

**PEDRO GÓES MESQUITA**

**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, 2011**

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

**PEDRO GÓES MESQUITA**

**Bioprospecção de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata* - busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substâncias antioxidantes.**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Borin**

**Brasília**  
**2011**

**PEDRO GÓES MESQUITA**

**Bioprospecção de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata* - busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substâncias antioxidantes.**

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

**Aprovado em 2 de Agosto de 2011.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

**Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves  
Universidade de Brasília**

---

**Prof. Dr. Guilherme Martins Santos  
Medical Research Council-Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, MRC-  
LMB, Grã-Bretanha.**

**"Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo nem ensino".**

**Paulo Freire**

**Aos meus pais Alcione e Ana, aos  
meus irmão, Paulo e Luís.**

**À minha amada, Laura.**

## **AGRADECIMENTOS**

À Laurinha, minha grande companheira, a quem sempre posso contar em todas as horas.

Aos meus pais Alcione e Ana pelo amor, carinho e apoio incondicional.

Aos meus irmão Paulo e Luís pelo companherismo, força, amizade, cumplicidade e ajuda em todos os momentos da minha vida.

A toda minha família querida e a todos os meus amigos de quem sempre tive apoio.

À minha orientadora Fátima, pelos ensinamentos, amizade, compreensão e apoio que vem desde a graduação e que só aumentam.

Aos professores Francisco, Luiz, Marie, Pérola, Andrea, Dâmaris, Janeth, Angélica, Karime pelo apoio, colaboração, incentivo e docência.

À Cristina e Rilva pela atenção e ajuda em todos os momentos em que precisei.

A todos do Laboratório de Farmacologia Molecular.

A todos os funcionários da UnB.

Ao mestre em fitopatologia Paulo Góes Mesquita, pela ajuda na produção das lâminas dos fungos.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF – processo 193.000.376/2008) e à Fundação de Empreendimentos Científicos e Tecnológicos (FINATEC) pelo apoio financeiro a este trabalho.

À sociedade brasileira.

Muito obrigado.

## RESUMO

O *diabetes mellitus* é uma desordem metabólica que acomete milhões de pessoas em todo o mundo e que está associada à disfunção de vários órgãos, à diminuição da expectativa de vida, além da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Tiazolidinadionas são substâncias agonistas totais de receptores ativados por proliferadores peroxissomais  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), capazes de aumentar a sensibilidade à insulina e, por isso, utilizadas no tratamento do diabetes tipo 2. Porém, estas substâncias promovem o aparecimento de efeitos adversos durante o tratamento, como aumento no risco do infarto do miocárdio, hepatopatia e ganho de peso. Por causa dos efeitos indesejados, substâncias que possam substituir a terapia com tiazolidinadionas no tratamento do diabetes têm sido buscadas. Estudos recentes mostraram que extratos das folhas da *Bauhinia variegata* são capazes de ativar o PPAR $\gamma$  e, ainda, que ligantes de PPARs podem regular a produção de EROs. Fungos endofíticos, microrganismos que colonizam os tecidos das plantas de forma simbiótica, são responsáveis pela produção de produtos naturais com efeitos biológicos importantes. Alguns deles são capazes de produzir os mesmos metabólitos que seu hospedeiro produz. O objetivo deste trabalho foi isolar das folhas de *Bauhinia variegata* fungos endofíticos que pudessem ser avaliados como fonte de compostos antioxidantes e agonistas a receptores nucleares PPAR $\gamma$ . Nove extratos de cultura dos fungos endofíticos das folhas de *Bauhinia variegata* foram obtidos; todos apresentaram atividade antioxidante no ensaio sequestro do radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) e um desses extratos, que apresentou a menor taxa de atividade antioxidante, apresentou atividade agonista parcial ao PPAR $\gamma$  quando avaliado pelo ensaio de gene repórter. Além disso, todos os extratos apresentaram altos teores de polifenóis e flavonóides nas quantificações realizadas pelos métodos Folin-Ciocalteu e cloreto de alumínio, respectivamente. Estudos posteriores devem ser realizados para melhor elucidar esta relação PPAR/EROs.

**Palavras-Chave:** PPAR $\gamma$ ; antioxidante; diabetes; fungos endofíticos; *Bauhinia variegata*; polifenóis; flavonóides.

## ABSTRACT

*Diabetes mellitus* is a metabolic disorder that affects millions of people worldwide and it is associated with multiple organ diseases, decreased life expectancy, besides the production of reactive oxygen species (ROS). Thiazolidinediones, full agonists of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), are able to increase insulin sensitivity and, therefore, they are used in the treatment of type 2 diabetes. However, these substances can promote the coming out of adverse effects during the treatment, such as increased risk of myocardial infarction, liver disease and weight gain. Because of the unwanted effects, substances that could replace the thiazolidinedione therapy in diabetes care have been pursued. Recent studies have shown that extracts of the *Bauhinia variegata* leaves are able to activate the PPAR $\gamma$ , and also that PPARs ligands can regulate the production of ROS. Endophytic fungi, microorganisms that colonize the tissues of plants in a symbiotic form, are responsible for the production of natural products with important biological effects. Some of them are capable of producing the same metabolites produced by their host plants. The objective of this study was to isolate endophytic fungi from the *Bauhinia variegata* leaves that could be evaluated as a source of antioxidant compounds and agonists of PPAR $\gamma$ . Nine extracts were produced from cultures of endophytic fungi isolated from *Bauhinia variegata* leaves, and all of them showed antioxidant activity in the scavenge the stable radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH $\bullet$ ). Among the extracts, the one showing the lowest rate of antioxidant activity, was the only one that showed partial agonist activity to PPAR $\gamma$ , according to reporter gene assay. In addition, all extracts produced showed high levels of polyphenols and flavonoids in the measurements carried out by the methods of Folin-Ciocalteu and aluminum chloride, respectively. Further studies should be conducted to further elucidate this relationship PPAR/ROS.

**Keywords:** PPAR $\gamma$ ; antioxidant; diabetes; endophytic fungi; *Bauhinia variegata*; polyphenols; flavonoids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Simbiose mutualística de três vias. ....	23
Figura 2 – Modelo da estrutura do receptor nuclear.....	26
Figura 3 - As principais funções metabólicas reguladas pelos receptores PPAR nos diferentes tecidos. ....	27
Figura 4 – Mecanismo de ação do PPAR. ....	28
Figura 5 – Espécies reativas do oxigênio.....	30
Figura 6 – Mecanismo de liberação de óxido nítrico endotelial (NO•) e estimulação da expressão gênica mediada por ligantes de PPAR $\gamma$ . ....	34
Figura 7 – (A) Estrutura básica dos flavonóides. (B) Estrutura da molécula de quercetina com destaque para os grupamentos responsáveis pela atividade antioxidante. (C) Mecanismo de redução das EROs pelos flavonóides. ....	36
Figura 8 - Crescimento inicial dos fungos endofíticos. ....	40
Figura 9 - Folha de <i>Bauhinia variegata</i> . ....	47
Figura 10 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo I isolado da folha da <i>Bauhinia variegata</i> . ....	48
Figura 11 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo II isolado da folha da <i>Bauhinia variegata</i> . ....	49
Figura 12 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo III isolado da folha de <i>Bauhinia variegata</i> . ....	50
Figura 13 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo IV isolado da folha de <i>Bauhinia variegata</i> . ....	51
Figura 14 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo V isolado da folha de <i>Bauhinia variegata</i> . ....	52
Figura 15 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo VI isolado da folha de <i>Bauhinia variegata</i> . ....	53
Figura 16 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo VII isolado da folha de <i>Bauhinia variegata</i> . ....	54
Figura 17 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo VIII isolado da folha de <i>Bauhinia variegata</i> . ....	55
Figura 18 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo IX isolado da folha de <i>Bauhinia variegata</i> . ....	56

