secundários por um organismo. Mesmo pequenas modificações no meio de cultura podem impactar a produção de certos compostos, como também influenciar no perfil geral de seus metabólitos secundários. Por esta razão, a escolha das condições adequadas é crucial para a obtenção de compostos antioxidantes de origem microbiológica ou vegetal. Além disso, as condições de extração não podem ser generalizadas devido à natureza diversificada de antioxidantes naturais existentes nos diferentes materiais vegetais e microbiológicos (VANDERMOLEN *et al.*, 2013).

Sabendo que os microrganismos são capazes de modificarem suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com a condição nutricional a que são expostos, o rendimento de compostos bioativos, muitas vezes, pode ser substancialmente aumentado pela otimização de alguns fatores físico-químicos como temperatura, salinidade, valor de pH, luz ou por modificações nos componentes do meio, presença de precursores ou inibidores (WANG *et al.*, 2011; LIYANA-PATHIRANA *et al.*, 2005; MIAO *et al.*, 2006; KIRANMAYI *et al.*, 2011).

Brakhage (2013) acrescenta que os metabólitos secundários podem ser produzidos apenas em condições específicas e sua biossíntese está sujeita a diversos reguladores como intensidade luminosa, temperatura, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, comunicação interespecie e escassez de ferro (Figura 2). Em razão disso, muitos genes responsáveis pela biossíntese desses metabólitos podem mostrar pouca ou nenhuma expressão em condições laboratoriais normais e, por conseguinte, deixam de produzir ou reduzem a produção de metabólitos secundários específicos a ponto de não serem mais detectáveis por métodos analíticos padrões.

A maioria dos mecanismos de sinalização descritos permitem que microrganismos individuais ou em populações possam responder a alterações ambientais, que estão associadas com a depleção de nutrientes. Tais condições são comuns na natureza, mas, mesmo no laboratório, os microrganismos necessitam reter propriedades que lhes permitem sobreviver sob condições de crescimento não ideais (PALKOVÁ *et al.*, 2004).

Pesquisa recente realizada por Kumar e colaboradores (2015) ratifica que a produção de metabólitos secundários depende significativamente das espécies de

microrganismos, de sua condição nutricional e das condições de cultura. Segundo os autores, pequenas variações na composição dos meios de fermentação desempenham um papel importante na quantidade e qualidade da produção de metabólitos secundários.

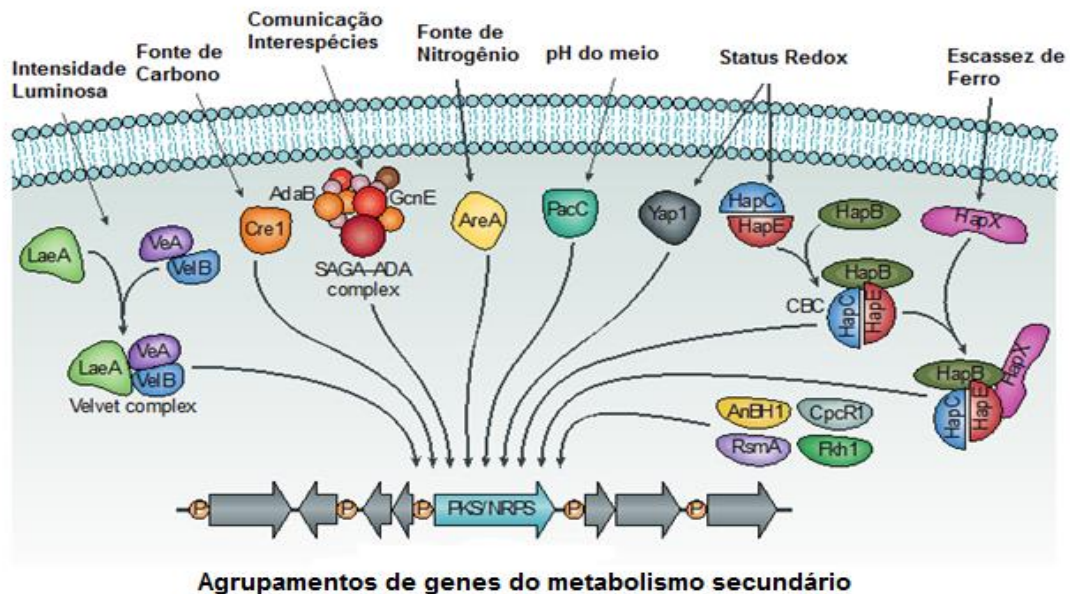


Figura 2. Proteínas globais reguladoras envolvidas na regulação de agrupamentos de genes do metabolismo secundário de vários fungos. Essas proteínas reguladoras respondem a estímulos ambientais e modulam a expressão dos genes. Extraído e adaptado de Brakhage, 2013.

1.4. Importância do uso de abordagens estatísticas na modificação das condições de cultivo visando ao aumento da produção de metabólitos secundários.

É de suma importância a melhoria da performance de sistemas, visando ao aumento do rendimento de processos sem elevação de custos. A metodologia utilizada para atingir esse objetivo chama-se otimização (CUNICO *et al.*, 2008).

De acordo com Silva e colaboradores (2007), quando se modifica apenas um parâmetro por vez, enquanto se mantém os demais em um nível constante, este procedimento se chama técnica ou metodologia de uma variável por vez. Para os autores essa abordagem tradicional de uma variável por vez na otimização de processo é demorada e as interações entre os diversos fatores podem ser ignoradas, sendo essa sua principal desvantagem. Portanto, a oportunidade de se

aproximar de um resultado verdadeiro é muito improvável. Além disso, esse procedimento, ao pressupor que vários parâmetros não interajam, deixará a resposta do processo em função direta de um único parâmetro variado.

Entretanto, já se sabe que a resposta real de um processo, geralmente resulta da influência interativa de diversas variáveis (BEZERRA *et al.*, 2008).

Peralta-Zamora e colaboradores (2005) afirmam que, nos sistemas químicos, as variáveis costumam se correlacionar fortemente, interagindo por meio de mecanismos que proporcionam efeitos sinérgicos e antagônicos e quando esses efeitos são ignorados o processo de otimização apresenta pouco valor.

Visando superar essa dificuldade, estudos de otimização de processos passaram a adotar desenhos experimentais e a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) (SILVA *et al.*, 2007).

Um experimento de superfície de resposta é um conjunto de técnicas avançadas de planejamento de experimentos que ajudam a entender e otimizar melhor a resposta (CHAICHANAN *et al.*, 2014).

Barros *et al.* (2010) afirmam que a atividade estatística mais importante não é a análise de dados, e sim o planejamento dos experimentos em que esses dados devem ser obtidos e, quando isso não é feito de forma adequada, o resultado muitas vezes é uma montanha de números estéreis, da qual nenhum estatístico conseguiria extrair ou chegar a qualquer conclusão.

Diferentes abordagens estatísticas podem ser utilizadas para otimizar o meio de crescimento e as condições de fermentação em cultivo de microrganismos. Na metodologia de análise de superfície de resposta são realizados planejamentos fatoriais, para cujos resultados são ajustados modelos matemáticos (FANG *et al.*, 2010).

Dentre as inúmeras vantagens conferidas com o emprego da estatística encontramos a redução de custos e do tempo de trabalho, a diminuição de variabilidades e aumento do rendimento da produção de metabólitos secundários (BARROS *et al.*, 2010).

Segundo Kumar e Satyanayana (2007), as abordagens estatísticas podem ser adotadas nas diferentes fases de uma estratégia de otimização.

1.4.1. O Planejamento Fatorial e o *Design of Experiments* (DOE)

Processos químicos e bioquímicos são influenciados por vários parâmetros, por essa razão não é possível identificar o efeito de todos eles de uma vez e se faz necessário selecionar aqueles que exercem maior influência no processo, logo o planejamento fatorial deve ser utilizado para esse objetivo (BARROS *et al.*, 2010).

A utilização do método de planejamento fatorial, em estudos que abrangem muitas variáveis, é importante uma vez que torna possível a realização, de maneira organizada, de uma quantidade mínima necessária de experimentos, economizando tempo e recursos financeiros (SILVA *et al.*, 2008).

Entretanto, de acordo com Cunico e colaboradores (2008) o planejamento fatorial não determina valores ótimos em uma única etapa, mas indica satisfatoriamente o caminho a ser tomado para que se possa atingir o objetivo proposto. Os sistemas multivariados fundamentados em planejamento fatorial de experimentos permitem avaliar interações entre as variáveis analisadas, o que favorece estudos de otimização, a partir de um reduzido número de experimentos (CUNICO *et al.*, 2008).

O Planejamento de Experimentos (em inglês *Design of Experiments*, DOE) é uma técnica utilizada para se planejar experimentos, ou seja, para definir quais são os dados, em que quantidade e em que condições devem ser coletados em um determinado experimento. Ela visa atingir dois grandes objetivos: a maior precisão estatística possível na resposta e o menor custo. É, portanto, uma técnica de extrema importância para a indústria, tendo em vista que seu emprego permite resultados mais confiáveis. A sua aplicação no desenvolvimento de novos produtos faz-se importante na medida em que proporciona uma maior qualidade aos resultados dos testes e conduz o projeto a um desempenho superior, seja em termos de características funcionais como também em robustez (TAHARA, 2008).

Segundo Colombari (2004), a grande vantagem da utilização da metodologia de planejamento experimental ou análise de experimentos é definir de forma clara e objetiva quais os fatores que interferem com maior intensidade no resultado final (saída) e quais são os parâmetros (ajustes) que levarão ao melhor resultado final.

Os autores afirmam que um experimento projetado ou devidamente planejado consiste em uma série de testes ou experimentos nos quais se induzem mudanças deliberativas nas variáveis de entrada do processo de maneira que seja possível

observar e identificar as causas das mudanças nas respostas ou variáveis de saída que são resultados da interação de fatores.

A utilização das técnicas estatísticas de planejamento experimental apresenta inúmeras vantagens, dentre elas: a redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação; o estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos; a determinação da confiabilidade dos resultados; a realização da pesquisa em etapas num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios; a seleção das variáveis que influenciam num processo com número reduzido de ensaios; a representação do processo estudado por meio de expressões matemáticas e a elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos (BUTTON, 2005).

1.4.2. Análise ou Metodologia de Superfície de Resposta (MSR)

Quando o objetivo principal da pesquisa é otimizar o sistema, isto é, maximizar ou minimizar algum tipo de resposta, pode ocorrer que, ao mesmo tempo, também se tenha que satisfazer determinados critérios, como produzir a máxima quantidade de um determinado produto ao menor custo possível. Nessas situações, uma técnica conveniente é a metodologia de superfície de resposta, que é o método de otimização mais popular usado nos últimos anos (BASRI *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2008).

BAŞ (2007) afirma que a MSR apresenta várias vantagens quando comparada a métodos experimentais clássicos em que apenas uma variável é analisada por vez.

Segundo o autor, com a MSR torna-se possível a observação de efeitos de interação de parâmetros independentes, sozinhos ou em combinação nos processos, que podem ser utilizados para definir as relações entre a resposta e as variáveis independentes. Em processos bioquímicos essas reações podem provocar efeitos críticos de sinergismo, adição ou antagonismo. Assim, a MSR consiste em uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas que tem sido utilizada com sucesso para desenvolver, melhorar e otimizar metodologias, minimizando tempo e custos (LIYANA-PATHIRANA *et al.*, 2005; BASRI *et al.*, 2007).

Wang e colaboradores (2011) reiteram que a metodologia de superfície de resposta é um método estatístico eficiente utilizado para otimização de múltiplas

variáveis com um número mínimo de experimentos. A principal vantagem do MSR é a necessidade de um número reduzido de ensaios experimentais necessários para fornecer informação suficiente para obtenção de um resultado estatisticamente aceitável.

A MSR tem aplicação importante na concepção, desenvolvimento e formulação de novos produtos, bem como na melhoria da performance daqueles já existentes (ZANG *et al.*, 2015).

Souagui e colaboradores (2015) afirmam que a MSR é um método poderoso quando se quer otimizar a produção de um determinado metabólito secundário alvo.

A metodologia de superfície de resposta foi introduzida por G. E. P. Box na década de 1950 e, desde então, tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais, por permitir a avaliação dos efeitos de diversas variáveis de processo e suas interações sobre as variáveis de resposta (BARROS *et al.*, 2010).

De acordo com Bezerra e colaboradores (2008), a aplicação da metodologia de superfície de resposta como técnica de otimização exige algumas etapas preliminares de análise dentre as quais: a seleção de variáveis independentes que apresentem efeitos sobre o sistema por meio do rastreio e da delimitação da região experimental, a escolha do delineamento experimental, o tratamento matemático-estatístico dos dados experimentais obtidos através do ajuste de uma função polinomial, a avaliação da adequação do modelo, a verificação da necessidade e da possibilidade de se realizar um deslocamento em direção à região ótima e a obtenção dos valores ideais para cada variável estudada.

Para Barros e colaboradores (2010) a MSR tem duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Elas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. Os autores afirmam que a modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos simples como os lineares ou quadráticos a respostas obtidas com planejamentos fatoriais ou planejamentos fatoriais ampliados. Já o deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Otimizar as condições de cultivo do fungo endofítico *Phomopsis sp.*, visando ao aumento da produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Modificar as condições de cultivo padrão do fungo *Phomopsis sp.* em meio líquido para obtenção dos extratos dos metabólitos produzidos.
- ✓ Quantificar, utilizando métodos colorimétricos, os polifenóis e flavonoides totais dos extratos produzidos em diferentes condições de cultivo.
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos dos metabólitos produzidos pelo fungo *Phomopsis sp.* em diferentes condições de cultivo.
- ✓ Aplicar a Metodologia de Planejamento Fatorial e Análise de Superfícies de Respostas para avaliar a influência dos fatores de cultivo testados na produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante pelo fungo *Phomopsis sp.*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Equipamentos

- Capela de Fluxo Laminar ESCO CLASS II TYPE A2
- Evaporador Rotativo HEIDOLPH LABOROTA 4010
- Agitador Vortex Mixer FISHER SCIENTIFIC
- Agitador CORNING STIRRER
- Espectrofotômetro SHIMADZU UV 1800
- Espectrofotômetro Multimode Detector DXT 800 BECKMAN COULTER
- Centrífuga a vácuo 117 LABCONCO
- Balança MARTE BL 3200H
- Balança de precisão SHIMADZU AY220
- pHmetro 3510 JENWAY
- Bomba a vácuo Q355B QUIMIS
- Shaker incubadora Innova 44 NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC

3.2. Métodos

3.2.1. Cultivo e conservação do fungo endofítico em meio sólido.

O fungo endofítico, previamente isolado de folhas de *B. variegata* (MESQUITA, 2012), foi cultivado em 8 mL de meio sólido ágar Sabouraud-dextrose (ACUMEDIA) em tubos de ensaio inclinados (método de *slant*) por sete dias em estufa a 30°C. Para sua conservação foi acrescentado óleo mineral esterilizado ao tubo de ensaio e estes foram mantidos refrigerados a 4°C (microrganismo de trabalho) ou a -20°C (microrganismo estoque).

3.2.2. Cultivo do fungo em cultura submersa utilizando diferentes meios de cultura

Após 7 dias de crescimento em estufa a 30°C os fungos *Phomopsis sp.*, cultivados em ágar Sabouraud-dextrose (*slants*), foram recolhidos com o auxílio de uma alça de platina estéril e inoculados nos meios de cultura líquida, previamente esterilizados. Em seguida, foram submetidos a um processo de fermentação em cultura submersa realizada em uma ou duas etapas, dependendo do ensaio.

Inicialmente foram inoculados em frascos erlenmeyer de 250 mL de capacidade, contendo 50 mL de meio líquido batata-dextrose (Potato Dextrose Broth – Sigma Aldrich), Sabouraud-dextrose (ACUMEDIA) ou meio fermentativo de Jackson (JACKSON *et al.*,1993) estéreis, e incubados sob agitação (150 rpm) a 28°C por 48h (pré-inóculo). Em seguida, todo o conteúdo foi transferido para um erlenmeyer de capacidade para 1000 mL, contendo 250 mL do mesmo meio usado na primeira etapa e novamente incubados a 28°C sob agitação (150 rpm) por 72 h (Figura 3). O mesmo ensaio foi conduzido excluindo-se a primeira etapa de cultivo e inoculando o fungo diretamente nos 250 mL de meio, sob as mesmas condições de incubação (Figura 4).

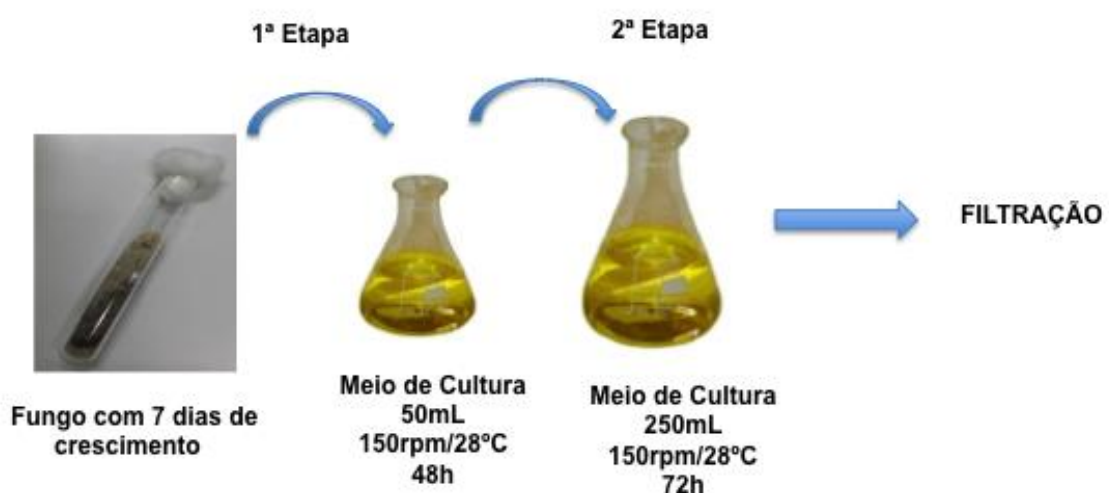


Figura 3. Cultivo do fungo *Phomopsis sp.* em cultura submersa realizado em 2 etapas.