Figura 19 - Valores de IC <sub>50</sub> obtidos para os extratos e padrões avaliados no ensaio de atividade antioxidante.....	58
Figura 20 – Curva de calibração do ácido gálico.....	59
Figura 21 – Curva de calibração da quercetina.....	60
Figura 22 - Comparação entre o teor de polifenóis e de flavonóides dos extratos dos fluidos de cultura dos fungos endofíticos de <i>Bauhinia variegata</i> .....	61
Figura 23 – Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo I.....	62
Figura 24 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo II.....	63
Figura 25 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo III.....	63
Figura 26 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo IV. ....	64
Figura 27 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo V. ....	64
Figura 28 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo VI. ....	65
Figura 29 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo VII. ....	65
Figura 30 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo VIII. ....	66
Figura 31 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo IX. ....	66
Figura 32 – Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo I. ....	67
Figura 33 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo II. ....	68
Figura 34 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo III. ....	68
Figura 35 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo IV.....	69
Figura 36 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo V.....	69
Figura 37 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo VI.....	70
Figura 38 – Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo VII.....	70
Figura 39 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo VIII.....	71
Figura 40 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo IX.....	71

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1- Países com maior número de pessoas de 20 a 79 anos com diabetes. ...	18
Tabela 2 - Rendimento dos extratos dos fluidos de cultura.....	57
Tabela 3 - Quantificação de polifenóis totais nos extratos de cultura.....	60
Tabela 4 - Quantificação de flavonóides totais nos extratos de cultura.....	61
Tabela 5 – Resumo dos resultados.....	72

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AF-1	Função de ativação 1
AF-2	Função de ativação 2
AGEs	Produtos finais da glicosilação avançada
ATP	Adenosina trifosfato
cDNA	DNA complementar
CMV	Citomegalovirus
CThTV	Vírus da tolerância termal da <i>Curvularia</i>
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH•	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
eNOS	Enzima oxido nítrico sintetase endotelial
EROs	Espécies reativas do oxigênio
Flav-O•	Radical aroxil flavonóide
GAL4	Fator de transcrição de leveduras
GLUT4	Proteína transportadora de glicose tipo 4
GO	glicose oxidase
GSH	Glutationa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H9c2	Cardiomiócitos de ratos
HDACs	Enzima histona deacetilases
HIT-T15	Linhagem de célula $\beta$
iNOS	Óxido nítrico sintetase
LB	Meio Luria Bertani
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
Luc	Luciferase
mRNA	RNA mensageiro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
NCoEx	Fatores nucleares de mudança nos correpressores
NO•	Radical óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	Ânion radical superóxido
OH•	Radical hidroxila
ONOO <sup>-</sup>	Ânion peroxinitrito
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PDX-1	Fator de transcrição para a expressão do gene da insulina
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
PPRE	Elemento responsivo ao PPAR

ROS	Reactive oxygen species
RXR	Receptor do ácido retinóico X
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Enzima superóxido dismutase
UbcH5	Enzima de conjugação ubiquitina E2
VSMCs	Células do músculo liso vascular

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 O diabetes.....	16
1.2 Os produtos naturais, o Cerrado e a Bauhinia variegata.....	18
1.3 Os fungos endofíticos.....	22
1.4 Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs). .....	25
1.5 O estresse oxidativo e os antioxidantes. ....	29
1.6 O efeito do estresse oxidativo sobre as células $\beta$ . ....	31
1.7 Estresse oxidativo e o PPAR. ....	32
1.8 Polifenóis e flavonóides.....	35
2. OBJETIVOS .....	38
2.1 Objetivo geral. ....	38
2.2 Objetivos específicos. ....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Equipamentos. ....	39
3.2 Métodos. ....	39
3.2.1 Isolamento dos fungos endofíticos.....	39
3.2.2 Manutenção das cepas.....	40
3.2.3 Avaliação das características microscópicas dos fungos isolados - coloração com azul de algodão.....	40
3.2.4 Fermentação em cultura líquida submersa.....	41
3.2.5 Preparo dos extratos das culturas. ....	41
3.2.6 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	41
3.2.7 Quantificação de polifenóis totais. ....	42
3.2.8 Quantificação de flavonóides totais. ....	42
3.2.9 Cultura de células. ....	43

3.2.10	Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade dos extratos em células mesangiais.....	43
3.2.11	Atividade agonista ao receptor PPAR $\gamma$ – ensaio de gene repórter. ....	44
3.2.12	Análise estatística.....	46
4.	RESULTADOS.....	47
4.1	Isolamento dos fungos endofíticos das folhas de <i>Bauhinia variegata</i> . ....	47
4.2	Fermentação em cultura líquida submersa e obtenção dos extratos das culturas.....	57
4.3	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> .....	58
4.4	Quantificação de polifenóis e flavonóides totais.....	59
4.5	Avaliação da citotoxicidade dos extratos – ensaio do MTT.....	62
4.6	Avaliação da atividade agonista ao receptor PPAR $\gamma$ – ensaio de gene repórter.....	67
4.7	Resumo dos resultados obtidos. ....	72
5.	DISCUSSÃO.....	73
5.1	Isolamento de fungos e produção dos extratos.....	75
5.2	Atividade Antioxidante.....	77
5.3	Quantificação de Polifenóis e Flavonóides.....	80
5.4	Ensaio de citotoxicidade (MTT).....	83
5.5	Atividade agonista ao PPAR $\gamma$ .....	84
6.	CONCLUSÃO.....	88
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O diabetes.

O *diabetes mellitus* é uma desordem metabólica caracterizada por causar hiperglicemia e alteração no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, ocasionados pela ausência da secreção de insulina ou por ausência da ação deste hormônio (1).

A hiperglicemia contribui fundamentalmente com a disfunção endotelial e com a manifestação e a progressão das complicações vasculares, que é a primeira causa de morbidade e mortalidade em pacientes com *diabetes mellitus*. A hiperglicemia também está relacionada a doenças cardíacas e cerebrovasculares, neuropatias e retinopatias. Além disso, regula o sistema renina-angiotensina e a produção de óxido nítrico vascular, importante na proteção endotelial, podendo, assim, alterar a vasoconstrição, contribuindo para a hipertensão arterial (2).

Os principais tipos de diabetes são o do tipo 1 e tipo 2. No diabetes tipo 1, o indivíduo não produz insulina, ou a produção se dá em quantidades muito pequenas. Isso ocorre, principalmente, por destruição auto-imune das células  $\beta$  pancreáticas, produtoras do hormônio. Neste caso, o tratamento se faz por reposição do hormônio insulina, geralmente utilizando um esquema de dose associando insulina de curta e de longa duração (3). O principal objetivo nesse tratamento é conseguir que se tenha um efeito prolongado e reprodutivo das concentrações normoglicêmicas do paciente, mas o que se vê ainda são variações das concentrações glicêmicas (4).

No diabetes tipo 2, o indivíduo apresenta deficiência na secreção de insulina ou resistência à insulina, sendo que esses fatores são importantes no desenvolvimento do diabetes tipo 1 (5). O tratamento do diabetes tipo 2 se faz com a prática de exercícios físicos associada ao uso de hipoglicemiantes orais, que, por meio de mecanismos de ação distintos, são capazes de aumentar a sensibilidade à insulina (metformina, tiazolidinadionas), aumentar a secreção de insulina (sulfoniluréias), diminuir a liberação de glicose no fígado (metformina) ou diminuir a absorção de carboidratos (inibidores da alfa-glicosidase, como a acarbose) (6). Apesar de serem tratamentos eficazes no controle da hiperglicemia do diabetes tipo 2, ainda existem muitos efeitos colaterais relacionados ao uso desses

medicamentos, como distúrbios gastrointestinais (metformina) (7), aumento no risco de infarto no miocárdio (rosiglitazona) (8), dor, distensão abdominal, flatulência e diarreia (acarbose) (9) e hipoglicemia severa (sulfoniluréias) (10).

O diabetes está associado a complicações, disfunções e insuficiência de vários órgãos, especialmente olhos, rins, nervos, cérebro, coração e vasos sanguíneos (11), assim como à diminuição da expectativa de vida.