De acordo com o delineamento experimental utilizado, o número total de combinações experimentais no ensaio dos polifenóis e flavonoides foi $r(2^k + 2k + cp)$, onde r representa o número de repetições, k é o número de variáveis independentes e cp é o número de repetições dos experimentos no ponto central. No ensaio da avaliação da atividade antioxidante (DPPH·) o número total de combinações foi $r.(2^k + 2k) + cp$.

As variáveis dependentes (respostas preditas: quantidade de polifenóis, quantidade de flavonoides e atividade antioxidante) foram ajustadas por um modelo de segunda ordem para correlacioná-las às variáveis independentes.

O modelo matemático geral da regressão de segunda ordem aplicado foi:

$$Y = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_{ij} + \sum \beta_{iix^2} x_i^2$$

onde Y é a medida de resposta, β_0 é o intercepto, β_i , β_{ij} e β_{iix^2} são medidas dos efeitos das variáveis x_i , x_{ij} e x_i^2 , respectivamente. A variável x_{ij} representa a interação de primeira ordem entre as variáveis x_i e x_j ($i < j$).

Para a otimização da produção de polifenóis totais e flavonoides (variáveis respostas), foi realizado delineamento experimental fatorial 2^3 (DFC) com três variáveis independentes, cada uma em três níveis (-1, 0, +1) com dois pontos axiais e três repetições nos pontos centrais que conduzem a um total de 45 ensaios com 27 condições experimentais distintas (Tabela 2).

Já para a otimização da atividade antioxidante (variável resposta do ensaio do DPPH·) foi realizado delineamento experimental 2^3 (DFC) com três variáveis independentes, cada uma em três níveis (-1, 0, +1), dois pontos centrais e uma repetição, totalizando 16 ensaios com 15 condições experimentais distintas (Tabela 3).

Tabela 1. Variáveis independentes, níveis decodificados e nome das respostas.

Variáveis independentes	Unidade	Níveis			Variáveis dependentes – respostas previstas	Unidade
		-1	0	+1		
Peptona (x1)	g/L	10	15	20	Polifenóis	mg/mg
pH inicial do meio (x2)		4,6	5,6	6,6	Flavonoides	µg/mg
Temperatura de incubação (x3)	°C	23	28	33	Atividade antioxidante	%

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial 2^3 (n = 3) no modelo de delineamento de faces centradas para a otimização da produção de polifenóis e flavonoides pelo fungo *Phomopsis sp.*

Ensaio	<u>Níveis Codificados</u>			<u>Níveis Decodificados</u>		
	x1	x2	x3	Concentração inicial de peptona no meio de cultura (g/L)	pH inicial do meio	Temperatura de incubação (°C)
1	-1	-1	-1	10	4,6	23
2	+1	-1	-1	10	6,6	23
3	-1	+1	-1	10	4,6	33
4	+1	+1	-1	10	6,6	33
5	-1	-1	+1	20	4,6	23
6	+1	-1	+1	20	6,6	23
7	-1	+1	+1	20	4,6	33
8	+1	+1	+1	20	6,6	33
9	-1	0	0	15	4,6	28
10	+1	0	0	15	6,6	28
11	-1	-1	0	15	5,6	23
12	+1	+1	0	15	5,6	33
13	-1	0	-1	10	5,6	28
14	+1	0	+1	20	5,6	28
15	-1	-1	-1	10	4,6	23
16	+1	-1	-1	10	6,6	23
17	-1	+1	-1	10	4,6	33
18	+1	+1	-1	10	6,6	33
19	-1	-1	+1	20	4,6	23
20	+1	-1	+1	20	6,6	23
21	-1	+1	+1	20	4,6	33
22	+1	+1	+1	20	6,6	33
23	-1	0	0	15	4,6	28
24	+1	0	0	15	6,6	28
25	0	-1	0	15	5,6	23
26	0	+1	0	15	5,6	33
27	0	0	-1	10	5,6	28
28	0	0	+1	20	5,6	28
29	-1	-1	-1	10	4,6	23
30	+1	-1	-1	10	6,6	23
31	-1	+1	-1	10	4,6	33
32	+1	+1	-1	10	6,6	33
33	-1	-1	+1	20	4,6	23
34	+1	-1	+1	20	6,6	23
35	-1	+1	+1	20	4,6	33
36	+1	+1	+1	20	6,6	33
37	-1	0	0	15	4,6	28
38	+1	0	0	15	6,6	28
39	0	-1	0	15	5,6	23
40	0	+1	0	15	5,6	33
41	0	0	-1	10	5,6	28
42	0	0	+1	20	5,6	28
43	0	0	0	15	5,6	28
44	0	0	0	15	5,6	28
45	0	0	0	15	5,6	28

Tabela 3. Matriz do planejamento fatorial 2^3 (n = 1) no modelo de delineamento de faces centradas para a otimização da produção de metabólitos com atividade antioxidante pelo fungo *Phomopsis* sp.

Ensaio	Níveis Codificados			Níveis Decodificados		
	x1	x2	x3	Concentração inicial de peptona no meio de cultura (g/L)	pH inicial do meio	Temperatura de incubação (°C)
1	-1	-1	-1	10	4,6	23
2	+1	-1	-1	10	6,6	23
3	-1	+1	-1	10	4,6	33
4	+1	+1	-1	10	6,6	33
5	-1	-1	+1	20	4,6	23
6	+1	-1	+1	20	6,6	23
7	-1	+1	+1	20	4,6	33
8	+1	+1	+1	20	6,6	33
9	-1	0	0	15	4,6	28
10	+1	0	0	15	6,6	28
11	0	-1	0	15	5,6	23
12	0	+1	0	15	5,6	33
13	0	0	-1	10	5,6	28
14	0	0	+1	20	5,6	28
15	0	0	0	15	5,6	28
16	0	0	0	15	5,6	28

3.2.5. Obtenção do extrato dos metabólitos produzidos pelo fungo

Após 72 horas de cultivo, o conteúdo de cada frasco Erlenmeyer usado no processo fermentativo foi filtrado utilizando um conjunto de Kitassato, funil de Büchner, papel de filtro Watman número 1 estéreis e bomba a vácuo em ambiente asséptico (capela de fluxo laminar). A massa micelial úmida obtida foi pesada e o líquido submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila. A fração orgânica obtida foi evaporada a vácuo para secagem. O extrato orgânico seco obtido foi pesado e reconstituído com 1 mL de metanol.

3.2.6. Quantificação de polifenóis totais

Para quantificação dos polifenóis totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton e Rossi (1965). Foram adicionados 20 µL do extrato dos metabólitos produzidos pelo fungo diluído em metanol à 250 µL de solução aquosa de carbonato de sódio a 10% e a 250 µL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu 1N. O volume final da reação foi completado para 2,5 mL com água destilada e a mistura reacional foi agitada com auxílio de um agitador de tubo do tipo Vortex.

Decorridos 60 min, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 760 nm. O ácido gálico foi utilizado para obtenção da curva padrão (Figura 10) e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico por massa de extrato total obtido (EAG/mg).

3.2.7. Quantificação de flavonoides totais

Para a quantificação de flavonoides totais nos extratos, foi utilizado o método do cloreto de alumínio descrito por Georgetti e colaboradores, 2006. À 100 µL do extrato foram adicionados 1900 µL de metanol e 500 µL de solução de $AlCl_3$ a 5%.

A mistura foi agitada em agitador de tubo do tipo Vortex. Decorridos 30 min, a absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 425 nm. A quercetina foi utilizada para obtenção da curva padrão (Figura 9). O branco foi preparado por adição de 500 µL de solução de $AlCl_3$ a 5% a 2.000 µL de metanol. Os resultados

foram expressos como equivalentes de quercetina por massa de extrato total obtido (EQ/mg).

3.2.8. Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada utilizando-se o método do DPPH· (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) descrito por Molyneux, 2004, que consiste na transferência de elétrons, em que por ação de um antioxidante ou espécie radicalar, o DPPH·, que possui cor púrpura, é reduzido formando difenil-picril-hidrazina de coloração amarela, com consequente decaimento da absorção.

Neste ensaio utilizou-se 100 µL do extrato metanólico dos metabólitos produzidos pelo fungo em 100 µL de solução de DPPH· 200 µM em placas de 96 poços e, após 15 min, foi feita leitura a 492 nm em espectrômetro. Para o branco foi adicionado 100 µL da solução 200 µM DPPH· a 100 µL de metanol.

A capacidade de redução do radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \frac{A_{\text{controle(-)}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle(-)}}} \times 100$$

Onde: $A_{\text{controle(-)}}$ = absorbância da solução de DPPH· sem a amostra

A_{amostra} = absorbância da solução de DPPH· com a amostra

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de oxidação em que a porcentagem de atividade antioxidante é correspondente à quantidade de DPPH· consumida pelo antioxidante.

3.2.9. Análise Estatística

Os dados experimentais foram inicialmente explorados de forma descritiva, por meio de medidas de tendência central, variabilidade e simetria. A análise gráfica foi realizada por meio do *Box plot*, ou diagrama de caixa, que capta importantes aspectos de um conjunto de dados através do resumo de medidas de quartis, mínimos e máximos. Essa análise foi realizada pelo software IBM® SPSS® (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 21, 2012.

O software *Protimiza Experimental Design* (Rodrigues, M. I. & Costa, P.; Brasil, 2014) foi utilizado para as análises gráficas e de regressão. A análise estatística do modelo foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). A análise incluiu o teste F de Fisher (significância do modelo total), sua probabilidade associada $P(F)$, coeficiente de correlação R , e coeficiente de determinação R^2 , que mede o ajuste do modelo de regressão. A análise também incluiu o valor t de *Student* para os coeficientes estimados e suas probabilidades associadas $P(t)$. Para cada variável, os modelos quadráticos foram representados por meio de gráficos de contorno.

4. RESULTADOS

4.1. Triagem inicial dos meios de cultivo

A otimização dos processos de produção de metabólitos secundários bioativos é importante na biotecnologia, uma vez que são desejados altos rendimentos a partir de matéria-prima abundante e de fácil obtenção (VENIL *et al.*, 2015).

Visando a um aumento da produção de metabólitos secundários (flavonoides e polifenóis) com atividade antioxidante foi primeiramente efetuada uma triagem em que o fungo *Phomopsis sp.*, que já fora previamente isolado e identificado em nosso laboratório por Mesquita (2012), foi submetido a crescimento em três diferentes meios de cultura (batata-dextrose, Sabouraud-dextrose e meio fermentativo de Jackson), à temperatura de 28°C e agitação de 150 rpm, por 48 h (pré-inóculo).

Em seguida foi transferido para um meio fermentativo de mesma composição e incubado por 72 h (JACKSON *et al.*, 1993), nas mesmas condições de temperatura e agitação.

Uma segunda bateria de testes foi realizada com os mesmos meios de cultura e condições de cultivo sem, entretanto, serem submetidos à incubação prévia de 48h (sem pré-inóculo). A análise dos resultados obtidos por meio dos ensaios de quantificação de flavonoides revelou que a quantidade de flavonoides nos extratos dos metabólitos produzidos pelo fungo *Phomopsis sp.* provenientes de culturas que passaram pela etapa do pré-inóculo, à temperatura de 28°C, apresentou um melhor rendimento em meio Sabouraud-dextrose (Figura 7) quando comparado àqueles realizados sem o pré-inóculo (Figura 5); enquanto que a melhor produção de polifenóis totais foi encontrada no cultivo do fungo em meio batata-dextrose também após crescimento prévio em meio fermentativo (Figura 8) quando comparado ao crescimento no mesmo meio de cultivo, porém sem o pré-inóculo (Figura 6). Concluiu-se, portanto, que o aumento do tempo de incubação do fungo na pré-cultura com o intuito de aumentar a massa micelial, levou a um aumento da produção de metabólitos secundários.

Sabendo-se que, dentre os polifenóis, os flavonoides, em particular, possuem estruturas ideais para o sequestro de radicais livres e, por isso, são considerados antioxidantes efetivos (BARREIROS *et al.*, 2006; TRANTAS *et al.*, 2015), optou-se

por prosseguir a otimização das condições de cultivo do fungo *Phomopsis sp.*, utilizando o meio líquido Sabouraud-dextrose com a etapa de pré-inóculo, por esta condição ter proporcionado o melhor rendimento de flavonoides (Figura 7).

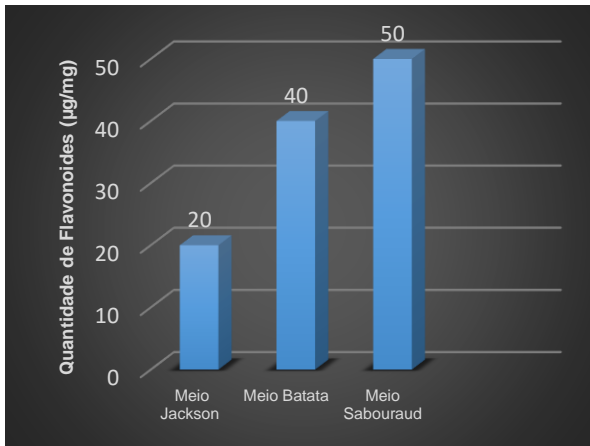


Figura 5. Quantidade de flavonoides (µg/mg) nos extratos produzidos pelo cultivo do fungo sem a etapa de pré-inóculo.

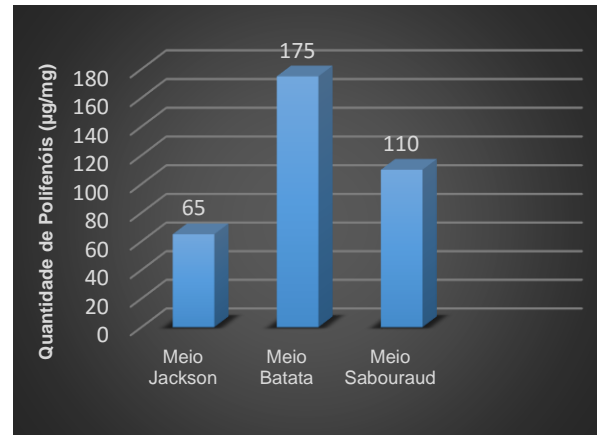


Figura 6. Quantidade de polifenóis (µg/mg) nos extratos produzidos em cultivo do fungo sem a etapa de pré-inóculo.

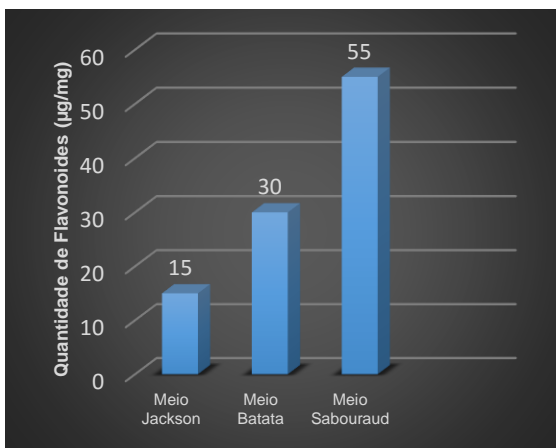


Figura 7. Quantidade de flavonoides (µg/mg) nos extratos produzidos pelo cultivo do fungo com a etapa de pré-inóculo.

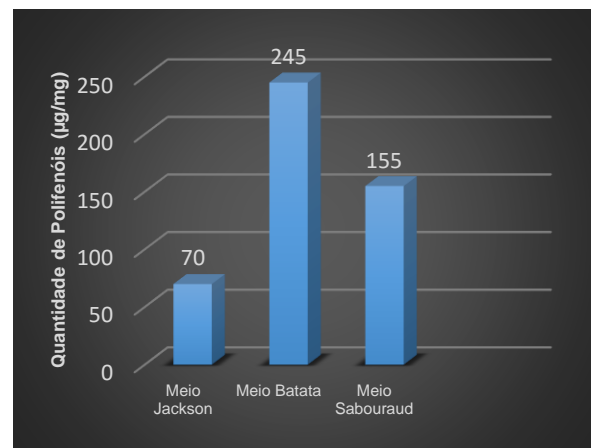


Figura 8. Quantidade de polifenóis (µg/mg) nos extratos produzidos pelo cultivo do fungo com a etapa de pré-inóculo.

As figuras 9 e 10 mostram as curvas padrão utilizadas nos ensaios colorimétricos de quantificação de flavonoides e quantificação e polifenóis, respectivamente.

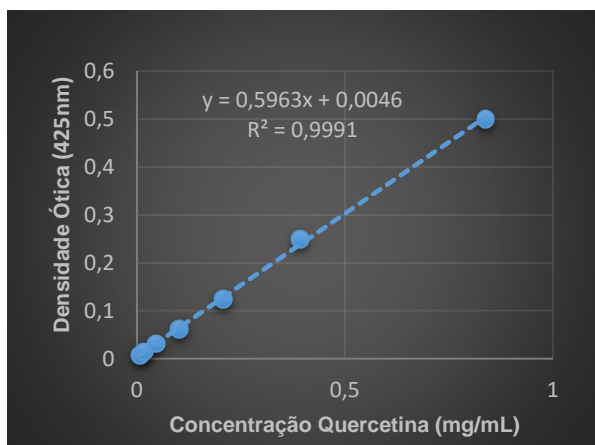


Figura 9. Curva Padrão de Quercetina (mg/mL) empregada no ensaio dos flavonoides.

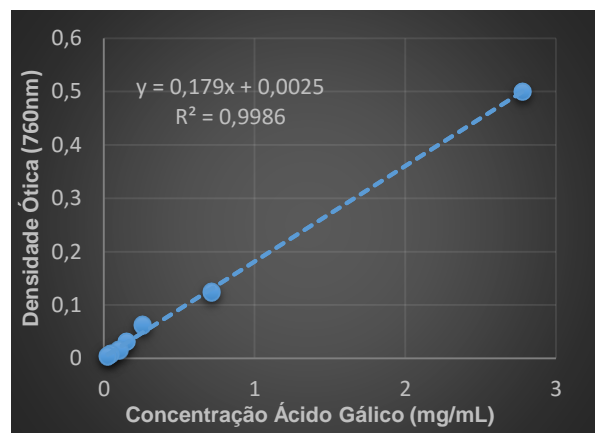


Figura 10. Curva Padrão de Ácido Gálico (mg/mL) empregada no ensaio dos polifenóis.

4.2. Cultivo do fungo em cultura submersa, em caldo Sabouraud-dextrose, com variação de condições de temperatura, pH e concentração de peptona

Após a triagem preliminar foram realizadas modificações nas condições de cultivo do pré-inóculo e do meio fermentativo de Sabouraud-dextrose (ACUMEDIA), objetivando a otimização da produção de metabólitos com atividade antioxidante pelo fungo *Phomopsis sp.* Foram avaliadas, portanto, as variáveis de cultivo temperatura de incubação, pH inicial e concentração de peptona (fonte de nitrogênio) do meio líquido de cultura em ensaio realizado em triplicata.

4.2.1. Análise Descritiva dos resultados

A análise descritiva foi realizada no programa IBM® SPSS®. O objetivo inicial foi avaliar a distribuição dos dados experimentais através de estatísticas descritivas como média, mediana, variância, desvio padrão, mínimo, máximo, intervalo, intervalo interquartil, assimetria e curtose. Com isso é possível avaliar se os dados estão distribuídos de forma uniforme ou muito agrupados (DANCEY; REDY, 2013).

A análise gráfica de Box-plot (ou caixa e bigodes) mostra visualmente essa distribuição dos dados para cada variável: concentração de peptona, pH e temperatura de incubação em relação às variáveis dependentes (respostas preditas) quantidade de polifenóis e quantidade de flavonoides.

Os valores descritivos para peptona em relação a quantidade de polifenóis (Tabela 4) e flavonoides (Tabela 5) são mostrados abaixo.

Tabela 4. Valores descritivos para a variável concentração de peptona em relação à variável resposta quantidade de polifenóis.

Peptona (g/L)			Estatística	Erro Padrão			
Polifenóis	10	Média	58,8660	4,51275			
		95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior Limite superior	49,1871 68,5449			
		5% da média aparada		59,4106			
		Mediana		56,3600			
		Variância		305,474			
		Desvio Padrão		17,47782			
		Mínimo		21,88			
		Máximo		86,05			
		Intervalo		64,17			
		Intervalo interquartil		29,28			
		Assimetria		-,370	,580		
		Curtose		-,274	1,121		
			15	Média	43,2847	4,21923	
				95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior Limite superior	34,2353 52,3340	
				5% da média aparada		43,6030	
Mediana				41,4700			
Variância				267,028			
Desvio Padrão				16,34100			
Mínimo				11,49			
Máximo				69,35			
Intervalo				57,86			
Intervalo interquartil				19,57			
Assimetria				-,267	,580		
Curtose				-,368	1,121		
	20			Média	71,6627	6,11355	
				95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior Limite superior	58,5504 84,7749	
				5% da média aparada		71,3935	
		Mediana		71,7300			
		Variância		560,632			
		Desvio Padrão		23,67768			
		Mínimo		39,02			
		Máximo		109,15			
		Intervalo		70,13			
		Intervalo interquartil		43,00			
		Assimetria		,021	,580		
		Curtose		-1,298	1,121		

Tabela 5. Valores descritivos para a variável concentração de peptona em relação à variável resposta quantidade de flavonoides.

		Peptona (g/L)		Estatística	Erro Padrão
Flavonoides	10	Média		161,5840	22,83224
		95% Intervalo de	Limite inferior	112,6137	
		Confiança para Média	Limite superior	210,5543	
		5% da média aparada		158,5072	
		Mediana		133,3500	
		Variância		7819,670	
		Desvio Padrão		88,42890	
		Mínimo		55,06	
		Máximo		323,49	
		Intervalo		268,43	
		Intervalo interquartil		159,17	
		Assimetria		,814	,580
		Curtose		-,805	1,121
			15	Média	
		95% Intervalo de	Limite inferior	46,5045	
		Confiança para Média	Limite superior	69,5328	
		5% da média aparada		57,5085	
		Mediana		53,9300	
		Variância		432,301	
		Desvio Padrão		20,79184	
		Mínimo		18,61	
		Máximo		106,61	
		Intervalo		88,00	
		Intervalo interquartil		19,31	
		Assimetria		,463	,580
		Curtose		1,455	1,121
	20	Média		125,3247	22,41738
		95% Intervalo de	Limite inferior	77,2442	
		Confiança para Média	Limite superior	173,4052	
		5% da média aparada		119,2385	
		Mediana		96,0700	
		Variância		7538,082	
		Desvio Padrão		86,82213	
		Mínimo		26,24	
		Máximo		333,96	
		Intervalo		307,72	
		Intervalo interquartil		119,32	
		Assimetria		1,284	,580
		Curtose		1,029	1,121

A análise gráfica de *Box-plot* permite visualizar a distribuição dos dados para cada variável. No caso da concentração de peptona no meio (Figura 11), observa-se que os maiores valores de polifenóis foram encontrados no meio com a concentração de peptona de 20 g/L, com dados mais simétricos. Quando as concentrações de peptona usadas foram 10 e 15 g/L os dados foram mais assimétricos e com menor intervalo.

Em relação aos flavonoides (Figura 12), a maior produção foi encontrada no meio com 10 g/L de peptona, com grande intervalo. Para a concentração de peptona de 15 g/L o intervalo foi pequeno, mas houve 2 dados discrepantes. Para o meio com 20 g/L de peptona, a análise dos dados de produção de flavonoides mostrou um intervalo grande com 1 dado discrepante.

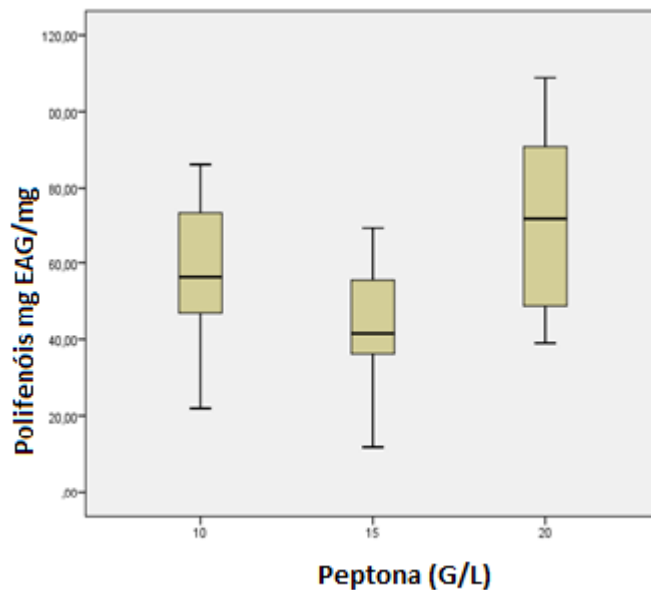


Figura 11. Box-plot dos dados de concentração de peptona (g/L) no meio em relação à produção de polifenóis (mg EAG/mg).

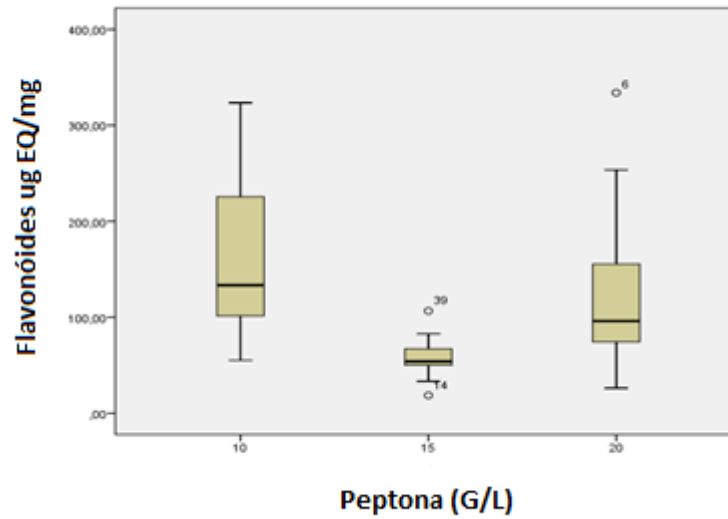


Figura 12. *Box-plot* dos dados de concentração de peptona no meio em relação à produção de flavonoides (ug EQ/mg).

Os valores descritivos para a variável independente pH inicial do meio em relação à produção de polifenóis (Tabela 6) e flavonoides (Tabela 7) são mostrados nas tabelas seguintes.

Tabela 6. Valores descritivos para a variável pH inicial do meio em relação à variável resposta produção de polifenóis.

pH			Estatística	Erro Padrão	
Polifenóis	4,6	Média	62,7560	6,11259	
		95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	49,6458	
			Limite superior	75,8662	
		5% da média aparada		62,4383	
		Mediana		61,5100	
		Variância		560,456	
		Desvio Padrão		23,67396	
		Mínimo		25,87	
		Máximo		105,36	
		Intervalo		79,49	
		Intervalo interquartil		45,64	
		Assimetria		,208	,580
		Curtose		-1,046	1,121
			5,6	Média	51,8147
95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior			40,7933	
	Limite superior			62,8360	
5% da média aparada				52,8352	
Mediana				55,8300	
Variância				396,090	
Desvio Padrão				19,90201	
Mínimo				11,49	
Máximo				73,77	
Intervalo				62,28	
Intervalo interquartil				32,71	
Assimetria				-,640	,580
Curtose				-,532	1,121
	6,6			Média	59,2427
		95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	46,3439	
			Limite superior	72,1414	
		5% da média aparada		58,5457	
		Mediana		55,3200	
		Variância		542,521	
		Desvio Padrão		23,29209	
		Mínimo		21,88	
		Máximo		109,15	
		Intervalo		87,27	
		Intervalo interquartil		29,14	
		Assimetria		,754	,580
		Curtose		,150	1,121

Tabela 7. Valores descritivos para a variável pH inicial do meio em relação à variável resposta flavonoides.

pH				Estatística	Erro Padrão
Flavonoides	4,6	Média		176,9247	26,13116
		95% Intervalo de	Limite inferior	120,8789	
		Confiança para Média	Limite superior	232,9704	
		5% da média aparada		174,2013	
		Mediana		108,1700	
		Variância		10242,563	
		Desvio Padrão		101,20555	
		Mínimo		68,91	
		Máximo		333,96	
		Intervalo		265,05	
		Intervalo interquartil		201,90	
		Assimetria		,438	,580
		Curtose		-1,681	1,121
			5,6	Média	
95% Intervalo de	Limite inferior			43,8605	
Confiança para Média	Limite superior			81,5741	
5% da média aparada				61,0743	
Mediana				51,1700	
Variância				1159,468	
Desvio Padrão				34,05096	
Mínimo				18,61	
Máximo				136,40	
Intervalo				117,79	
Intervalo interquartil				29,73	
Assimetria				1,045	,580
Curtose				,394	1,121
	6,6			Média	
		95% Intervalo de	Limite inferior	74,1173	
		Confiança para Média	Limite superior	136,4534	
		5% da média aparada		99,9843	
		Mediana		96,0700	
		Variância		3167,690	
		Desvio Padrão		56,28223	
		Mínimo		52,18	
		Máximo		253,81	
		Intervalo		201,63	
		Intervalo interquartil		78,29	
		Assimetria		1,460	,580
		Curtose		2,323	1,121

O *Box-plot* para o pH (Figura 13) mostra maiores valores de polifenóis produzidos no pH 4,6, com dispersão de dados. Nos valores de pH de 5,6 e 6,6 os dados também tiveram grandes intervalos. Em relação aos flavonoides (Figura 14), a maior produção foi no pH 4,6 com dados assimétricos. No pH 5,6 o intervalo foi pequeno, mas houve 3 valores discrepantes. No pH 6,6, os dados estão mais simétricos, mas com 1 valor discrepante.

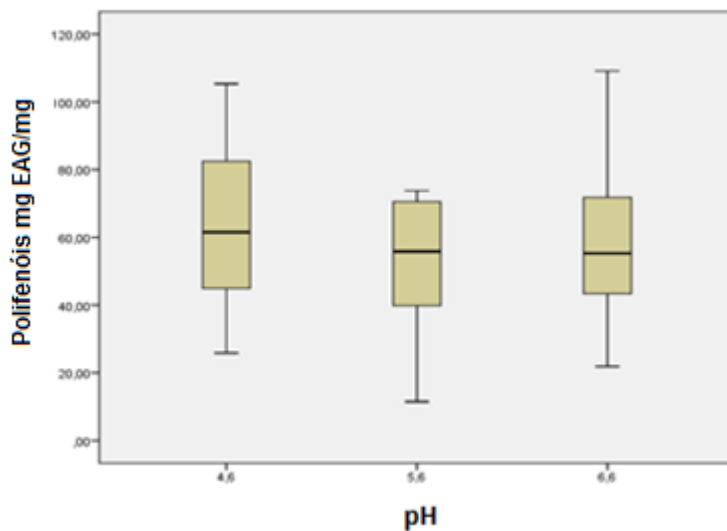


Figura 13. *Box-plot* dos dados de pH inicial do meio em relação à produção de polifenóis mg EAG/mg.

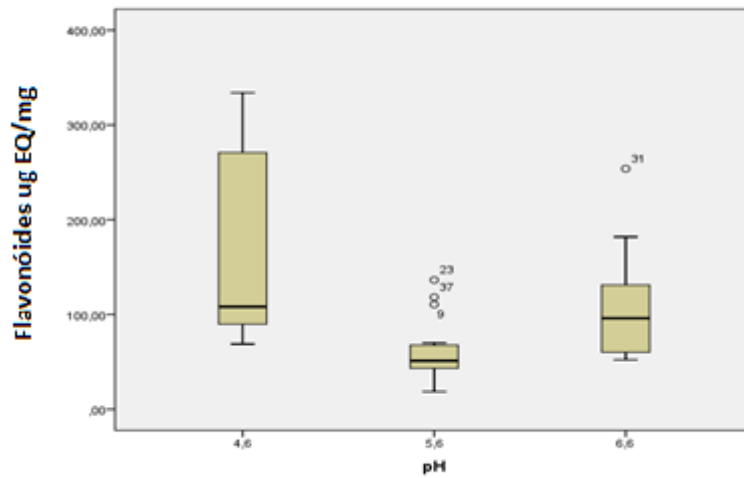


Figura 14. *Box-plot* dos dados de pH inicial do meio em relação à produção de flavonoides µg EQ/mg.

Os valores descritivos para temperatura de incubação em relação à produção de polifenóis (Tabela 8) e flavonoides (Tabela 9) são mostrados a seguir.

Tabela 8. Valores descritivos para a variável temperatura em relação à variável resposta polifenóis.

Temperatura °C				Estatística	Erro Padrão
Polifenóis	23	Média		57,9987	4,82289
		95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	47,6546	
			Limite superior	68,3427	
		5% da média aparada		58,2502	
		Mediana		56,3600	
		Variância		348,904	
		Desvio Padrão		18,67898	
		Mínimo		21,88	
		Máximo		89,59	
		Intervalo		67,71	
		Intervalo interquartil		29,14	
		Assimetria		-,016	,580
		Curtose		-,224	1,121
			28	Média	
95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior			42,9326	
	Limite superior			60,4287	
5% da média aparada				51,8874	
Mediana				48,5700	
Variância				249,543	
Desvio Padrão				15,79694	
Mínimo				25,87	
Máximo				73,77	
Intervalo				47,90	
Intervalo interquartil				32,71	
Assimetria				,227	,580
Curtose				-1,315	1,121
	33			Média	
		95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	47,6652	
			Limite superior	80,6028	
		5% da média aparada		64,5578	
		Mediana		69,3500	
		Variância		884,401	
		Desvio Padrão		29,73888	
		Mínimo		11,49	
		Máximo		109,15	
		Intervalo		97,66	
		Intervalo interquartil		49,25	
		Assimetria		-,148	,580
		Curtose		-,888	1,121

Tabela 9. Valores descritivos para a variável temperatura em relação à variável resposta flavonoides.