É preocupante o aumento exacerbado, em nível mundial, dos casos de diabetes, considerado como uma pandemia pela Declaração das Américas. Nos Estados Unidos, homens diabéticos com mais de 50 anos têm, em média, 8,2 anos a menos em sua expectativa de vida quando comparados com homens não diabéticos, e para mulheres esta diminuição na expectativa de vida é de 7,5 anos (12).

Em trabalho publicado por Wild e colaboradores em 2004 (13), estimava-se que em 2030 o número de pessoas diabéticas no mundo seria de 336 milhões, mas em um levantamento mais recente, feito por Shaw e colaboradores em 2010 (14), foi estimado que 285 milhões de pessoas adultas fossem diabéticas na época e que em 2030, com o aumento da população, com a urbanização associada a um estilo de vida sedentário e o envelhecimento, esse número pudesse chegar a 439 milhões de adultos.

No Brasil, a probabilidade é de que o número suba de 7,6 milhões em 2010 para 12,7 milhões em 2030, quase que dobrando o número de pessoas com diabetes em 20 anos. Esses números colocam o Brasil na 5ª posição entre países com maior número de pessoas diabéticas cuja idade varia entre 20 e 79 anos (Tabela 1) (14).

**Tabela 1- Países com maior número de pessoas de 20 a 79 anos com diabetes.**

	2010		2030	
	País	Número de adultos diabéticos (milhões)	País	Número de adultos diabéticos (milhões)
1	Índia	50,8	Índia	87,0
2	China	43,2	China	62,6
3	Estados Unidos	26,8	Estados Unidos	36,0
4	Rússia	9,6	Paquistão	13,8
5	Brasil	7,6	Brasil	12,7
6	Alemanha	7,5	Indonésia	12,0
7	Paquistão	7,1	México	11,9
8	Japão	7,1	Bangladesh	10,4
9	Indonésia	7,0	Rússia	10,3
10	México	6,8	Egito	8,6

Legenda: Estimativa do crescimento de pessoas diabéticas adultas (20 a 79 anos de idade) para o ano de 2030. Adaptado de Shaw e colaboradores (14).

Diante deste panorama, fica evidente que o diabetes é um importante problema para a saúde pública e que seu tratamento, o desenvolvimento de programas de saúde eficazes e a pesquisa de novas moléculas hipoglicemiantes são necessários para melhor elucidar e combater esta desordem metabólica.

Historicamente, a superação de tais problemas tem sido um desafio cada vez maior, e nesta ação a natureza tem se demonstrado como uma importante fonte para a descoberta de novos fármacos, aproximando a medicina do estudo de produtos naturais.

## **1.2 Os produtos naturais, o Cerrado e a *Bauhinia variegata*.**

Por milhares de anos, a medicina e os produtos naturais têm sido intimamente relacionados. Estudos clínicos, químicos e farmacológicos dos medicamentos tradicionais que derivaram, predominantemente, de plantas foram a base da descoberta da maioria dos fármacos mais antigos, como o ácido acetilsalicílico, a digitoxina, a morfina, a quinina e a pilocarpina (15). Baseado na observação empírica, os produtos naturais foram os primeiros e, por muito tempo, os únicos medicamentos disponíveis para o homem (16).

Fósseis demonstram o uso de plantas como fármacos por humanos pelo menos desde a era Paleolítica média, cerca de 60.000 anos atrás. O desenvolvimento de sistemas tradicionais da medicina incorporando plantas como uma terapia principal pode ser encontrado na história do mundo desde que documentos começaram a ser registrados (17). O valor desses registros está na sistemática de agentes medicinais que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), ainda hoje, quase 65% da população do mundo têm incorporado na sua modalidade primária de cuidados com a saúde (18).

O uso da natureza como fonte para a descoberta de novos fármacos tem grandes vantagens, como a alta diversidade química dos compostos naturais; o efeito evolutivo sobre os seres vivos que produzem metabólitos secundários, favorecendo sua sobrevivência; a estrutura química mais estável desses metabólitos, quando comparados a compostos sintéticos; e a existência de fontes de grande número de produtos naturais que foram pouco estudadas, como organismos marinhos e microrganismos (19).

Em 1997, era estimado que somente entre 5 e 15% de aproximadamente 250.000 espécies de plantas superiores haviam sido estudadas para a verificação de presença de compostos bioativos (20). Além disso, até 2002, se supunha que mais de 99% dos microrganismos do solo ainda não tinham sido geneticamente caracterizados, apesar de serem responsáveis pela produção de grande quantidade de metabólitos secundários (21).

Apesar da importância das pesquisas com produtos naturais, grandes empresas farmacêuticas interromperam suas atividades neste campo, uma vez que este passou a ser, do ponto de vista econômico, de pouco interesse, em função das descobertas de novas técnicas de desenvolvimento de moléculas sintéticas por meio de *High Throughput Screening*, em que grandes bibliotecas de compostos químicos são testados em curto período de tempo (15, 22-23).

Além disso, com o sequenciamento genômico, houve uma explosão no conhecimento de produtos protéicos e a descoberta de alvos moleculares associados a várias doenças, como diabetes, obesidade e câncer (24). Novos biofármacos também tiveram papel significativo nos lançamentos de novos medicamentos por empresas farmacêuticas nos últimos anos (19).

Porém, o interesse predominante por busca de novos fármacos por métodos de síntese química está mais ligado ao interesse econômico do aproveitamento de

tecnologias já desenvolvidas, pois quando um fármaco perde sua patente, por causa da competição com empresas produtoras de medicamentos genéricos, o lucro pode cair em até 80%. Nos próximos dois anos, por volta de 25% das patentes das drogas no mercado americano irão expirar, removendo cerca de US\$ 63 bilhões de dólares das contas das indústrias farmacêuticas até 2014. Isso gera a necessidade da obtenção de novos fármacos rapidamente, de modo que a indústria dê continuidade a suas vendas. Por sua vez, produtos naturais geralmente não podem ser submetidos à triagem de alto rendimento, além de terem moléculas complexas, que são mais dispendiosas quanto à identificação e processamento, quando comparadas aos fármacos sintéticos (25-26).

Contudo, o uso desse argumento utilizado pelas indústrias só se aplica quando se pensa mais no aspecto financeiro do que no benefício que essas moléculas podem trazer para a sociedade.

Newman e Cragg (27) fizeram, em 2007, um levantamento de todas as moléculas aprovadas de 1981 até 2006 pela *Food and Drug Administration* (FDA), órgão que regulamenta o uso de medicamentos e alimentos dos Estados Unidos. Em contraposição à lógica que privilegia o ponto de vista econômico e os lucros, os autores demonstraram que 30% dessas moléculas aprovadas pelo FDA eram de origem sintética; 52% tinham ligação direta com produtos naturais e 18% eram biofármacos. Esses dados mostram a importância da continuidade da busca de produtos naturais com atividade biológica, pois, de acordo com o exposto, a procura de moléculas bioativas provenientes de produtos naturais ainda gera maior sucesso quando se observa o número de novos fármacos registrados para terapias por agências reguladoras.

Vários produtos fitoterápicos ou derivados de plantas, tais como digoxina, digitoxina, morfina, reserpina, taxol, vincristina, vimblastina, *Ginkgo biloba*, alho, *Echinacea*, tanaceto, erva-de-são-joão, palmeira serenoa e amora (17); de fungos, como antibiótico  $\beta$ -lactâmicos, ciclosporina A, taxol, alcalóides do ergot, lovastatina e sinvastatina (28); e de organismos marinhos (29), como citarabina, ziconoítida e trabectedina, podem ser citados como exemplos de medicamentos usados no tratamento de várias doenças. Estes produtos têm ação antitumoral, hipotensora, hipercolesterolêmica, em desordens neurológicas, imunossupressoras, hipoglicemiantes, entre outras (30).

Por isso, a integração pela busca de moléculas ativas em produtos naturais com as técnicas de fracionamento, identificação e modelagem química de moléculas com atividade terapêutica é um caminho promissor na procura de novos tratamentos com maior segurança e eficácia (21, 31-33).

O Brasil se destaca no que diz respeito a sua grande diversidade biológica, estando em posição estratégica na exploração racional e sustentável de novos metabólitos com valor terapêutico provenientes de produtos naturais. Sua grande extensão territorial com diferenças ambientais promove pressões seletivas para adaptação de animais, plantas e microrganismos (34-35).

O Cerrado brasileiro, a maior e a mais rica savana tropical do mundo, com uma área de 1,86 milhões de Km<sup>2</sup>, cobrindo 25% do seu território, faz parte desta vasta diversidade biológica (36-37). O potencial de fármacos oriundos da microbiota deste bioma continua pouco explorado e o interesse por novos compostos com atividade hipoglicemiante tem crescido nos últimos anos. Por isso, a exploração do bioma Cerrado na procura de produtos naturais com atividade biológica surge como uma boa perspectiva para a busca desses fármacos.

A *Bauhinia variegata*, uma espécie da família Leguminosae, subfamília Caesalpinioideae ou Caesalpinaceae, de origem asiática e situada principalmente em regiões tropicais de todo o mundo é uma planta muito bem adaptada ao clima brasileiro e é encontrada em todo território, principalmente nas regiões sudeste e Centro-oeste. Podem ser usadas para ornamentação, produção de papel e celulose, plantio de proteção e reflorestamento de áreas degradadas. Além disso, a droga vegetal é muito utilizada popularmente, no tratamento de várias doenças, especialmente em processos infecciosos, processos dolorosos e diabetes (38-39).

A infusão de cascas da espécie *Bauhinia variegata* é usada popularmente como adstringente, tônico e no tratamento de doenças de pele e úlceras. O decocto das raízes é utilizado na dispepsia e como antídoto ao veneno de cobra (38) e a infusão ou decocto das folhas é utilizada como hipoglicemiante (40).

Algumas espécies de *Bauhinia* já tiveram seus efeitos hipoglicemiantes comprovados, como, por exemplo, as espécies *B. divaricata*, *B. candicans* e *B. forficata*. Flavonóides presentes no extrato hidroalcoólico de *B. variegata* também foram descritos como hipoglicemiantes em ratos com diabetes tipo 1, induzido por estreptozotocina (41-42). Além disso, essa planta produz importantes substâncias com potencial terapêutico como flavonóides, taninos, alcalóides, esteroides,

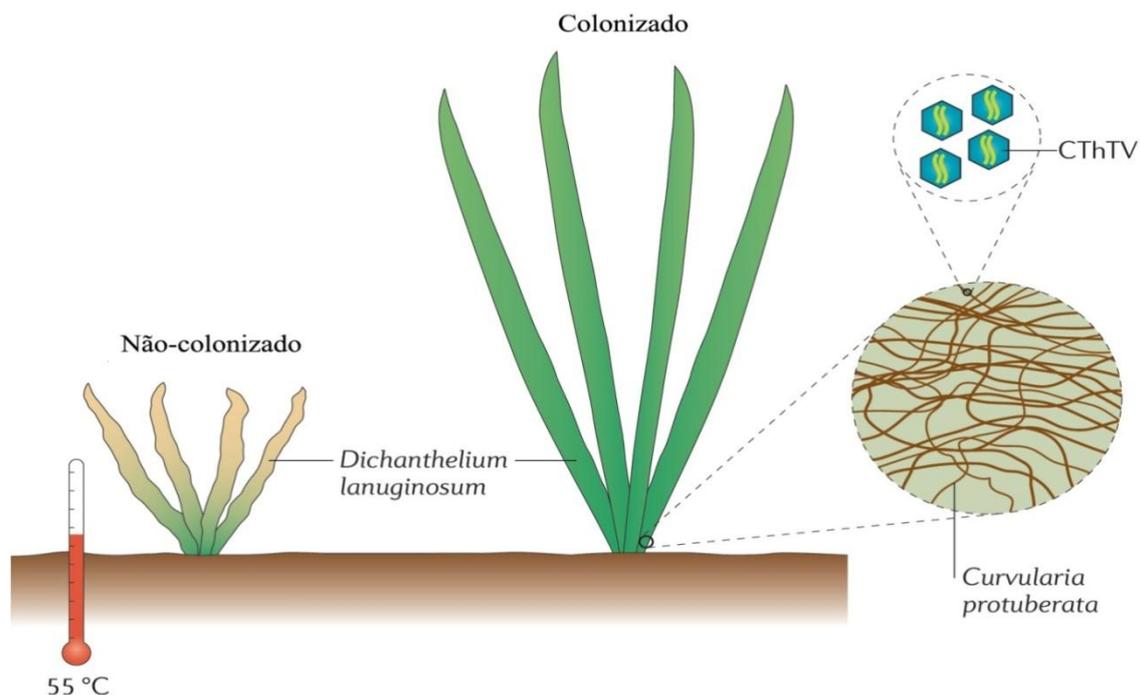
naftoquinonas e sesquiterpenos. No Cerrado, a *Bahuinia variegata* produz maior quantidade de compostos fenólicos, por causa do estresse ambiental que sofre neste clima subtropical (43).

Os fungos são organismos importantes na procura de substâncias para o tratamento de várias doenças. Entre eles estão os fungos endofíticos, que se caracterizam por colonizar os tecidos das plantas de forma simbiótica, sendo essa a razão para a produção de grande quantidade de metabólitos secundários. Em alguns casos, a planta hospedeira e o fungo são capazes de produzir os mesmos metabólitos (44). Entretanto, até o momento, não existem trabalhos publicados que descrevam fungos endofíticos isolados de *Bahuinia variegata*.

### **1.3 Os fungos endofíticos.**

Os fungos mostraram-se como uma fonte de produtos naturais importantes no último século. Entre esses produtos estão: antibióticos, como a penicilina; imunossuppressores, como a ciclosporina A; hipocolesterolêmicos, como a sinvastatina; agente antitumoral, como o taxol; micotoxinas; pigmentos e ácidos graxos poliinsaturados (28, 30). Nesse sentido, apresentam um enorme potencial para a busca de novos fármacos, considerando-se que somente cerca de 7% dos fungos existentes tenham sido descritos (45).

Estima-se que 1,5 milhões de espécies de fungos estejam presentes no nosso planeta (46). Dentre esses estão os fungos endofíticos, microrganismos pertencentes a várias ordens de fungos, que colonizam os tecidos vivos e internos das plantas, de forma intracelular ou extracelular, em uma relação que varia da simbiose à linha limítrofe da patogenicidade (47-48). Esses organismos normalmente produzem uma grande variedade de compostos orgânicos, em virtude da estreita interação metabólica com seus hospedeiros, que resulta em um metabolismo secundário particularmente ativo (47). Muitos deles têm importância na adaptação e seleção de várias espécies vegetais, como, por exemplo, produzindo substâncias que impedem ataques de insetos, que deixam a planta com sabor desagradável ou, ainda, favorecendo o seu crescimento em ambientes hostis (Figura 1) (49-51).



**Figura 1 – Simbiose mutualística de três vias.**

*Dichanthelium lanuginosum* habita solos geotermiais a mais de 50°C e necessita do fungo endofítico *Curvularia protuberata* para sobreviver nessa temperatura. O fungo endofítico, por sua vez, necessita de um vírus (vírus da tolerância termal da *Curvularia* – CThTV) para lhe conferir esta tolerância térmica. Adaptado de Roossinck e colaboradores, 2011 (52).

Em comparação com fungos fitopatogênicos e fungos de solo, poucos metabólitos secundários de fungos endofíticos foram isolados e estudados (45), apesar de que esse panorama está mudando. Em 1970, o número de trabalhos publicados acerca dos fungos endofíticos era de 0,8 por ano e a partir de 2001 passaram a mais de 200 por ano (53). Os achados até hoje publicados indicam que eles são fontes promissoras de moléculas bioativas. Seus metabólitos secundários mostraram atividade biológica leishmanicida (54), antifúngica (55-56), anticancerígena (44, 57-60), na ativação do receptor da insulina (61) e antiviral (62).