Temperatura °C			Estatística	Erro Padrão	
Flavonoides	23	Média	112,6900	18,89275	
		95% Intervalo de	Limite inferior	72,1691	
		Confiança para Média	Limite superior	153,2109	
		5% da média aparada		106,9700	
		Mediana		86,0800	
		Variância		5354,042	
		Desvio Padrão		73,17132	
		Mínimo		40,36	
		Máximo		287,98	
		Intervalo		247,62	
		Intervalo interquartil		63,64	
		Assimetria		1,570	,580
		Curtose		1,707	1,121
	28	Média	74,1353	7,93395	
		95% Intervalo de	Limite inferior	57,1187	
		Confiança para Média	Limite superior	91,1520	
		5% da média aparada		73,3370	
		Mediana		65,2300	
		Variância		944,212	
		Desvio Padrão		30,72804	
		Mínimo		26,24	
		Máximo		136,40	
		Intervalo		110,16	
		Intervalo interquartil		54,43	
		Assimetria		,689	,580
		Curtose		-,277	1,121
	33	Média	158,1020	27,83820	
		95% Intervalo de	Limite inferior	98,3950	
		Confiança para Média	Limite superior	217,8090	
		5% da média aparada		156,0817	
		Mediana		133,3500	
		Variância		11624,477	
		Desvio Padrão		107,81687	
		Mínimo		18,61	
		Máximo		333,96	
		Intervalo		315,35	
		Intervalo interquartil		198,54	
		Assimetria		,433	,580
		Curtose		-1,220	1,121

O *Box-plot* para a temperatura de incubação (Figura 15), mostra maiores valores de polifenóis produzidos a 33°C, com dados dispersos, porém simétricos. À 23°C observa-se alta simetria na produção de polifenóis e à 28°C o intervalo foi o menor. Em relação aos flavonoides (Figura 16), a maior produção de polifenóis foi à 33°C com alto intervalo. À 28°C e à 23°C o intervalo foi menor, com 2 dados discrepantes.

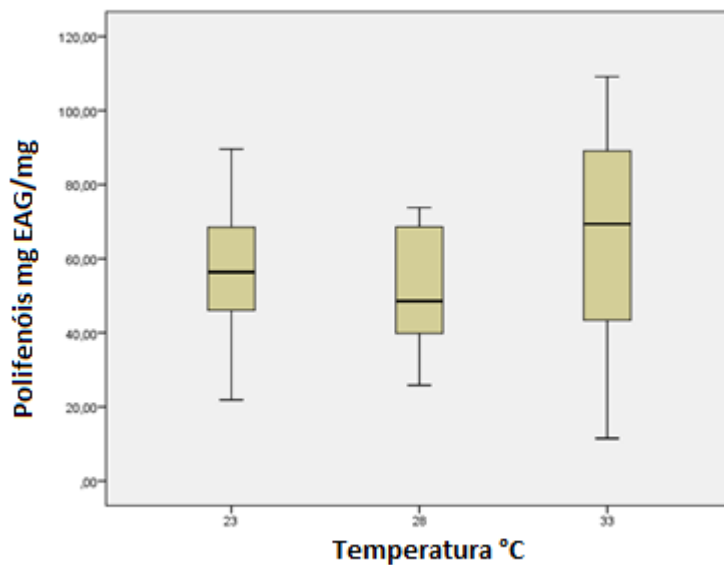


Figura 15. *Box-plot* dos dados de temperatura (°C) em relação à produção de polifenóis (mg EAQ/mg).

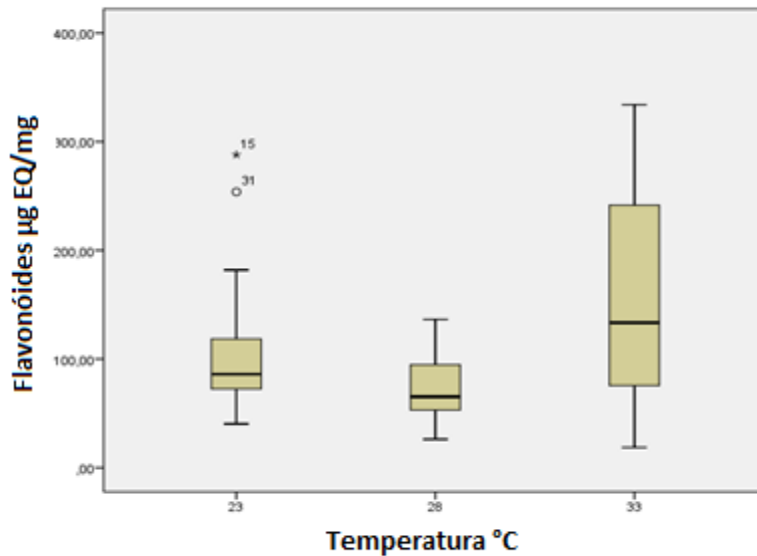


Figura 16. *Box-plot* dos dados de temperatura em relação à produção de flavonoides ($\mu\text{g EQ/mg}$).

4.2.2. Análise de Regressão

4.2.2.1. Quantidade de polifenóis e flavonoides

A análise de regressão foi realizada utilizando o método de superfície de resposta (MSR) para otimização da produção de metabólitos secundários (flavonoides e polifenóis) e da atividade antioxidante obtidos do cultivo e posterior extração dos metabólitos do fungo *Phomopsis sp.*

Os modelos de regressão obtidos para as respostas previstas produção de polifenóis e flavonoides são mostrados nas tabelas 10 e 11, respectivamente. Observa-se que a regressão foi significativa para as duas variáveis resposta ($p\text{-valor} = 0,003$ e $0,000$), mas rejeitou-se a hipótese nula de ajuste do modelo para a variável polifenóis ($p\text{-valor} = 0,011$), mostrando que, com todos os coeficientes, o modelo não representa bem os dados para a variável resposta polifenóis. Os modelos de regressão são mostrados a seguir:

$$Y_{\text{Polifenóis}} = 42,92 + 6,40x_1 + 21,61x_1^2 - 1,76x_2 + 0,29x_2^2 + 3,07x_3 + 0,62x_3^2 + 7,39x_1x_2 + 10,55x_1x_3 - 0,63x_2x_3$$

$$Y_{\text{Flavonoides}} = 31,61 - 18,13x_1 + 59,03x_1^2 - 35,82x_2 + 47,28x_2^2 + 22,71x_3 + 18,74x_3^2 + 6,08x_1x_2 + 10,03x_1x_3 - 42,99x_2x_3$$

O R^2 da regressão da variável resposta polifenóis foi de 47,58%, mostrando que 47,58% dos dados foram corretamente previstos pelo modelo proposto. Para a variável resposta flavonoides, o R^2 foi de 69,24%, ou seja, 69,24% dos dados foram representados pela regressão acima.

Tabela 10. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2^3 , com 3 repetições para a variável resposta quantidade de polifenóis.

			Coeficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Polifenóis	Modelo de Regressão	Média	42,919	5,623	7,633	0,000
		X_1	6,398	3,308	1,934	0,061
		X_1^2	21,614	6,524	3,313	0,002
		X_2	-1,757	3,308	-0,531	0,599
		X_2^2	0,289	6,524	0,044	0,965
		X_3	3,068	3,308	0,927	0,360
		X_3^2	0,624	6,524	0,096	0,924
		$X_1 \cdot X_2$	7,393	3,699	1,999	0,053
		$X_1 \cdot X_3$	10,548	3,699	2,852	0,007
		$X_2 \cdot X_3$	-0,628	3,699	-0,170	0,866

ANOVA	Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calc	p-valor
	Regressão	10430,7	9	1159,0	3,530	0,003
	Resíduos	11492,4	35	328,4		
Polifenóis	Falta de Ajuste	4336,2	5	867,2	3,636	0,011
	Erro Puro	7156,2	30	238,5		
	Total	21923,1	44			

Legenda: x_1 , concentração de peptona (g/L); x_2 , pH inicial do meio; x_3 , temperatura de incubação ($^{\circ}$ C).

Tabela 11. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2³, com 3 repetições para a variável resposta quantidade de flavonoides.

			Coefficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Flavonoides	Modelo de Regressão	Média	31,611	16,037	1,971	0,057
		X ₁	-18,130	9,435	-1,922	0,063
		X ₁ ²	59,028	18,606	3,172	0,003
		X ₂	-35,820	9,435	-3,796	0,001
		X ₂ ²	47,282	18,606	2,541	0,016
		X ₃	22,706	9,435	2,407	0,022
		X ₃ ²	18,737	18,606	1,007	0,321
		X ₁ · X ₂	6,075	10,549	0,576	0,568
		X ₁ · X ₃	10,026	10,549	0,950	0,348
		X ₂ · X ₃	-42,988	10,549	-4,075	0,000

ANOVA	Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calc	p-valor
	Regressão	210441,4	9	23382,378	8,755	0,000
	Resíduos	93472,4	35	2670,640		
Flavonoides	Falta de Ajuste	19134,46	5	3826,892	1,544	0,206
	Erro Puro	74337,94	30	2477,931		
	Total	303913,8	44			

Legenda: x₁, concentração de peptona (g/L); x₂, pH inicial do meio; x₃, temperatura de incubação (°C).

Ao selecionar os coeficientes significativos ao nível de significância de 5%, tanto para a variável resposta polifenóis (Tabela 12), quanto para a variável quantidade de flavonoides (Tabela 13), não rejeitou-se a hipótese nula de ajuste do modelo de regressão, indicando que esse modelo representa de forma adequada os dados amostrais. Para a variável quantidade de polifenóis, o p-valor de ajuste do modelo foi de 0,072, mostrando que, após a seleção dos coeficientes significativos, o modelo ficou ajustado para os dados. Nos dois casos, a regressão foi estatisticamente significativa (p-valor = 0,000). Os modelos de regressão são mostrados a seguir:

$$Y_{\text{Polifenóis}} = 43,28 + 6,40x_1 + 21,98x_1^2 + 7,39x_1x_2 + 11,55x_1x_3$$

$$Y_{\text{Flavonoides}} = 36,96 + 64,38x_1^2 - 35,82x_2 + 52,64x_2^2 + 22,71x_3 - 42,99x_2x_3$$

O R^2 da regressão da variável resposta quantidade de polifenóis foi de 45,80%, mostrando que 45,80% dos dados foram corretamente previstos pelo modelo proposto.

Para a variável resposta quantidade de flavonoides, o R^2 foi de 64,02%, ou seja, 64,02% dos dados foram representados pela regressão acima. Ao selecionar menos variáveis, sempre há uma perda no valor de R^2 , entretanto esse coeficiente não foi muito reduzido, indicando ainda bons modelos de regressão para os dados.

Tabela 12. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2^3 , com 3 repetições para a variável resposta quantidade de polifenóis, selecionando os coeficientes significativos ao nível de significância de 5%.

			Coeficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Polifenóis (5%)	Modelo de Regressão	Média	43,285	4,450	9,727	0,000
		X_1	6,398	3,147	2,033	0,049
		X_1^2	21,980	5,450	4,033	0,000
		X_2				
		X_2^2				
		X_3				
		X_3^2				
		$X_1 \cdot X_2$	7,393	3,518	2,102	0,042
		$X_1 \cdot X_3$	10,548	3,518	2,998	0,005
			$X_2 \cdot X_3$			

ANOVA	Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calc	p-valor
Polifenóis (5%)	Regressão	10041,5	4	2510,377	8,451	0,000
	Resíduos	11881,6	40	297,040		
	Falta de Ajuste	4725,4	10	472,540	1,981	0,072
	Erro Puro	7156,2	30	238,540		
	Total	21923,1	44			

Legenda: x_1 , concentração de peptona (g/L); x_2 , pH inicial do meio; x_3 , temperatura de incubação (°C).

Tabela 13. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2^3 , com 3 repetições para a variável resposta quantidade de flavonoides, selecionando os coeficientes significativos ao nível de significância de 5%.

			Coeficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor	
Flavonoides (5%)	Modelo de Regressão	Média	36,965	15,502	2,385	0,022	
		x_1					
		x_1^2	64,382	18,269	3,524	0,001	
		x_2	-35,820	9,667	-3,705	0,001	
		x_2^2	52,635	18,269	2,881	0,006	
		x_3	22,706	9,667	2,349	0,024	
		x_3^2					
		$x_1 \cdot x_2$					
		$x_1 \cdot x_3$					
		$x_2 \cdot x_3$	-42,988	10,808	-3,977	0,000	

ANOVA	Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calc	p-valor
Flavonoides (5%)	Regressão	194574,5	5	38914,901	13,880	0,000
	Resíduos	109339,3	39	2803,572		
	Falta de Ajuste	35001,35	9	3889,039	1,569	0,170
	Erro Puro	74337,94	30	2477,931		
	Total	303913,8	44			

Legenda: x_1 , concentração de peptona (g/L); x_2 , pH inicial do meio; x_3 , temperatura de incubação ($^{\circ}$ C).

As figuras que mostram os resultados da análise estatística para a variável quantidade de polifenóis (com todos os coeficientes) são mostradas abaixo. O gráfico de Pareto (Figura 17) mostra as variáveis em ordem de importância para o modelo de regressão. A linha vertical mostra os coeficientes que estão significativos ao nível de significância de 5%. A Figura 18 mostra os dados previstos em relação aos amostrais.

Observam-se os dados em torno da reta, mostrando a previsão do modelo.

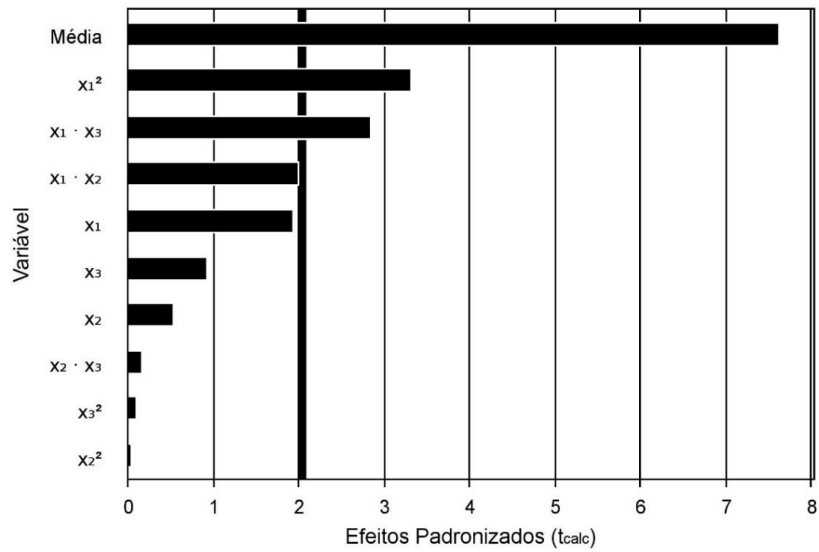


Figura 17. Gráfico de Pareto para a variável resposta polifenóis, mostrando as variáveis da regressão em ordem de importância para o modelo. As variáveis que ultrapassam a linha vertical são significativas ao nível de significância de 5%.

No gráfico: x_1 , concentração de peptona (g/L); x_2 , pH inicial do meio; x_3 , temperatura de incubação (°C).

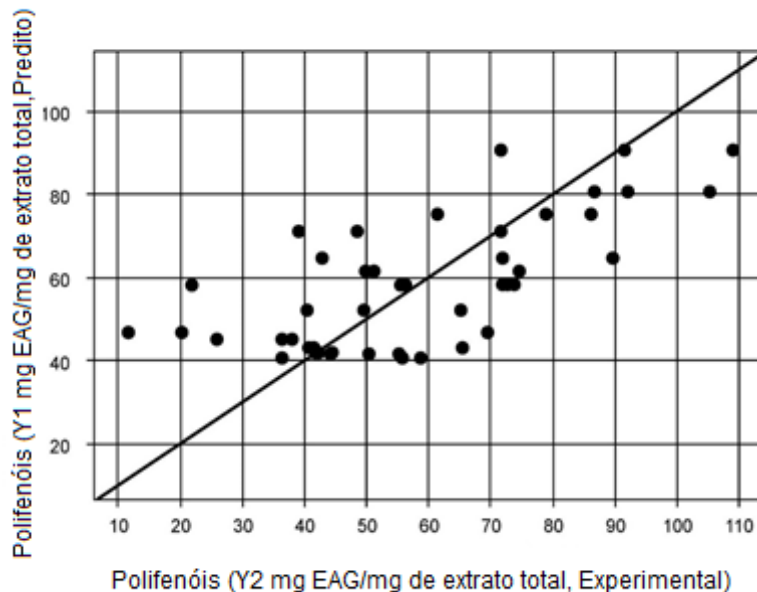


Figura 18. $Y_{predito}$ x $Y_{experimental}$ da variável resposta polifenóis, mostrando a previsibilidade do modelo.

O método de superfície de resposta permite que as variáveis do modelo sejam analisadas duas a duas a fim de produzir gráficos de superfície ou gráficos planos que mostrem a otimização da variável resposta polifenóis, sendo a coloração verde indicativo de quais condições foram mais favoráveis para sua produção.

Segundo Peralta-Zamora e colaboradores (2005), a análise de variáveis isoladas em um experimento geralmente negligencia os efeitos de interação, fato este que dificulta ou inviabiliza o reconhecimento de condições reais de otimização.

Ainda segundo os autores, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se por permitirem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados.

A Figura 19 mostra a relação entre as variáveis independentes x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio), indicando maiores produções de polifenóis no meio de cultivo com 20 g/L de peptona e pH 6,6. A Figura 20 mostra a relação entre as variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona no meio e temperatura de

incubação), indicando maiores produções de polifenóis no meio de cultivo com 20 g/L de peptona incubado a 33°C. A Figura 21 mostra a relação entre as variáveis x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação), indicando maiores produções de polifenóis em pH 4,6 e temperatura de 33°C e, mostrando que sem considerar o acréscimo de peptona ao meio, o pH ótimo foi o menor, em maiores temperaturas.