Em alguns casos, os metabólitos secundários produzidos pelas plantas hospedeiras também são produzidos pelos fungos endofíticos. O estudo de Stierle e colaboradores (44) mostrou, em 1993, que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* era capaz de produzir o anticancerígeno taxol (Paclitaxel), também produzido por seu hospedeiro, o *Taxus brevifolia*. Após a publicação deste trabalho, vários pesquisadores encontraram mais de 20 gêneros diferentes de fungos produtores de taxol (63).

Uma limitação na extração do taxol da planta *Taxus brevifolia* diz respeito à grande quantidade de droga vegetal necessária para a obtenção do composto ativo, considerando-se que, por exemplo, para a obtenção de 1 kg de taxol são necessários, em média, 10 toneladas da casca da planta, o equivalente a 300 árvores.

A vantagem da obtenção do taxol dos fungos está na possibilidade de manipulação genética e dos processos fermentativos de cepas dos fungos produtores para que possam produzir uma maior quantidade do composto de interesse. Entretanto, ainda não existe uma cepa de fungo com capacidade de produzir grande quantidade de taxol. Até hoje, o que se conseguiu foi um rendimento de 468,62 µg/L de taxol, ainda um pouco distante da produção industrial ideal, que seria uma produção de 1 mg/L (60, 63).

Essa capacidade do fungo de exibir o mesmo perfil metabólico que o da planta hospedeira, em alguns casos, pode ser explicada pela recombinação gênica sofrida pelos fungos durante o processo evolutivo ocorrido com a simbiose entre o fungo endofítico e o hospedeiro (64-65).

Apesar de vários estudos mostrarem a composição e diversidade desses fungos, a compreensão de como a relação simbiótica se dá ainda é limitada. Supõe-se que essa relação evolutiva provavelmente foi estabelecida desde o surgimento das plantas superiores, há milhares de anos atrás. Além disso, fungos endofíticos que podem ter origem nos fungos patogênicos e vice-versa. Em alguns ambientes, os fungos endofíticos podem invadir o tecido do hospedeiro por meio de feridas e do uso de enzimas hidrolíticas, como celulasas e pectinases, sendo essas estratégias de invasão do hospedeiro semelhantes às usadas por fungos fitopatogênicos (51, 53, 64-65).

Várias pesquisas sobre a atuação de produtos naturais nos diversos mecanismos da fisiopatologia do diabetes, e outros distúrbios metabólicos, têm sido realizadas nas últimas décadas. As atividades benéficas encontradas nas plantas medicinais as tornam um excelente alvo de novos modelos terapêuticos para o tratamento desta doença, com características multifatoriais de patogenicidade (42, 66). Assim, os estudos têm envolvido a busca de compostos naturais em meio à vasta flora mundial, baseada no uso tradicional de plantas como hipoglicemiantes orais (67-69) e em formulações polisherbais típicas (70).

Com os fungos endofíticos esse panorama não é diferente. Com base no que foi levantado, esses organismos têm grande potencial na busca de novos hipoglicemiantes, pois, até hoje, nenhum trabalho mostrou a avaliação da atividade de extratos de fungos endofíticos sobre receptores nucleares ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR), fatores de transcrição responsáveis por regular vias metabólicas.

#### **1.4 Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs).**

PPARs são fatores de transcrição da família de receptores nucleares controladores de vários genes envolvidos no metabolismo de lipídeos que, por sua vez, estão envolvidos na proliferação celular, nas respostas inflamatórias, na aterosclerose, na carcinogênese, na lipogênese, na sensibilidade a insulina e oxidação de ácidos graxos (71-72).

Esses receptores estão divididos em três isoformas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  e PPAR $\beta/\delta$ . A primeira, PPAR $\alpha$ , regula genes envolvidos em mudanças do catabolismo de ácidos graxos durante o jejum e a alimentação para a conservação de energia. Também ativam a transcrição de proteínas de ligação a ácidos graxos no fígado, que promovem a hipolipidemia. A segunda, PPAR $\gamma$ , regula genes envolvidos na adipogênese (acetil-CoA sintetase), diferenciação celular, formação de placas de ateroma, câncer e sensibilização da insulina. Por último, o PPAR $\beta/\delta$  que regula a homeostase energética e o catabolismo de ácidos graxos de cadeia longa (71, 73).

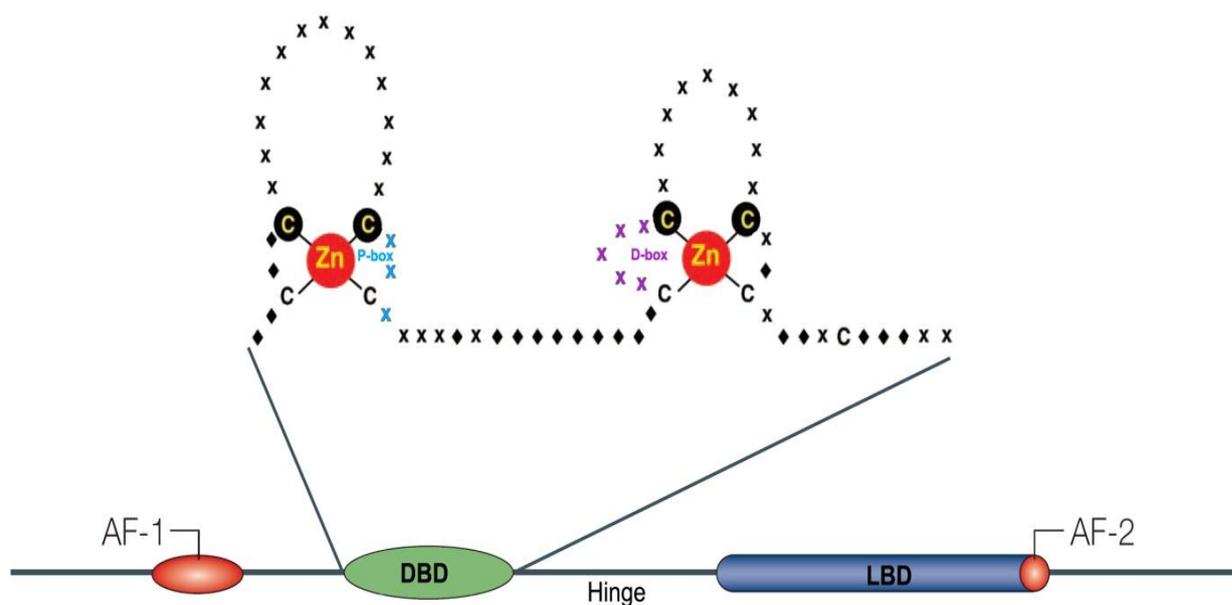
O PPAR possui três domínios principais: o amino terminal, o de ligação ao DNA (DBD) e o de ligação ao ligante (LBD). Uma pequena região de dobradiça (*Hinge*) une o DBD a LBD.

O domínio amino terminal é bastante variável com relação aos aminoácidos e ao seu tamanho entre os receptores nucleares. Essa região tem função transcricional independente da presença de um ligante, chamada de função de ativação 1 (AF-1).

O DBD é a região mais conservada entre todos os receptores nucleares. Este domínio está localizado na região central do receptor e é organizado por dois segmentos estruturais chamados de dedos de zinco. Eles são separados por uma

sequência de 15 a 17 aminoácidos, em que os três primeiros aminoácidos do primeiro dedo (caixa P ou *P-box*) são responsáveis pelo reconhecimento da região do DNA onde cada receptor se ligará. Essa região é chamada de elemento responsivo. No segundo dedo de zinco, há uma sequência de cinco aminoácidos (caixa D ou *D-box*). Esta região é importante para a dimerização do receptor.

O LBD é menos conservado e varia de acordo com o receptor nuclear. Está localizado na região carboxi-terminal do receptor e é responsável pela homodimerização ou heterodimerização do receptor, pela interação com proteínas co-repressoras e co-ativadoras no núcleo, além de conter uma região chamada de função de ativação 2 (AF-2) que, após a ligação do ligante, permite a formação de um complexo protéico envolvido na ativação da transcrição (74-75). A Figura 2 mostra a representação esquemática de um receptor nuclear.



**Figura 2 – Modelo da estrutura do receptor nuclear.**

Modelo estrutural de um receptor nuclear mostrando as diferentes regiões da proteína: domínio de ligação ao DNA (DBD); região responsável pelo reconhecimento do elemento responsivo ao DNA (*P-box*); região responsável pela dimerização do receptor (*D-box*); domínio de ligação ao ligante (LBD); função de ativação 1 (AF-1); região de dobradiça (*Hinge*); função de ativação 2 (AF-2) e região relacionada ao recrutamento de fatores transcricionais após a ligação do ligante ao receptor. Adaptado de King-Jones e colaboradores (76) e Evans (75).

Cada isoforma de PPAR ( $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ ) é codificada por um gene isolado e exibe um padrão de expressão tecido-específico. O PPAR $\alpha$  é expresso em tecidos com

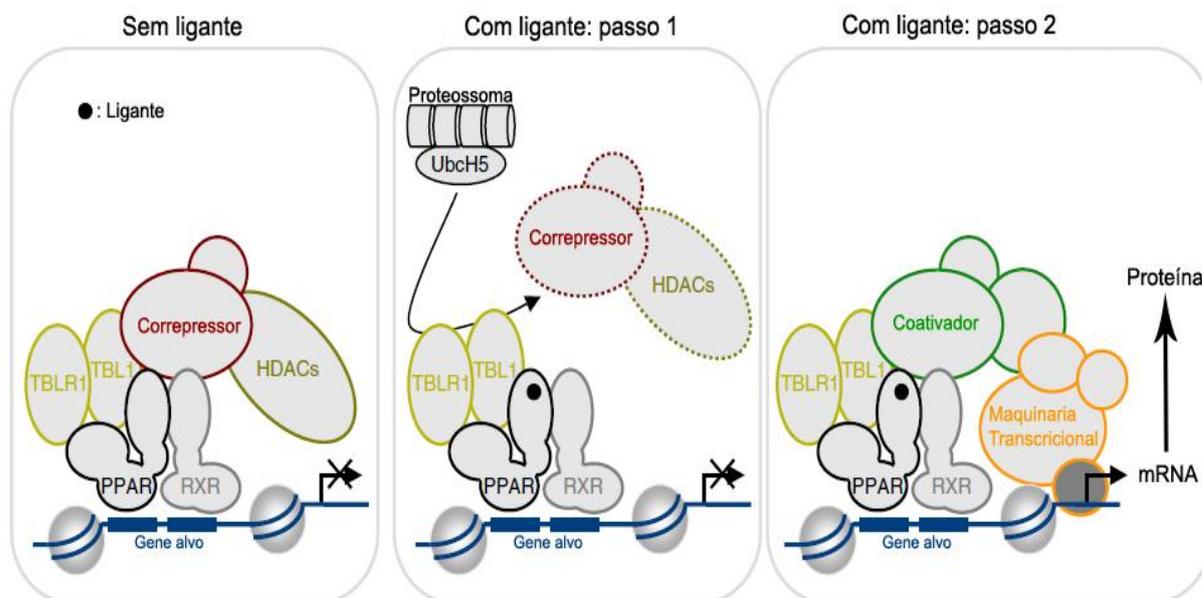
alto catabolismo de ácidos graxos, como o fígado, o coração, tecido adiposo marrom, os rins e o intestino. As duas isoformas de PPAR $\gamma$ ,  $\gamma$ 1 e  $\gamma$ 2, agem nos tecidos adiposos marrom e branco, promovendo diferenciação dos adipócitos e estocagem de lipídeos. A expressão do PPAR $\gamma$ 1 se estende a outros tecidos, como intestino e células do sistema imune. O PPAR $\beta$  é largamente expresso em todos os tecidos, mas parece exercer papel mais importante no músculo esquelético, no tecido adiposo, na pele, no intestino e no cérebro (77). A Figura 3, abaixo, sumariza as principais funções metabólicas reguladas pelos PPARs.

	Fígado	Músculo	Tecido Adiposo
<b>Utilização de lipídeos</b>	PPAR $\alpha$	- Oxidação de ácido graxos	- Oxidação de ácido graxos
	PPAR $\delta$	- Oxidação de ácido graxos	- Oxidação de ácido graxos
<b>Armazenamento de lipídeos/ Sensibilidade à insulina</b>	PPAR $\gamma$	- Lipogênese - Sensibilidade à insulina	- Diferenciação de adipócitos - Lipogênese - Sensibilidade à insulina

**Figura 3 - As principais funções metabólicas reguladas pelos receptores PPAR nos diferentes tecidos.** Adaptado de Feige, 2006 (77).

Os PPARs são fatores ligante-dependentes que regulam a expressão gênica precisando, para isso, formar um heterodímero com o receptor do ácido 9-cís-retinóico (RXR). O heterodímero PPAR/RXR pode ser formado na ausência de ligante, ficando inativo.

Quando o ligante se liga ao heterodímero PPAR/RXR, ocorre a ativação da transcrição de genes específicos do DNA por meio da ligação do heterodímero ao elemento responsivo ao PPAR (PPRE) (71, 77). A Figura 4 traz a representação esquemática do modelo do mecanismo de ação do receptor do PPAR.



**Figura 4 – Mecanismo de ação do PPAR.**

O heterodímero PPAR/RXR, na ausência de ligante, fica no estado inativado e ligado ao corressor (**Sem ligante**). Esse corressor está associado à enzima histona deacetilase (HDAC), que mantém a histona em um estado hipoacetilado, mantendo o DNA compactado. Os fatores nucleares de mudança nos corressores (NCoEx), TBL1 e TBLR1, também estão ligados ao receptor. Na presença do ligante, NCoEx recruta a enzima de conjugação ubiquitina E2 (UbcH5), juntamente com a maquinaria de ubiquitinação, para induzir a ubiquitinação e, subsequentemente, a degradação proteossomal do corressor (**Com ligante: passo 1**). Assim, o NCoEx facilita a saída do corressor, possibilita o recrutamento eficiente e a ativação transcritora (**Com ligante: passo 2**). Adaptado de Feige, 2006 (77).

Os PPARs desempenham uma importante função durante a sinalização celular, em condições fisiológicas ou patológicas, de vários tecidos. Exercem uma função fundamental na regulação do metabolismo de glicose e lipídeos, na inflamação e na regulação do crescimento e diferenciação das células cancerígenas (71, 78-79). Por ser um fator de transcrição induzível, os PPARs têm sido encarados como potentes alvos na procura de tratamento para várias desordens metabólicas, como o diabetes, inflamações, dislipidemias, hipertensão e câncer (71, 80-82).

Plantas usadas popularmente pela ação antidiabética vêm sendo utilizadas por diferentes grupos de pesquisa científica no rastreamento de espécies que atuem no metabolismo energético, com o objetivo de se identificarem novas substâncias que ativem os receptores PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  ou PPAR $\gamma$ .

No Brasil, várias espécies utilizadas na medicina tradicional já foram identificadas e tiveram suas ações hipoglicemiantes comprovadas (83-85), como, por exemplo: a *Tabebuia heptaphylla* (Vell) Toledo, o Ipê, e a *Bauhinia*

*variegata*. Recentemente, foi demonstrado, no Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília, que o extrato hexânico da entrecasca do ipê aumenta a atividade transcricional das três isoformas dos receptores PPARs,  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  e  $\gamma$ , sugerindo uma atividade agonista (86). Em outro estudo o extrato aquoso das folhas de *Bauhinia variegata* foi capaz de ativar o receptor PPAR $\gamma$  (87).

Ligantes de PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  são utilizados terapeuticamente para corrigir dislipidemia e restaurar o equilíbrio glicêmico, respectivamente (88). Como a maioria dos pacientes diabéticos apresenta anormalidades lipídicas, ligantes que ativam ambos os receptores (duplos agonistas), PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , foram alvos de estudo para aplicação no tratamento de *diabetes mellitus* (89). No entanto, até hoje, não foram encontrados duplos agonistas com segurança de uso comprovada. A ativação aumentada desses receptores pode culminar em efeitos adversos severos, como carcinogênese, disfunção renal, retenção de fluidos e problemas cardíacos. Por isso, a afinidade da ligação dos agonista pelos receptores deve ser muito precisa, para promover efeitos biológicos seletivos. O ideal seria que o duplo agonista tivesse afinidades diferentes pelos receptores (90-92).