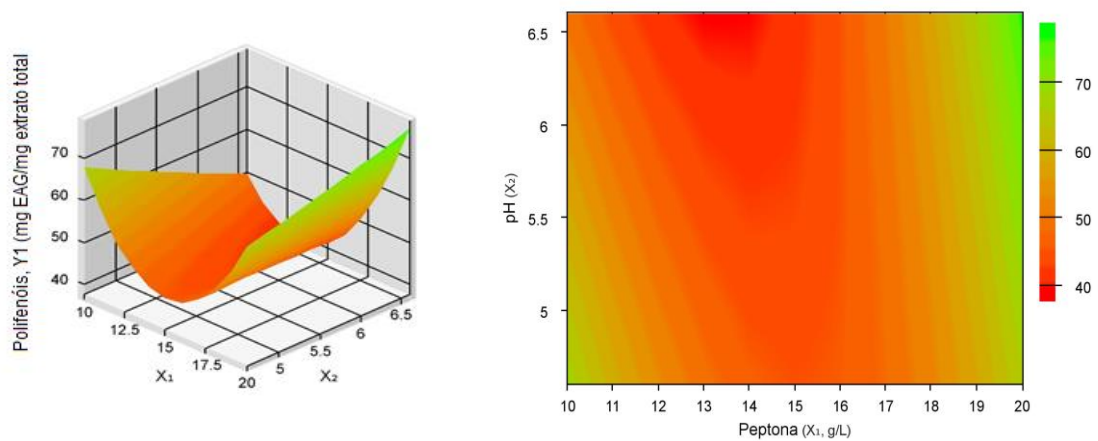


Figura 19. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis independentes x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio).

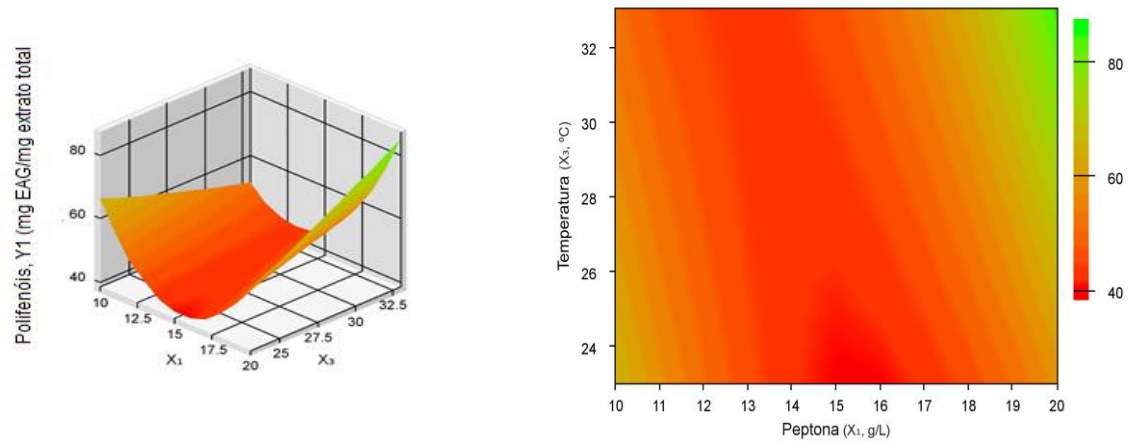


Figura 20. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona no meio e temperatura de incubação).

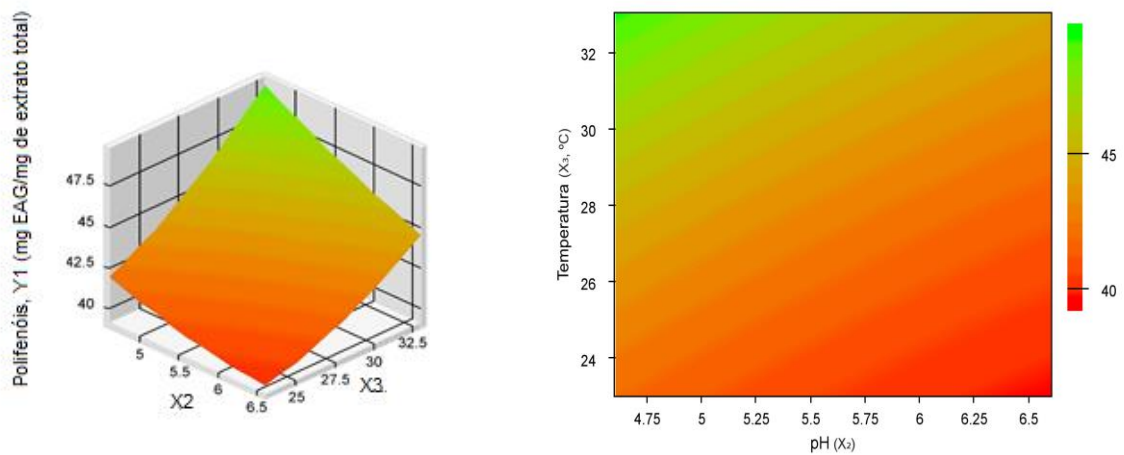


Figura 21. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis independentes x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação).

Os resultados para a variável resposta polifenóis (selecionando os coeficientes significativos ao nível de significância de 5%) são mostrados nas figuras abaixo. O gráfico de Pareto (Figura 22) mostra as variáveis em ordem de importância para o modelo de regressão, somente com as variáveis significativas a 5%. A Figura 23 mostra os dados preditos em relação aos amostrais, indicando a previsão do modelo.

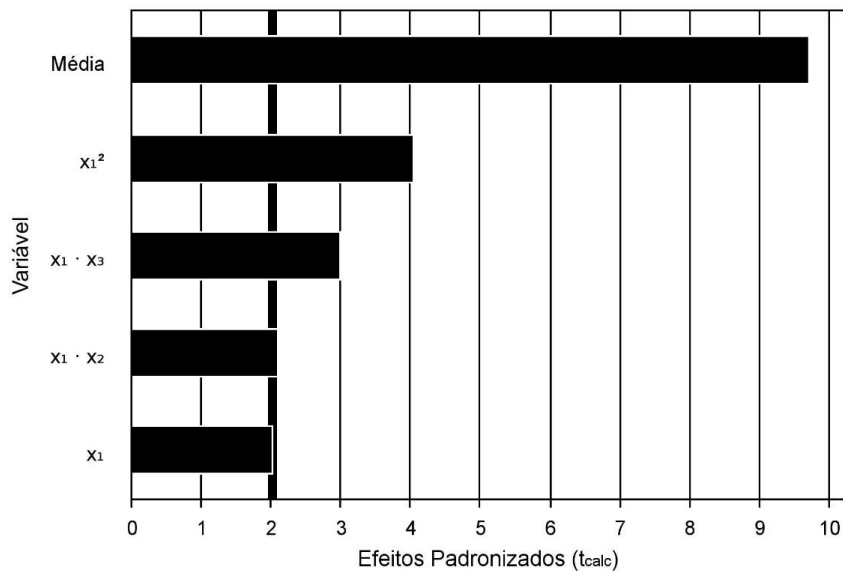


Figura 22. Gráfico de Pareto para a variável resposta produção de polifenóis, mostrando somente as variáveis da regressão significativas ao nível de significância de 5% para o modelo.

No gráfico: x_1 , concentração de peptona (g/L); x_2 , pH inicial do meio; x_3 , temperatura de incubação (°C).

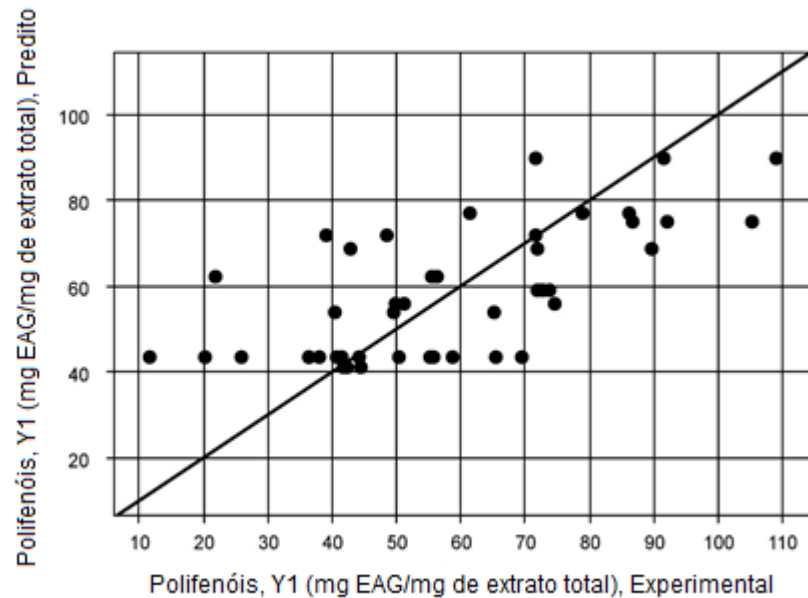


Figura 23. Y_{predito} x $Y_{\text{experimental}}$ da variável resposta produção de polifenóis apenas com coeficientes estatisticamente significativos, mostrando a previsibilidade do modelo.

Os resultados do método de superfície de resposta apenas com as variáveis significativas para polifenóis são mostrados abaixo. A Figura 24 mostra a relação entre as variáveis independentes x_1 e x_2 (peptona e pH), indicando maiores produções de polifenóis no meio com 20 g/L de peptona e pH 6,6. A Figura 25 mostra a relação entre as variáveis x_1 e x_3 (peptona e temperatura), indicando maiores produções de polifenóis no meio com 20 g/L de peptona e temperatura de incubação de 33°C. Como a interação entre x_2 e x_3 (pH do meio e temperatura de incubação), x_2^2 e x_3^2 , não foi significativa no modelo de regressão, não foi possível criar uma superfície e sim um plano de coloração homogênea (Figura 26), onde na ausência da variável concentração de peptona no meio, a produção foi constante (43,28 mg EAG /mg de extrato total), indicando que a variação de pH inicial do meio e temperatura de incubação, na faixa em estudo, não foi significativa, não contribuindo para a análise das condições para otimização da produção de polifenóis.

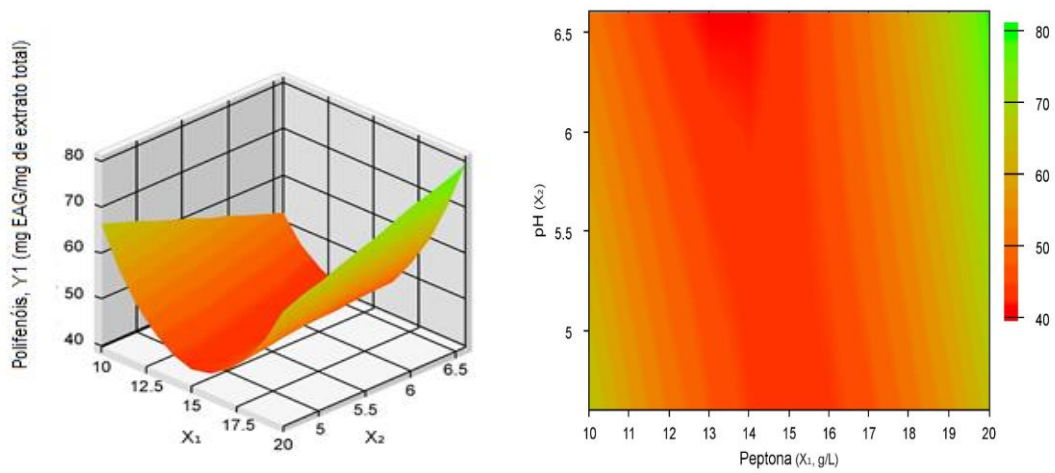


Figura 24. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio).

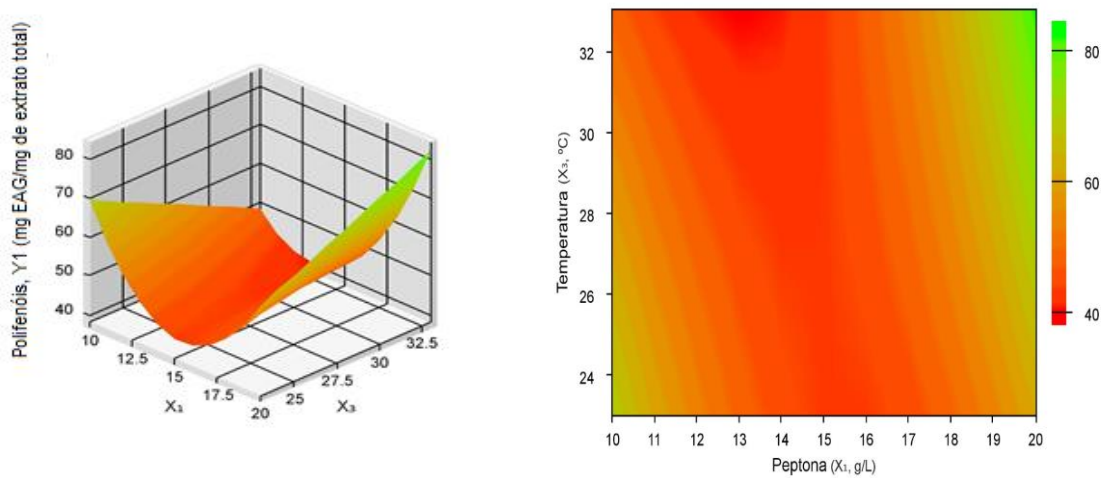


Figura 25. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona no meio e temperatura de incubação).

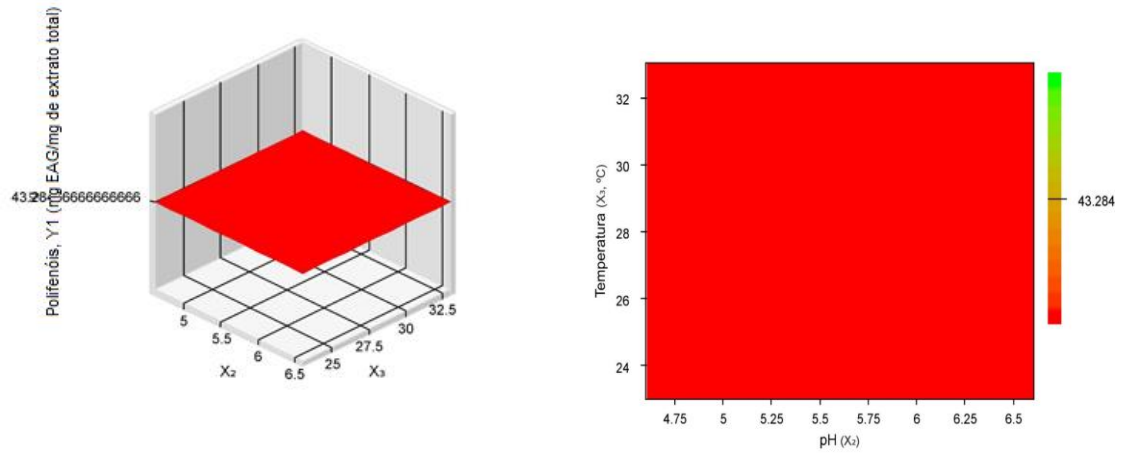


Figura 26. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de polifenóis em relação às variáveis x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação).

Os resultados da análise estatística para a resposta predita produção de flavonoides (com todos os coeficientes) são mostrados abaixo. O gráfico de Pareto (Figura 27) mostra as variáveis independentes em ordem de importância para o modelo de regressão e a linha vertical mostra o limite de significância de 5%. A Figura 28 mostra os dados previstos em relação aos amostrais. A dispersão dos dados próxima à reta indica boa previsão do modelo.

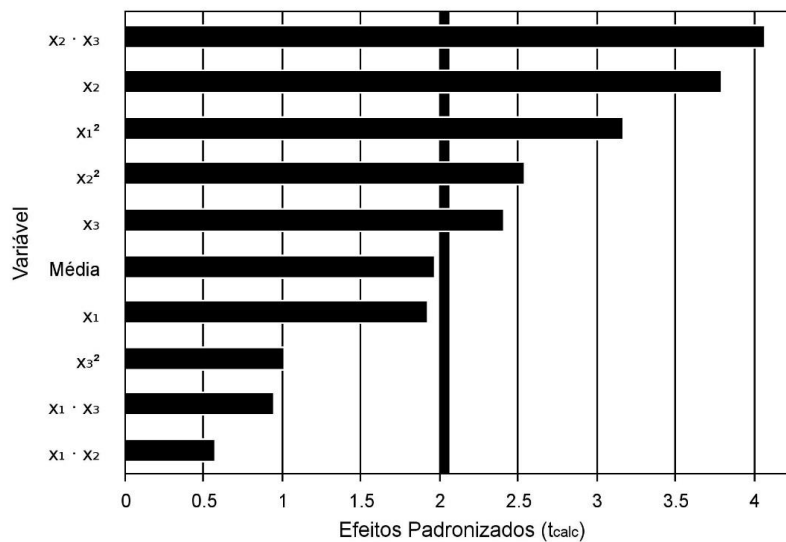


Figura 27. Gráfico de Pareto para a variável resposta produção de flavonoides, mostrando as variáveis da regressão em ordem de importância para o modelo. As variáveis que ultrapassam a linha vertical são significativas ao nível de significância de 5%.

No gráfico: x₁, concentração de peptona (g/L); x₂, pH inicial do meio; x₃, temperatura de incubação (°C).