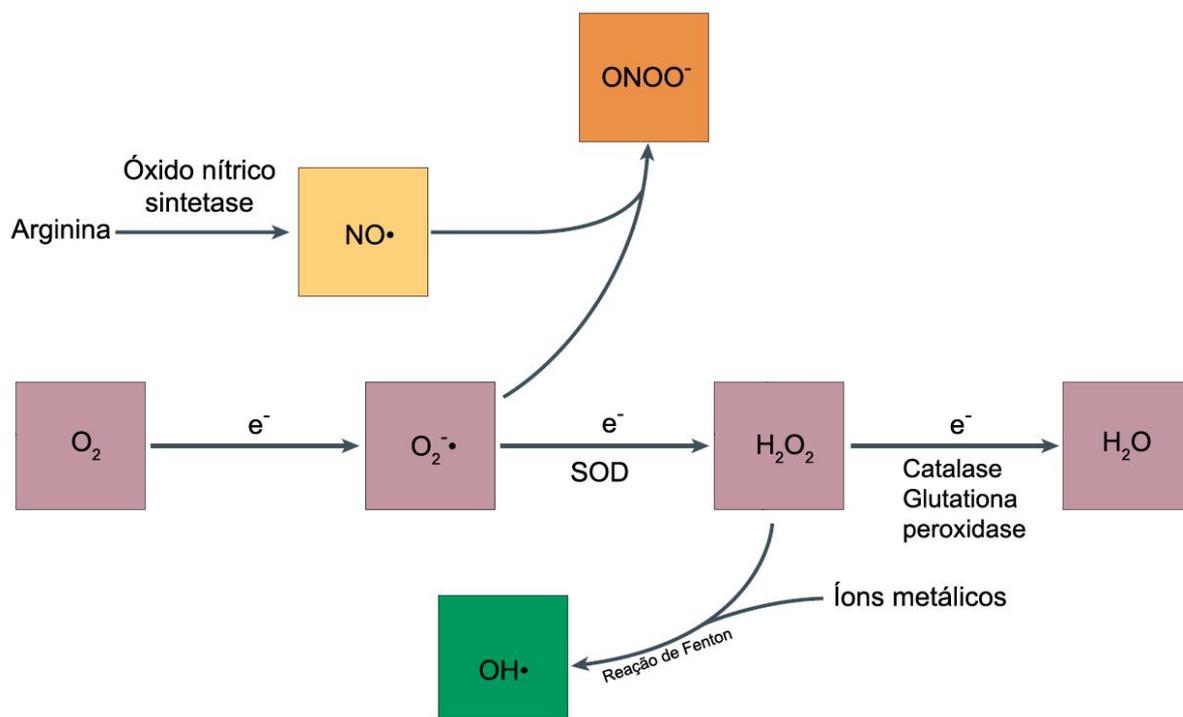
### **1.5 O estresse oxidativo e os antioxidantes.**

Como é sabido, os PPARs mantêm importante relação na regulação dos mecanismos do estresse oxidativo. Eles podem regular, por exemplo, a produção do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) ou de enzimas que fazem parte dos processos oxidativos.

A sinalização extracelular geralmente ocorre por meio de ligação de citocinas, neurotransmissores, hormônios e fatores de crescimento a receptores específicos, que se localizam na superfície das células. Quando isso ocorre, vias de sinalizações intracelulares promovem a ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes específicos, importantes na função celular.

No processo de fosforilação oxidativa, importante para a produção de adenosina trifosfato (ATP) na mitocôndria em organismos aeróbios, o oxigênio molecular é o aceptor final de elétrons, sendo reduzido à água ( $H_2O$ ) pela enzima citocromo-c oxidase. Esse processo é essencial para que ocorra o metabolismo energético.

Durante a transferência de elétrons, o oxigênio molecular pode ser transformado em espécies reativas de oxigênio (EROs). Entre elas estão o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e, o ainda mais reativo, radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), que é formado em presença de íons metálicos, pela reação de Fenton, além de óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (93-96). A Figura 5 mostra um esquema das principais reações envolvendo as EROs.



**Figura 5 – Espécies reativas do oxigênio.**

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) pode receber um elétron e formar o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), o qual também recebe um elétron, com o auxílio da enzima superóxido dismutase (SOD), e forma o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que, por sua vez, recebe mais um elétron, com auxílio das enzimas catalase ou glutaciona peroxidase, e forma água, ou ainda pode, na presença de íons metálicos, produzir radical hidroxila, pela reação de Fenton. O peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) é outra ERO que pode ser formada pela reação do  $O_2^{\cdot-}$  com o  $NO^{\cdot}$ , e é formado como um dos produtos da reação da conversão da citrulina, a partir da arginina, por meio da reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintetase. Adaptado de Andersen, 2004 (97).

EROs são ditas tóxicas por terem potencial em causar danos a lipídeos, proteínas e ao DNA. Para evitá-los, as células possuem enzimas antioxidantes, que a impedem de sofrer o dano, como:

- Superóxido dismutase (SOD): reduz o  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ ;
- Glutaciona peroxidase: reduz  $H_2O_2$  a  $H_2O$ ;

- Catalases: enzimas peroxissomais que catalisam a redução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (93).

Três isoformas da SOD reagem com o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  em diferentes regiões da célula: Cu/Zn-SOD, no citosol, Mn-SOD, na mitocôndria, e SOD, na região extracelular (98).

Outras moléculas antioxidantes não-enzimáticas também sequestram EROs, como ascorbato, tocoferol, flavonóides, carotenóides e glutatona (GSH) (99).

O estresse oxidativo surge do desequilíbrio entre a produção de moléculas altamente reativas e a produção de defesas antioxidantes, e está associado a várias patologias, como doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, inflamação, asma, diabetes e danos ao DNA (94, 97, 100-102).

Mas não são somente os processos endógenos que causam a produção de EROs. Estímulos ambientais também são importantes para a formação de estresse oxidativo. Entre eles estão a radiação ultravioleta, os agentes quimioterápicos e a hipertermia (94).

Apesar da ação tóxica das EROs estar bem documentada, trabalhos também mostram a sua importância na sinalização e regulação celular, como, por exemplo, na proliferação, diferenciação, migração celular e destruição de microrganismos patogênicos (93, 103-104).

## **1.6 O efeito do estresse oxidativo sobre as células $\beta$ .**

Estudos recentes têm mostrado que o estresse oxidativo está associado não só à resistência a insulina no diabetes tipo 2, mas também é evidente em indivíduos obesos, não diabéticos, e naqueles com síndrome metabólica (75, 105). Apesar do mecanismo que causa os danos nas células  $\beta$  no diabetes tipo 2 ainda não estar claro, a função do estresse oxidativo nesses casos tem recebido muita atenção e, de fato, vários trabalhos demonstram o aumento do estresse oxidativo nas células das ilhotas pancreáticas de humanos com diabetes tipo 2 (106-107).

O aumento na produção de EROs pelas células  $\beta$  pode ocorrer por várias vias, incluindo o aumento da concentração excessiva de glicose e de ácido graxos livres (100, 106-108).

O aumento crônico das concentrações de glicose causa aumento do metabolismo da glicose pela fosforilação oxidativa. Esse processo causa disfunção mitocondrial e aumento de EROs, estresse no retículo endoplasmático e aumento do cálcio intracelular. As células  $\beta$  têm defesa limitada contra o excesso de EROs produzido, por causa dos baixos níveis de enzimas protetoras presentes nessas células (109).

O efeito tóxico causado pela elevada concentração de glicose pôde ser prevenida por agentes antioxidantes em linhagens de células  $\beta$  HIT-T15 e em modelo animal de diabetes tipo 2, de acordo com estudo realizado por Tanaka e colaboradores em 1999 (110).