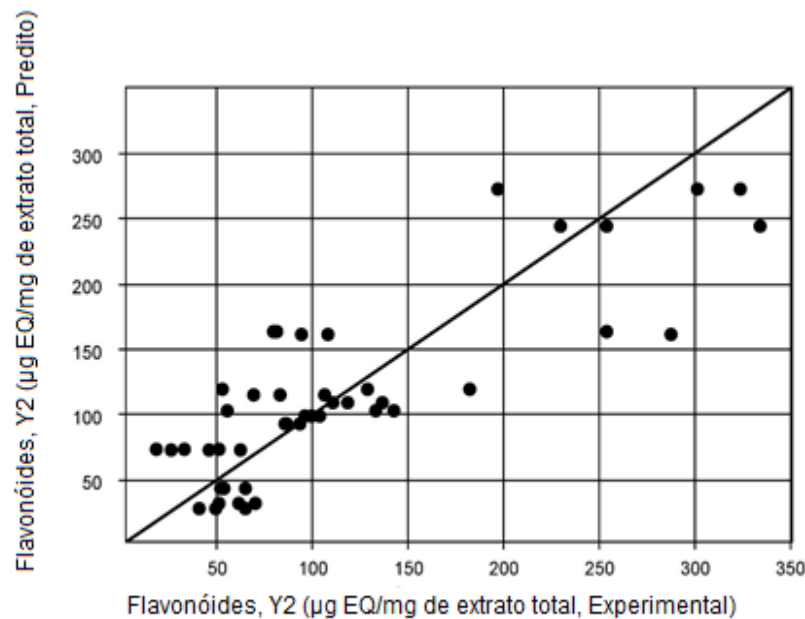


Figura 28. $Y_{predito}$ x $Y_{experimental}$ da variável resposta produção de flavonoides, mostrando a previsibilidade do modelo.

A Figura 29 mostra a relação entre as variáveis independentes x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio) indicando maiores produções de flavonoides (coloração verde) no meio com 10 g/L de peptona e em pH 4,6. A Figura 30 mostra a relação entre as variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona no meio e temperatura de incubação), indicando maiores produções de flavonoides no meio com 10 g/L de peptona incubado à temperatura de 33°C. A Figura 31 mostra a relação entre as variáveis x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação), indicando maiores produções de flavonoides em pH 4,6 e temperatura de 33°C. Ao considerar a integração com a variável concentração de peptona, diferentemente da produção de polifenóis, maiores produções de flavonoides foram conseguidas em pH mais baixo (4,6).

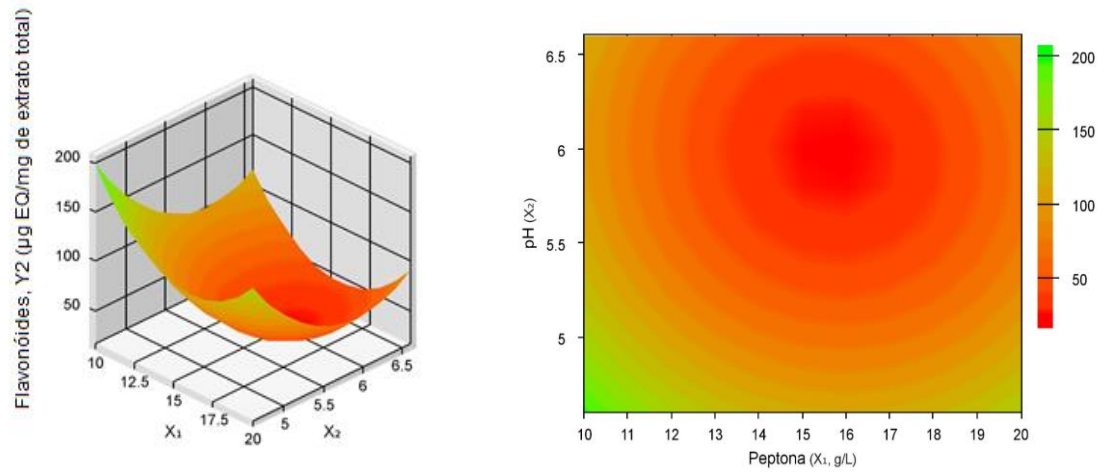


Figura 29. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de flavonoides em relação às variáveis x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio).

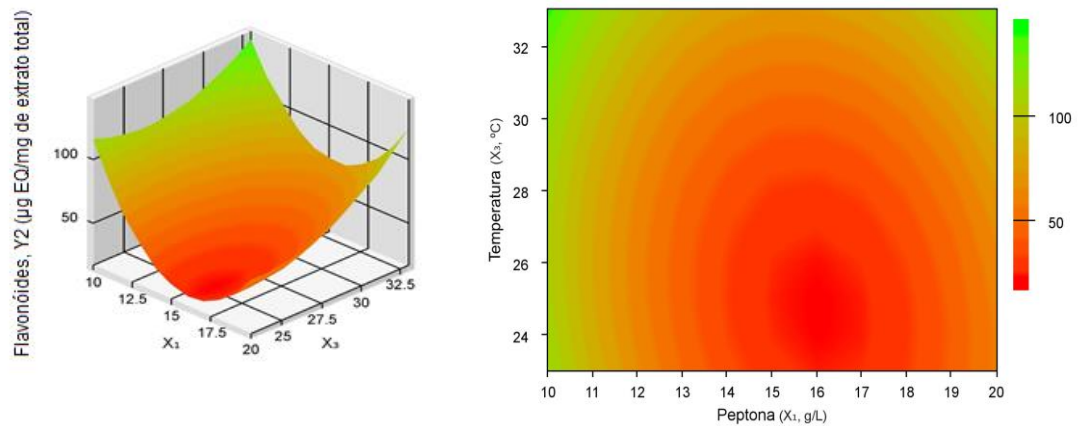


Figura 30. Superfície de resposta da produção de flavonoides em relação às variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona e temperatura de incubação).

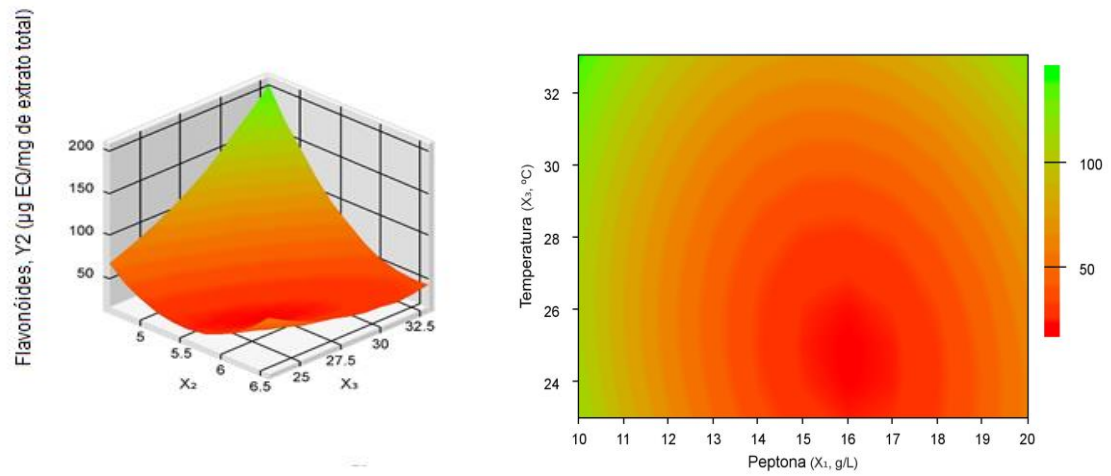


Figura 31. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de flavonoides em relação às variáveis x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação).

Ao considerar apenas o modelo de regressão para a resposta produção de flavonoides com as variáveis independentes estatisticamente significativas ($\alpha = 0,05$), obtiveram-se os resultados demonstrados nas figuras abaixo. O gráfico de Pareto (Figura 32) mostra as variáveis em ordem de importância para o modelo de regressão, somente com as variáveis significativas a 5%. A Figura 33 mostra os dados previstos em relação aos amostrais, indicando a previsão do modelo.

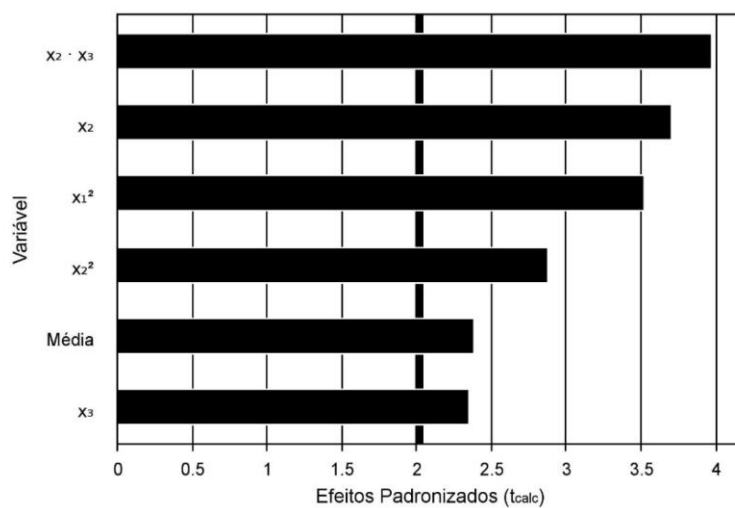


Figura 32. Gráfico de Pareto para a variável resposta produção de flavonoides, mostrando somente as variáveis da regressão significativas ao nível de significância de 5% para o modelo.

No gráfico: x_1 , concentração de peptona (g/L); x_2 , pH inicial do meio; x_3 , temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$).

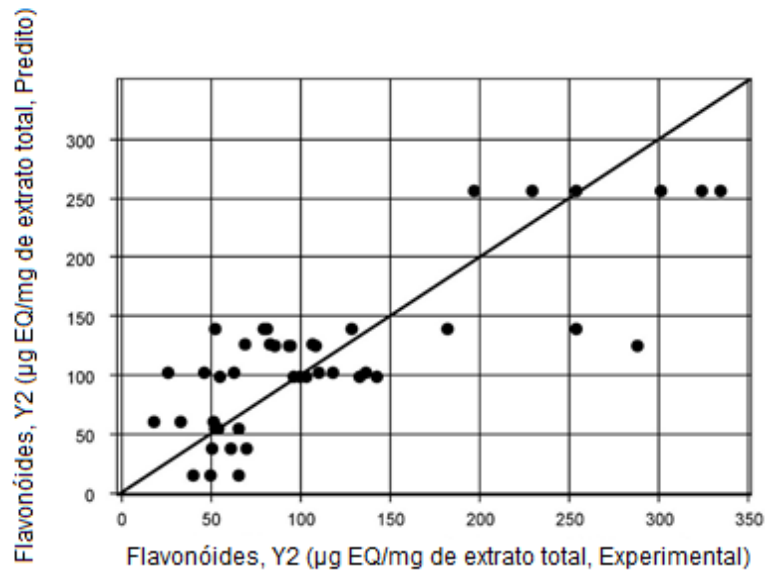


Figura 33. $Y_{predito}$ x $Y_{experimental}$ da variável resposta produção de flavonoides apenas com coeficientes estatisticamente significativos, mostrando a previsibilidade do modelo.

Os resultados do método de superfície de resposta apenas com as variáveis significativas para a resposta predita produção de flavonoides são apresentados a seguir por meio de gráficos de superfície e de gráficos planos.

A Figura 34 mostra a relação entre x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio), indicando maiores produções de flavonoides em meio com 10 g/L ou 20 g/L de peptona e pH de 4,6. A Figura 35 mostra a relação entre x_1 e x_3 (concentração de peptona no meio e temperatura de incubação), indicando maiores produções de flavonoides em meio com 10 g/L ou 20 g/L de peptona e temperatura de 33°C. A Figura 36 mostra a relação entre x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação), indicando maiores produções de flavonoides em meio de cultivo com pH mais ácidos e temperaturas de incubação mais elevadas (33°C).

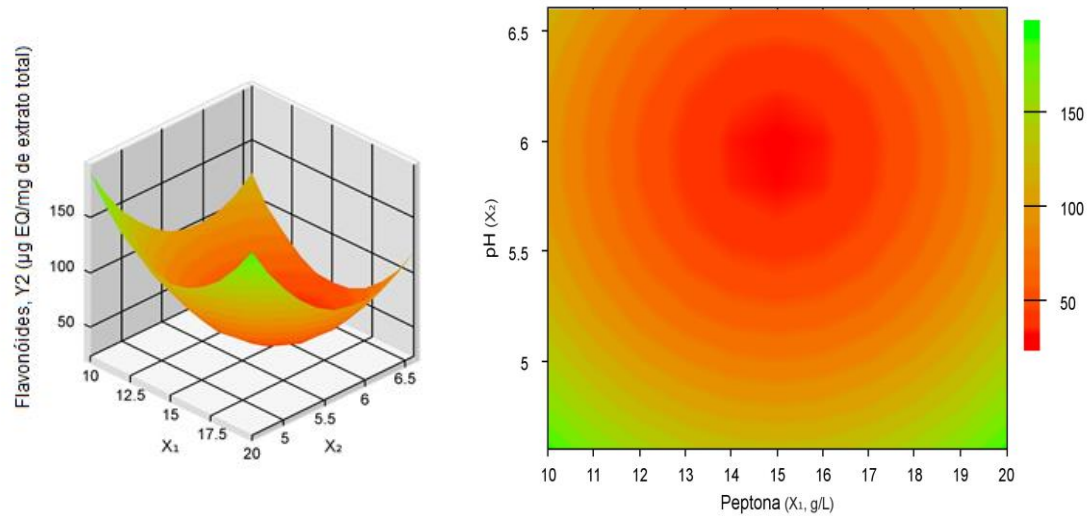


Figura 34. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de flavonoides em relação às variáveis x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio).

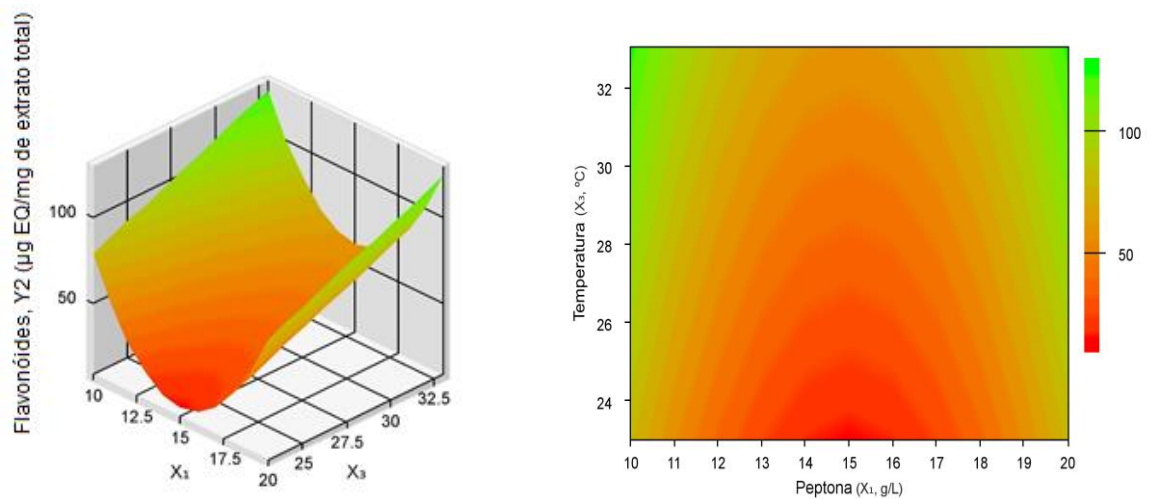


Figura 35. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de flavonoides em relação às variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona no meio e temperatura de incubação).

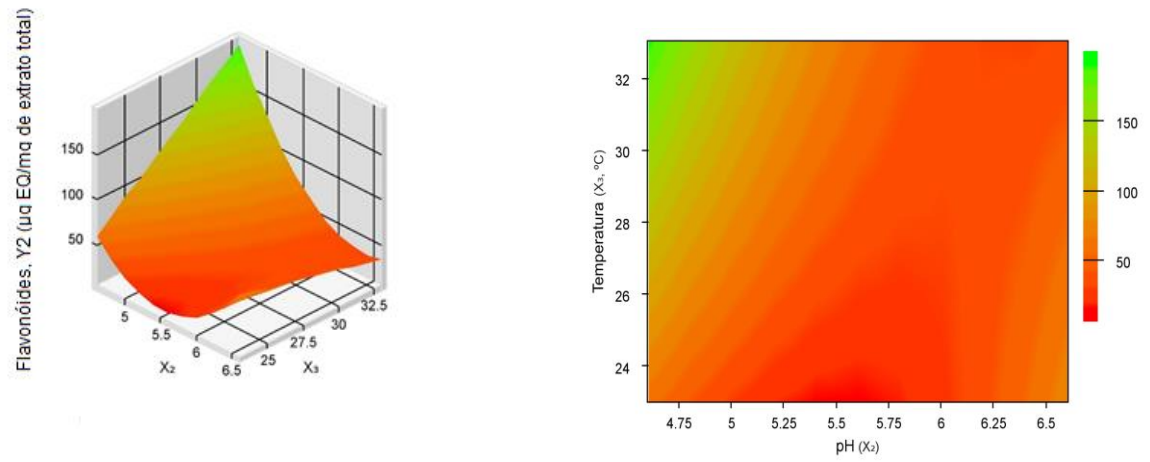


Figura 36. Superfície de resposta e gráfico plano da produção de flavonoides em relação às variáveis x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação).

4.2.2.2. Atividade Antioxidante (%)

O modelo de regressão para a análise da influência das variáveis independentes na atividade antioxidante do extrato produzido é mostrado na Tabela 14. Observa-se que a regressão foi significativa para esta resposta (p-valor = 0,00073). O modelo de regressão é mostrado abaixo:

$$Y_{\text{Atividade antioxidante}} = 142,51 + 2,81 x_1 + 1,61 x_1^2 - 13,70 x_2 - 9,77 x_2^2 - 14,26 x_3 - 12,52 x_3^2 + 7,17 x_1 x_2 + 7,95 x_1 x_3 - 24,27 x_2 x_3$$

Tabela 14. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2³, com 1 repetição para a variável resposta atividade antioxidante (%).

		Coeficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Modelo de Regressão	Média	142,51	3,60	39,57	0,0000
	x ₁	2,81	2,41	1,17	0,2870
	x ₁ ²	1,61	4,68	0,34	0,7435
	x ₂	-13,70	2,41	-5,70	0,0013
	x ₂ ²	-9,77	4,68	-2,09	0,0820
	x ₃	-14,26	2,41	-5,93	0,0010
	x ₃ ²	-12,52	4,68	-2,67	0,0369
	x ₁ · x ₂	7,17	2,69	2,67	0,0372
	x ₁ · x ₃	7,95	2,69	2,95	0,0255
	x ₂ · x ₃	-24,27	2,69	-9,03	0,0001

ANOVA	Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calc	p-valor
	Regressão	10880,8	9	1209,0	20,9	0,00073
	Resíduos	347,2	6	57,9		
	Falta de Ajuste	241,6	5	48,3	0,5	0,80056
	Erro Puro	105,6	1	105,6		
	Total	303913,8	44			

Legenda: x₁, concentração de peptona (g/L); x₂, pH inicial do meio; x₃, temperatura de incubação (°C).

Ao selecionar os coeficientes significativos ao limite de significância de 5%, para a variável resposta predita Atividade Antioxidante (Tabela 15), também não se rejeitou a hipótese nula de ajuste do modelo de regressão. Este dado mostrou que, mesmo após a seleção dos coeficientes significativos, o modelo continuou ajustado para os dados.

Nos dois casos, a regressão foi estatisticamente significativa (p-valor = 0,00073 e p-valor= 0,00006).

Tabela 15. Modelo de Regressão e Análise de Variância do experimento fatorial 2³, com 1 repetição para a variável resposta atividade antioxidante (%) selecionando-se os coeficientes significativos ao nível de significância de 5%.

		Coeficiente	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Modelo de Regressão	Média	139,78	3,56	39,26	0,0000
	X ₁				
	X ₁ ²				
	X ₂	-13,70	2,76	-4,97	0,0008
	X ₂ ²				
	X ₃	-14,26	2,76	-5,17	0,0006
	X ₃ ²	-16,34	4,50	-3,63	0,0055
	X ₁ · X ₂	7,17	3,08	2,33	0,0450
	X ₁ · X ₃	7,95	3,08	2,58	0,0299
	X ₂ · X ₃	-24,27	3,08	-7,87	0,0000

ANOVA	Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F calc	p-valor
	Regressão	10543,3	6	1757,2	23,1	0,00006
	Resíduos	684,7	9	76,1		
	Falta de Ajuste	579,1	8	72,4	0,7	0,73831
	Erro Puro	105,6	1	105,6		
	Total	11228,0	15			

Legenda: x₁, concentração de peptona (g/L); x₂, pH inicial do meio; x₃, temperatura de incubação (°C).

O novo modelo de regressão é mostrado abaixo, onde o Y representa o valor da atividade antioxidante (%) prevista:

$$Y_{\text{Atividade antioxidante}} = 139,78 - 13,70 x_2 - 14,26 x_3 - 16,34 x_3^2 + 7,17 x_1 x_2 + 7,95 x_1 x_3 - 24,27 x_2 x_3$$

O coeficiente de determinação (R^2) da variável resposta dos dados foi corretamente previsto pelo modelo proposto. Para a variável resposta Atividade Antioxidante (%), o R^2 antes da seleção dos coeficientes significativos era de 96,91%, e passou a ser de 93,9% após a seleção desses, mostrando que 93,9% dos dados foram representados pela regressão acima e apenas 6,1% não poderão ser explicados pelo modelo. Destaca-se que ao selecionarmos menos variáveis, sempre há uma perda no valor de R^2 , entretanto esse coeficiente não foi muito reduzido, mostrando ser um bom modelo de regressão para os dados.

Os gráficos abaixo mostram os resultados da análise estatística para a resposta atividade antioxidante. O gráfico de Pareto (Figura 37) mostra as variáveis significativas em ordem de importância para o modelo de regressão. A Figura 38 apresenta os dados previstos em relação aos amostrais, mostrando que a dispersão dos dados próximos à reta indica boa previsão do modelo.

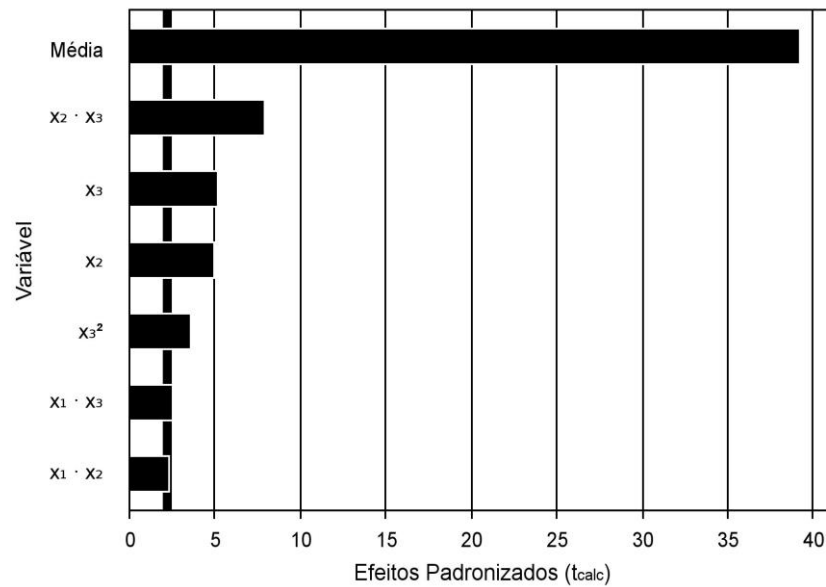


Figura 37. Gráfico de Pareto para a variável resposta Atividade Antioxidante, mostrando somente as variáveis da regressão significativas ao nível de significância de 5% para o modelo.

No gráfico: x_1 , concentração de peptona (g/L); x_2 , pH inicial do meio; x_3 , temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$).

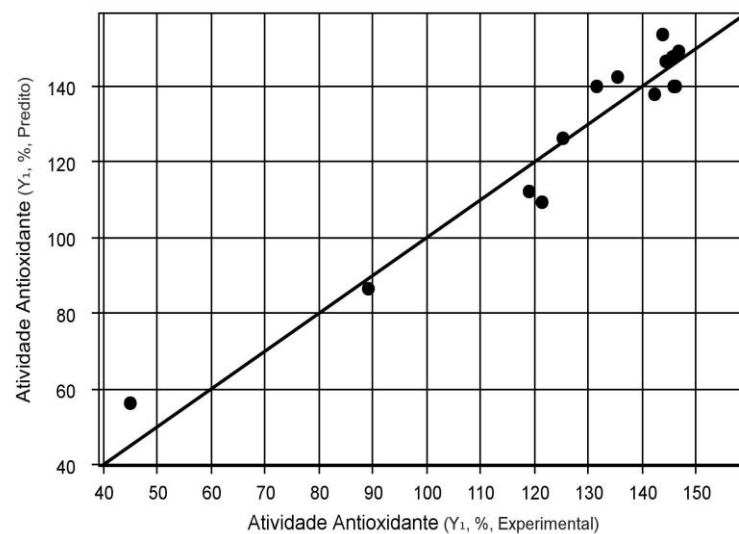


Figura 38. Ypredito x Yexperimental da variável resposta atividade antioxidante (%) apenas com coeficientes estatisticamente significativos, mostrando a previsibilidade do modelo.

Os resultados do método de superfície de resposta apenas com as variáveis significativas para atividade antioxidante são mostrados abaixo. A Figura 39 mostra a interação entre as variáveis independentes x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio), indicando maior atividade antioxidante nos extratos produzidos pelo cultivo do fungo em meio com pH inicial mais baixo (4,6) e concentrações menores de peptona (10 g/L). A Figura 40 mostra a relação entre as variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona e temperatura de incubação), indicando maior atividade antioxidante nos meios de cultivo com as menores concentrações de peptona e temperaturas de incubação medianas de 24°C a 28°C, com tendência de diminuição da atividade nas temperaturas mais elevadas. Analisando a interação entre pH e temperatura (x_2 e x_3), a Figura 41 mostra que houve atividade antioxidante nos extratos produzidos pelo cultivo do fungo em meios com pH iniciais nas faixas maiores (6,6) com tendência de aumento da atividade nas temperaturas mais elevadas.

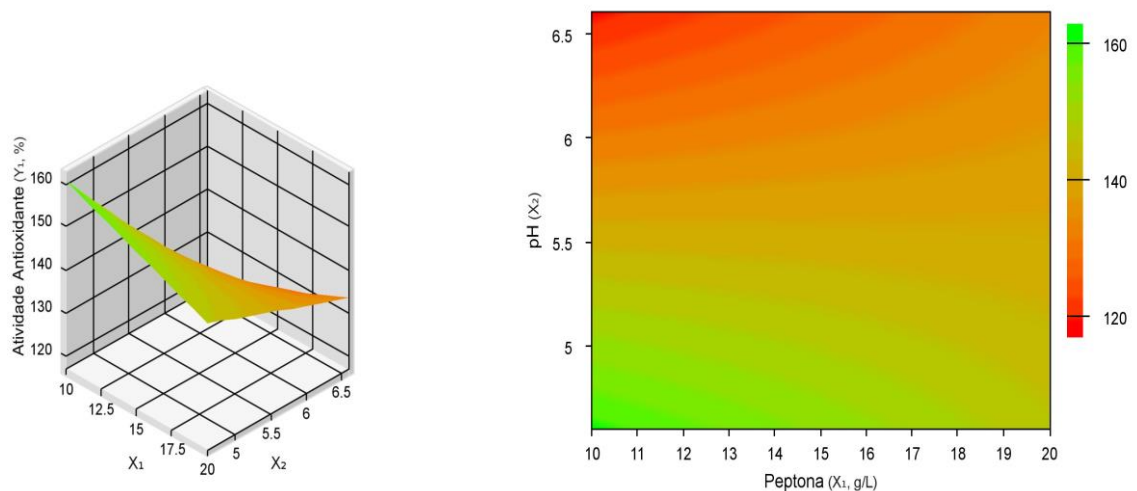


Figura 39. Superfície de resposta e gráfico plano da atividade antioxidante do extrato produzido em relação às variáveis x_1 e x_2 (concentração de peptona e pH inicial do meio).

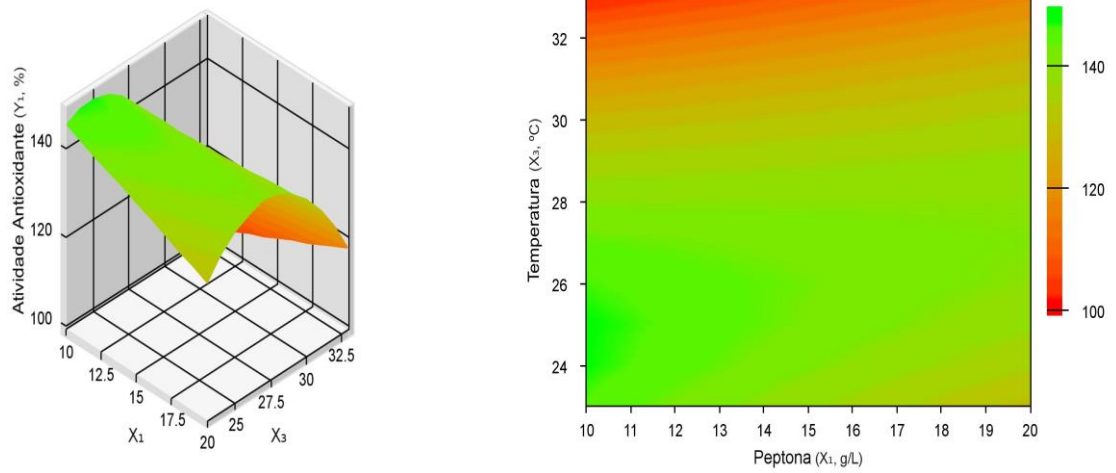


Figura 40. Superfície de resposta e gráfico plano da atividade antioxidante do extrato produzido em relação às variáveis x_1 e x_3 (concentração de peptona no meio e temperatura de incubação).

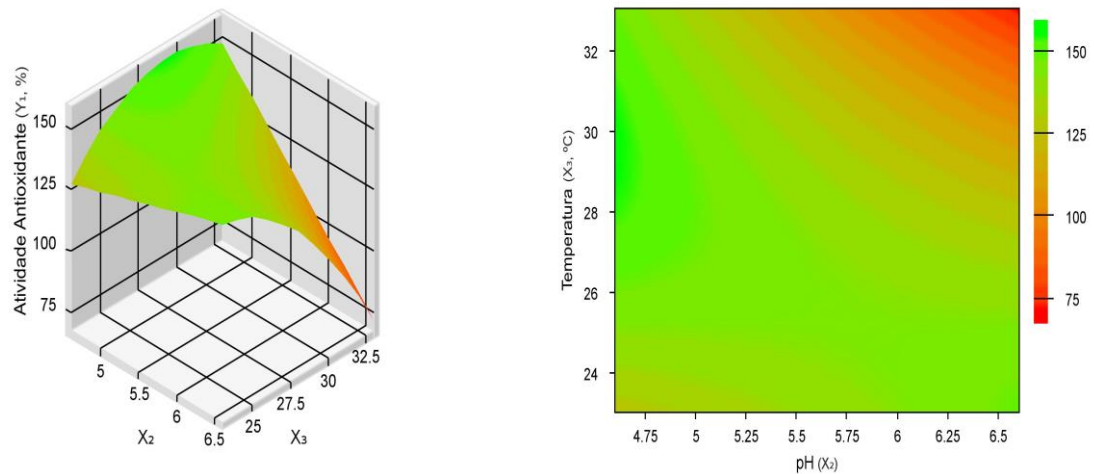


Figura 41. Superfície de resposta e gráfico plano da atividade antioxidante do extrato produzido em relação às variáveis x_2 e x_3 (pH inicial do meio e temperatura de incubação).

5. DISCUSSÃO

A busca por novos compostos ativos de origem microbiana é um desafio constante para muitos laboratórios de produtos naturais. A manipulação do meio ambiente e das condições nutricionais tem demonstrado impactos substanciais sobre a quantidade e diversidade na produção de metabólitos secundários por microrganismos.

A otimização dessa etapa inicial, preparo da cultura microbiana, pode ter um efeito pronunciado sobre a saída e o sucesso de um programa para obtenção de um determinado produto natural.

Inicialmente, visando selecionar os melhores meios de cultivo para a produção dos metabólitos de interesse, foram avaliados três meios de cultura para o processo fermentativo, foram eles: Sabouraud-dextrose, Batata-dextrose e meio fermentativo descrito por Jackson (JACKSON *et al*, 1993).

Os resultados da triagem inicial desses meios de cultura obtidos neste experimento revelaram que o cultivo em meio de Sabouraud-dextrose e batata-dextrose apresentaram bons resultados para a produção de polifenóis e flavonoides pelo fungo estudado, sendo que na produção de flavonoides o meio Sabouraud-dextrose se mostrou mais eficaz, tendo, por esse motivo, sido escolhido para a continuação dos ensaios.

A fase inicial de crescimento dos microrganismos, em que a massa micelial é formada (forma vegetativa), é acompanhada de uma redução dos constituintes do meio, tais como, fontes de carbono, nitrogênio, fósforo, além do aumento da demanda de oxigênio; seguida da fase estacionária em que não há crescimento líquido da população, ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morrem. Grupos determinados de metabólitos secundários podem ser produzidos após esta fase de crescimento, a qual é definida como fase estacionária ou idiofase (TORTUGA *et al.*, 2012).

O aumento do tempo de incubação do fungo *Phomopsis sp.* na pré-cultura com o intuito de aumentar a quantidade de massa micelial, pode levar a um aumento na produção de metabólitos secundários no meio fermentativo, possivelmente por proporcionar ao fungo uma maior permanência em sua idiofase ou fase estacionária,

podendo indicar que a produção de metabólitos secundários por este é crescimento dependente.

É sabido que a produção de metabólitos secundários está diretamente relacionada a respostas específicas proporcionadas pelas diferentes condições ambientais a que estão submetidos os organismos. Desta forma, as vias de biossíntese podem ser ativadas ou até mesmo reguladas em consequência dos diferentes estímulos recebidos pelos microrganismos (KIRANMAYI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015).

Segundo Tudzynski (2014), a qualidade e a quantidade da fonte de nitrogênio que é utilizada no meio de cultivo tem um efeito especial, não só sobre o crescimento e diferenciação, mas também sobre a biossíntese de muitos metabólitos secundários de origem fúngica. Apesar do modo de ação molecular e das possíveis interações com reguladores envolvidos, ainda não serem bem compreendidos, o autor observou que os fungos são capazes de responder às mudanças quantitativas e qualitativas na disponibilidade de nitrogênio por meio de mecanismos regulatórios complexos. Os componentes desta rede reguladora seriam sensores de nitrogênio, cascatas de sinalização, fatores de transcrição e outras proteínas reguladoras capazes de interagir.

Vandermon e colaboradores (2013) reiteram que as mudanças no pH do meio de fermentação podem afetar vários processos celulares de microrganismos, tais como regulação e biossíntese de metabólitos secundários.

Em decorrência do exposto, três variáveis foram escolhidas para serem analisadas nos experimentos: fonte de nitrogênio (quantidade de peptona) no meio de cultivo, temperatura de incubação do fungo e pH inicial do meio de cultura.

Sabe-se, também, que uma das etapas mais importantes de um processo biológico é o planejamento e a otimização para aumentar a sua eficiência (BARROS *et al.*, 2010; FANG *et al.*, 2010).

Há um grande número de estudos sobre a otimização de fontes de carbono e nitrogênio, utilizando métodos clássicos de otimização de meios de cultura, modificando apenas uma variável independente (método univariado) e fixando outras em determinado nível. Este método clássico de otimização que varia um parâmetro de cada vez e mantém o outro constante é um método que demanda mais custos e também

ignora as interações combinadas entre os parâmetros físico-químicos (SILVA *et al.*, 2007).

Khambhaty e colaboradores (2007) afirmam que esses métodos podem ser extremamente morosos e dispendiosos quando se tem um grande número de variáveis envolvidas num processo.

Em contraste, a metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma coleção de técnicas estatísticas e matemáticas eficazes para desenvolver, melhorar e otimizar processos complexos, onde a resposta de interesse é influenciada pela existência de diversas variáveis e o objetivo é otimizar essa resposta (AMINI *et al.*, 2008), assim como no experimento proposto.

O Método da Superfície de Resposta utilizando o desenho experimental do DELINEAMENTO DE FACES CENTRADAS (DFC) foi utilizado para otimizar a produção de metabólitos secundários (quantidade de polifenóis totais e de flavonoides) e a atividade antioxidante dos extratos obtidos, avaliando-se a capacidade dos constituintes do extrato aceto etílico do fungo *Phomopsis sp.* em capturar radicais livres.

As variáveis independentes escolhidas foram concentração de peptona no meio (x_1); pH inicial do meio (x_2) e temperatura de incubação (x_3). Visando avaliar a influência dessas variáveis independentes sobre as variáveis dependentes rendimentos foi elaborado um planejamento fatorial de 3 níveis (-1, 0, +1), totalizando 45 condições experimentais realizadas em triplicata para a avaliação da quantidade de polifenóis e flavonoides produzidos. Para avaliar a variável dependente atividade antioxidante (%) dos extratos produzidos elaborou-se um planejamento fatorial de três níveis, dois pontos centrais e uma repetição, totalizando 16 condições experimentais.

Em geral planejamentos fatoriais do tipo 2ⁿ são os mais comuns. Um dos aspectos favoráveis deste tipo de planejamento é a realização de poucos experimentos.

Embora, torne-se óbvio que com um número reduzido de níveis não seja possível explorar de maneira completa uma grande região no espaço das variáveis, pode-se observar tendências importantes para a realização de investigações posteriores (CUNICO *et al.*, 2008).

De acordo com os resultados obtidos nessa pesquisa observou-se que as temperaturas mais elevadas favoreceram a produção de metabólitos fenólicos pelo

fungo. Resultados similares têm sido reportados por Liyana-Pathirana e Shahidi (2005) que afirmam que temperaturas altas favorecem a produção de compostos fenólicos e, por conseguinte, aumentam a probabilidade de se encontrar metabólitos fenólicos com capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante).

Com relação a produção de polifenóis observou-se um aumento após a suplementação do meio com uma fonte adicional de nitrogênio, fato que sugere que a produção dos polifenóis possa estar ligada ao consumo ou transformação de fontes de nitrogênio ou que o acréscimo dessa fonte de nitrogênio melhorou a condição de crescimento do fungo para entrada precoce na idiofase.

A avaliação dos extratos dos metabólitos produzidos pelo fungo sugeriu que há existência de substâncias com atividade antioxidante, evidenciadas pelo decaimento da absorbância quando do emprego do método do DPPH. Dentre os diferentes métodos utilizados para determinação de atividade antioxidante, o DPPH é um dos métodos mais simples, barato e rápido para determinação de atividade antioxidante em células e produtos derivados de plantas (FAZAL *et al.*, 2014). O ensaio do DPPH é amplamente utilizado para a medição da capacidade de eliminação de radicais livres em fitotecnologia, tecnologia de alimentos, farmacologia e toxicologia (GEORGETTE *et al.*, 2006).

A avaliação dos extratos oriundos das diferentes condições de cultivo nos faz perceber uma variação na produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante quando foram alteradas as condições iniciais do meio de cultivo, corroborando os dados anteriormente obtidos quando dos ensaios e quantificação de polifenóis e flavonoides presentes nos extratos.

Resultados recentemente publicados por Wu e colaboradores (2011) demonstram que os polifenóis apresentam forte propriedade antioxidante e outros publicados por Formagio e colaboradores (2015) confirmaram a expressiva atividade antioxidante de flavonoides.

Tal fato reitera a importância da variação das condições de cultivo na produção de metabólitos secundários do fungo *Phomopsis sp.*, visando ao aumento de sua atividade antioxidante.

As condições do meio de cultura acrescidas de concentrações maiores da fonte de nitrogênio (peptona) foram importantes para o aumento da produção de metabólitos fenólicos, mas não foram imprescindíveis para o aumento da atividade antioxidante dos extratos, sugerindo que, no caso do extrato produzido pelo fungo *Phomopsis sp.*, a atividade antioxidante pode ser devida à produção de outra classe de compostos químicos, e não somente a de compostos fenólicos e seus derivados, o que também poderia explicar a adequação do modelo de predição à análise da atividade antioxidante dos extratos produzidos e não à produção de polifenóis e flavonoides.

Esses resultados corroboram os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante de extratos do fungo *Phomopsis sp.* que foram identificados e isolados da *Emblica officinalis* e publicados por Nath e colaboradores (2012), assim como, os resultados obtidos nos estudos da influência do nitrogênio na produção de metabólitos secundários descritos por Tudzynski (2014) e Zhang e colaboradores (2015), que afirmaram que os fungos são capazes de responder às mudanças quantitativas e qualitativas na disponibilidade de nitrogênio por meio de mecanismos regulatórios complexos.

O controle do pH e da temperatura influenciou, também, a atividade antioxidante dos extratos obtidos, sendo os valores mais baixos de pH aqueles que apresentaram maior importância para a produção de extratos com melhor atividade antioxidante.

Também foi nessa faixa de pH que se obteve a maior produção dos compostos fenólicos (flavonoides e polifenóis), resultados estes que estão de acordo com os publicados por de Amid e colaboradores (2013), que demonstraram uma alta atividade antioxidante de compostos fenólicos e principalmente de flavonoides.

Destaca-se, também, uma faixa significativa de atividade antioxidante em meios de cultivo com valores de pH iniciais mais elevados, quando avaliou-se a interação das variáveis pH e temperatura, possivelmente devido à produção de outros tipos de compostos capazes de agir como doadores de átomos de hidrogênio à forma radicalar do 2,2-difenil-1-picrilil-hidrazil (DPPH·), reduzindo-o à hidrazina (coloração amarela). A faixa de temperatura de 28°C a 33°C também foi aquela que apresentou melhor influência para a atividade antioxidante, porém nestas condições isso pode ser relacionado à maior produção de flavonoides e polifenóis.

Entretanto, ressalta-se que o efeito do sequestro de radicais (ensaio do DPPH·) é determinado não somente pela reatividade do antioxidante com o radical, mas também pela sua concentração e tempo de reação. Outro fator determinante é a conformação estrutural e o número de grupos hidroxílicos disponíveis para o potencial antioxidante.

Acrescenta-se, ainda, que uma das principais influências na performance da reação do DPPH· é a acessibilidade estérica, tendo em vista que moléculas pequenas podem ter melhor acesso ao sítio do radical quando comparadas a moléculas maiores, podendo aparentar uma maior atividade (ALVES *et al.*, 2010).

Vale lembrar, também, que o cultivo de microrganismos em laboratório requer o cuidado de sempre se procurar simular e manter as mesmas condições de sobrevivência que o microrganismo tem em seu *habitat* natural.

Ressalvas devem ser feitas ao fato de que ainda que se tenha conseguido melhorar as condições de crescimento e produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante pelo fungo *Phomopsis sp.* não se avaliou neste trabalho interações simbióticas ou competitivas comuns no *habitat* natural entre este fungo e outros fungos que foram anteriormente identificados e isolados da *Bauhinia variegata* por Mesquita (2012) e que também devem ser levadas em consideração quando do estudo da planta e isolamento de seus microrganismos endofíticos.

Pelo exposto, pode-se perceber que o planejamento fatorial não determina valores ótimos em uma única etapa, porém este procedimento indica satisfatoriamente o caminho a ser tomado para que se possa atingir o objetivo proposto. Também é importante ressaltar que, embora o sistema permita evidenciar as interações entre as variáveis estudadas, a explicação deve ser fundamentada em argumentos técnicos relacionados com o processo em estudo.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que a otimização das condições de cultivo do fungo *Phomopsis sp.* vem mostrando-se relevante para a produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante.

6. CONCLUSÕES

- A inclusão da etapa de pré-inóculo no processo de cultivo do fungo *Phomopsis sp.* levou a um aumento na produção de alguns metabólitos secundários no meio fermentativo.
- O controle nutricional e os fatores ambientais desempenharam um papel importante na produção de metabólitos secundários pelo fungo *Phomopsis sp.*
- A atividade antioxidante dos extratos dos metabólitos produzidos pelo fungo *Phomopsis sp.* pode ser melhor predita pelo modelo aplicado no planejamento experimental do que a produção de polifenóis e flavonoides nas mesmas condições de cultivo, sugerindo que o fungo produza outros tipos de compostos com atividade antioxidante
- Utilizando-se a ferramenta de planejamento experimental e a metodologia de superfície de resposta (MSR) foi possível investigar a influência das variáveis independentes (pH inicial do meio, temperatura de incubação e concentração de peptona no meio), assim como a forma de interação entre elas, na otimização da produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante pelo fungo *Phomopsis sp.*

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMID, A. *et al.* Observation of antioxidant activity of leaves, callus and suspension culture of *Justicia gendarusa*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 81, p. 18653-18656, 2013.

AMINI, M. *et al.* Application of response surface methodology for optimization of lead biosorption in an aqueous solution by *Aspergillus niger*. **Journal of hazardous materials**, v. 154, n. 1, p. 694-702, 2008.

ANDERMOLEN, K. M. *et al.* Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 71, 2013.

AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 117-137, 1998.

AZEVEDO, J. L. *et al.* Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.

BARROS, B. N.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BASRI, M. *et al.* Comparison of estimation capabilities of response surface methodology (RSM) with artificial neural network (ANN) in lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. **BMC biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 53, 2007.

BAŞ, D.; BOYACI, İ. H. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v. 78, n. 3, p. 836-845, 2007.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BHULLAR, K. S.; RUPASINGHE, H. P. Polyphenols: multipotent therapeutic agents in neurodegenerative diseases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21-32, 2013.

BUTTON, S. T. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados**. 2005. Disponível em: <<http://www.fem.unicamp.br/~sergio1/pos-graduacao/IM317/im317.htm>>. Acesso em: 13 de novembro de 2015.

CHAPLA, V. M. *et al.* Bioactive Secondary Metabolites from *Phomopsis sp.*, an Endophytic Fungus from *Senna spectabilis*. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6597-6608, 2014.

CHAICHANAN, J. *et al.* Optimization of zofimarin production by an endophytic fungus, *Xylaria sp.* Acra L38. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 287-293, 2014.

COLOMBARI, Roland Robert. **Aplicação de delineamento de experimentos para o processo de solda à projeção**. Minas Gerais, 2004. 106 p. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Itajubá.

CUNICO, M. W. M. *et al.* Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v. 9, n. 1, 2008.

DANCEY P. C.; REDY J. **Estatística sem matemática para psicologia**. 5ª ed. Porto Alegre: Penso Editora, 2013.

D'ARCHIVIO, Massimo *et al.* Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 4, p.1321-1342, 2010.

FANG, X. L. *et al.* Optimization of growth medium and fermentation conditions for improved antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila TB* using a statistical approach. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 47, p. 8068-8077, 2010.

FAZAL, H.; ABBASI, B. H.; AHMAD, N. Optimization of Adventitious Root Culture for Production of Biomass and Secondary Metabolites in *Prunella vulgaris L.* **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 174, n. 6, p. 2086-2095, 2014.

FORMAGIO, A. S. N. *et al.* Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 1, p. 69-76, 2015.

GEORGETTI, S. R. *et al.* Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different *in vitro* methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n. 1, p. 99-106, 2006. ISSN 0939-6411.

HUSSIAN, H. *et al.* New Biactive 2,3- epoxy cyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis sp.* from *Laurus Azorica*. **European Journal of Organic Chemistry**, n. 5, p. 749-756, 2009.

JACKSON, M. *et al.* Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. I. Production, taxonomy of the producing organism and biological activity. **The journal of antibiotics**, v. 46, n. 1, p. 34-38, 1993.

JOACHIM, J. *et al.* Anti-Free Radicals: Source, role and application in dermo-cosmetology. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences-Assiut University**, v. 27, n. 1, p. 63-68, 2004.

JORGE, A. J. *et al.* The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. **Asian pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 6, p. 436-442, 2013.

KHAMBHATY, Y. *et al.* Statistical optimization of medium components for κ -carrageenase production by *Pseudomonas elongata*. **Enzyme and microbial technology**, v. 40, n. 4, p. 813-822, 2007.

KIRANMAYI, M. U. *et al.* Optimization of Culturing Conditions for Improved Production of Bioactive Metabolites by *Pseudonocardia sp.* VUK-10. **Mycobiology**, v. 39, n. 3, p. 174, 2011.

KUMAR, P.; SATYANARAYANA, T. Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginate-entrapped *Thermomucor indicae-seudaticae* using statistical methods. **Bioresource technology**, v. 98, n. 6, p. 1252-1259, 2007.

KUMAR, S. N. *et al.* Molecular characterization of forest soil based *Paenibacillus elgii* and optimization of various culture conditions for its improved antimicrobial activity. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

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

MANACH, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **The american journal of clinical nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MESQUITA, Pedro Góes. **Bioprospecção de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata*: busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substâncias antioxidantes**. Brasília, 2012. 102 p. Dissertação. Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília.

MCCORD, J. M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The american journal of medicine**, v. 108, n. 8, p. 652-659, 2000.

MIAO, L. I.; KWONG, T.; QIAN, P. Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium cf saccharicola*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 5, p. 1063-1073, 2006.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal Sci Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

NATH, A.; RAGHUNATHA, P.; JOSHI, S. R. Diversity and biological activities of endophytic fungi of *Emblica officinalis*, an ethnomedicinal plant of India. **Mycobiology**, v. 40, n. 1, p. 8-13, 2012.

PALKOVÁ, Z.; Multicelular microorganism: laboratory versus nature. **EMBO Reports**, v.5, p.470-476, 2004.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada?. **Engenharia sanitária e ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.

RATZ-ŁYKO, A. *et al.* Influence of Polyphenols on the Physiological Processes in the Skin. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 4, p. 509-517, 2015.

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

RUKACHAISIRIKUL, V. *et al.* Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis sp.* PSU-D15. **Phytochemistry**, v. 69, n. 3, p. 783-787, 2008.

SADRATI, N. *et al.* Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). **Journal of plant protection research**, v. 53, n. 2, p. 128-136, 2013.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1, p. 215S-217S, 2005.

SILVA, J. A. *et al.* Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1073-1077, 2008.

SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and purification technology**, v. 55, n. 3, p. 381-387, 2007.

SIMÕES, C.M.O. *et al*, **Farmacognosia. Da planta ao medicamento**. 6ª Edição. SC: editora da UFSC. 2007.

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

SOUAGUI, Y. *et al*. Optimization of antifungal production by an alkaliphilic and halotolerant actinomycete, *Streptomyces* sp. SY-BS5, using response surface methodology. **Journal of medical mycology**, 2015.

TAHARA, S. **Planejamento de experimentos (DOE)**. São Paulo, 2008. Disponível em: < <http://www.portaldeconhecimentos.org.br/index.php/por/Conteudo/Planejamento-de-Experimentos-DOE>>. Acesso em: 30 dez. 2015.

TORTURA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. **Microbiologia**, 10ª Edição. Porto Alegre: artmed, 2012.

TRANTAS, E. A. *et al*. When plants produce not enough or at all: metabolic engineering of flavonoids in microbial hosts. **Frontiers in plant science**, v. 6, 2015.

TUDZYNSKI, B. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. **Frontiers in microbiology**, v. 5, 2014.

VANDERMOLEN, K. M. *et al*. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 71, 2013.

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Optimization of culture conditions for flexirubin production by *Chryseobacterium artocarpi* CECT 8497 using response surface methodology. **Acta biochimica Polonica**, 2015.

WANG, Y. *et al*. Improvement of antibiotic activity of *Xenorhabdus bovienii* by medium optimization using response surface methodology. **Microbial cell factories**, v. 10, n. 98, p. 1-15, 2011.

WANG, Y. *et al*. Enhanced antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila* by medium optimization. **Bioresource technology**, v. 99, n. 6, p. 1708-1715, 2008.

WU, X.; YU, X.; JING, H. Optimization of phenolic antioxidant extraction from *Wuweizi* (*Schisandra chinensis*) pulp using random-centroid optimization methodology. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 9, p. 6255-6266, 2011.

YANG, C. S. *et al.* Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual review of nutrition**, v. 21, n. 1, p. 381-406, 2001.

ZAFERANLOO, B. *et al.* Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 1755-1762, 2014.

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

ZHANG, J. *et al.* Optimization of culture medium compositions for gellan gum production by a halobacterium *Sphingomonas paucimobilis*. **Carbohydrate polymers**, v. 115, p. 694-700, 2015.