Além disso, supõe-se que o aumento excessivo de EROs pode ser formado durante a exposição prolongada a concentrações supra fisiológicas de glicose nas células  $\beta$  HIT-T15, culminando em baixos níveis de RNA mensageiro (mRNA) de insulina (110). O mecanismo pelo qual isso ocorre é por meio da diminuição de processamento pós-transcricional do PDX-1, fator de transcrição importante para a expressão do gene da insulina, levando a uma diminuição na liberação de insulina pelas células HIT-T15  $\beta$  e deficiência na secreção de insulina induzida pela glicose (111).

As células  $\beta$  têm habilidade de se adaptar e compensar a hiperglicemia. Entretanto, a obesidade, o aumento crônico de glicose e a piora na resistência a insulina levam ao aumento da apoptose das células  $\beta$ , sendo essa a razão para a evolução para o diabetes tipo 1. Normalmente, quando há o diagnóstico do *diabetes mellitus* tipo 1 as células  $\beta$  já sofreram 70% de redução de sua massa (109).

## **1.7 Estresse oxidativo e o PPAR.**

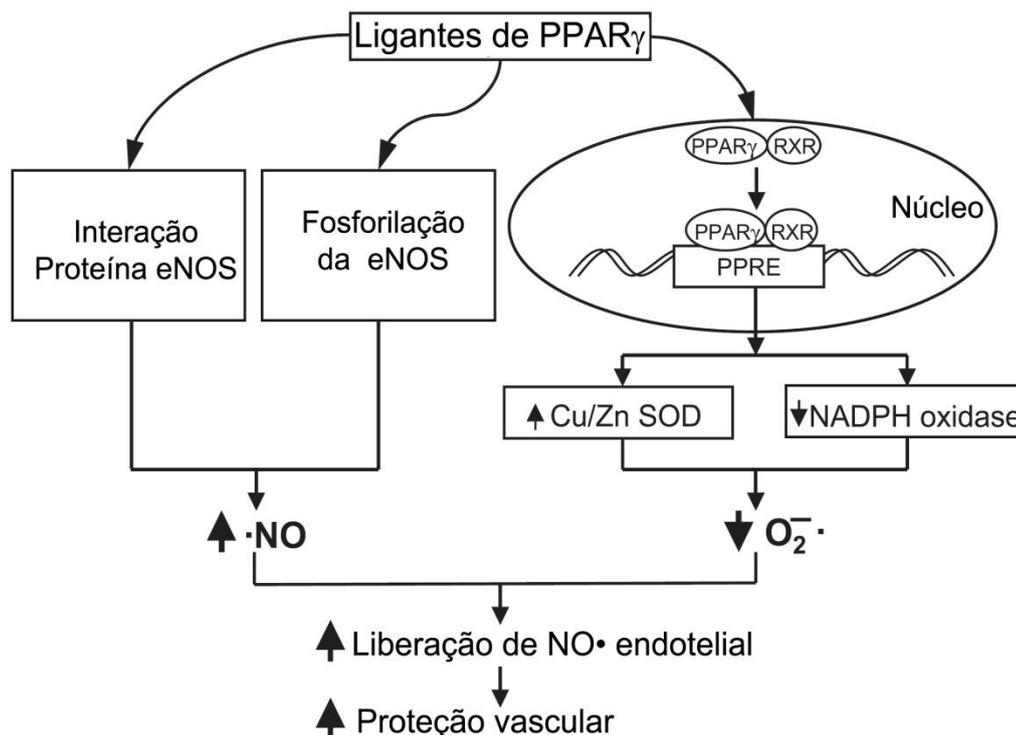
Trabalhos publicados demonstram que os PPARs mantêm uma relação importante na regulação dos mecanismos oxidativos ocorridos no organismo.

Yuan e colaboradores (112) demonstraram, em 2011, que a pioglitazona age sobre as células do músculo liso vascular (VSMCs) impedindo sua proliferação que é induzida por produtos finais da glicosilação avançada (AGEs). A inibição da proliferação das VSMCs ocorre pela indução da parada da fase G0-G1 do crescimento celular.

A proliferação e migração de VSMCs são as etapas-chaves no desenvolvimento de aterosclerose e formação de neointima, depois do dano de artérias. Esse efeito pode ser mediado pela inibição, via regulação induzida por AGEs, da expressão de PPAR $\gamma$ , geração de EROs e ativação da via redox-sensível a quinases reguladas por sinais extracelulares, culminando em complicações vasculares, como aterosclerose e infarto que são causas primárias de mortalidade em diabetes.

Evidências têm mostrado que AGEs são formados *in vivo* em ambientes hiperglicêmicos e durante o envelhecimento. Estão envolvidos na patogênese das doenças vasculares no diabetes e, não só aumentam significativamente a proliferação de VSMCs, mas também reduzem a expressão de PPAR $\gamma$ , chave transcricional moduladora da função das VSMCs (112).

Algumas evidências sugerem que ligantes PPAR $\gamma$  poderiam alterar a geração de O $_2^{\cdot-}$  através da regulação das enzimas nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidase (NADPH oxidase) e superóxido dismutase (SOD). É sugerido um mecanismo de conexão entre alterações induzidas por ligantes de PPAR $\gamma$  no metabolismo de O $_2^{\cdot-}$ , diminuindo o estresse oxidativo promovido pelas EROs, e o aumento da biodisponibilidade de NO $\cdot$ , que tem função protetora da parede vascular, que poderia reduzir as disfunções endoteliais e as doenças vasculares associadas a elas (Figura 6) (98).



**Figura 6 – Mecanismo de liberação de óxido nítrico endotelial (NO•) e estimulação da expressão gênica mediada por ligantes de PPAR $\gamma$ .**

Ligantes de PPAR $\gamma$  são capazes de estimular a interação da enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) com proteínas, promovendo a atividade enzimática e, conseqüentemente, o aumento de NO•. Além disso, promovem a modulação da expressão gênica das enzimas Cu/Zn-SOD e NADPH oxidase, ao se ligarem ao heterodímero PPAR/RXR, diminuindo os níveis de O $_2^{\bullet-}$ . Adaptado de Hwang, 2004 (98).

O nível do fator transcricional nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que é uma proteína presente na inflamação, está aumentado no estresse oxidativo, e este é encontrado no coração, fígado, rins, cérebro e músculo cardíaco. Ligantes de PPAR $\alpha$  foram capazes de restabelecer o balanço redox ao nível normal, diminuindo os níveis de peroxidação lipídica, de citocinas inflamatórias e do NF- $\kappa$ B, associados ao envelhecimento e ao estresse oxidativo, em modelos de camundongos idosos. Em animais em que se induziu uma mutação de PPAR $\alpha$ , este equilíbrio redox não pode ser restabelecido, mostrando que o PPAR $\alpha$  exerce um papel importante no processo oxidativo durante o envelhecimento, ou em doenças que levam ao estresse oxidativo (113).

Produção excessiva de EROs são importantes no processo inflamatório. Buscando estabelecer uma relação entre a produção de EROs e o PPAR $\alpha$  neste processo, Teissier e colaboradores (2004) mostraram que, quando ativado em

macrófagos por seus agonistas sintéticos, o PPAR $\alpha$  induz a produção de EROs através da indução da NADPH oxidase. A NADPH oxidase provoca a modificação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), gerando metabólitos do LDL oxidado, que por sua vez agem como ligante de PPAR $\alpha$  e inibem a produção do mRNA do iNOS, que é um marcador importante no processo inflamatório (114).

Além do estabelecido efeito antioxidante do PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  no sistema vascular, em trabalho publicado em 2006, Pesant e colaboradores mostraram que a ativação do PPAR $\beta/\delta$  tem importante função no impedimento da apoptose em cardiomiócitos de ratos (H9c2), induzida pelo estresse oxidativo mediado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (115).

Os dados publicados sugerem que há uma estreita relação entre EROs e PPARs nos mecanismos regulatórios envolvidos nos processos patológicos do diabetes, aterosclerose e envelhecimento.

## 1.8 Polifenóis e flavonóides.

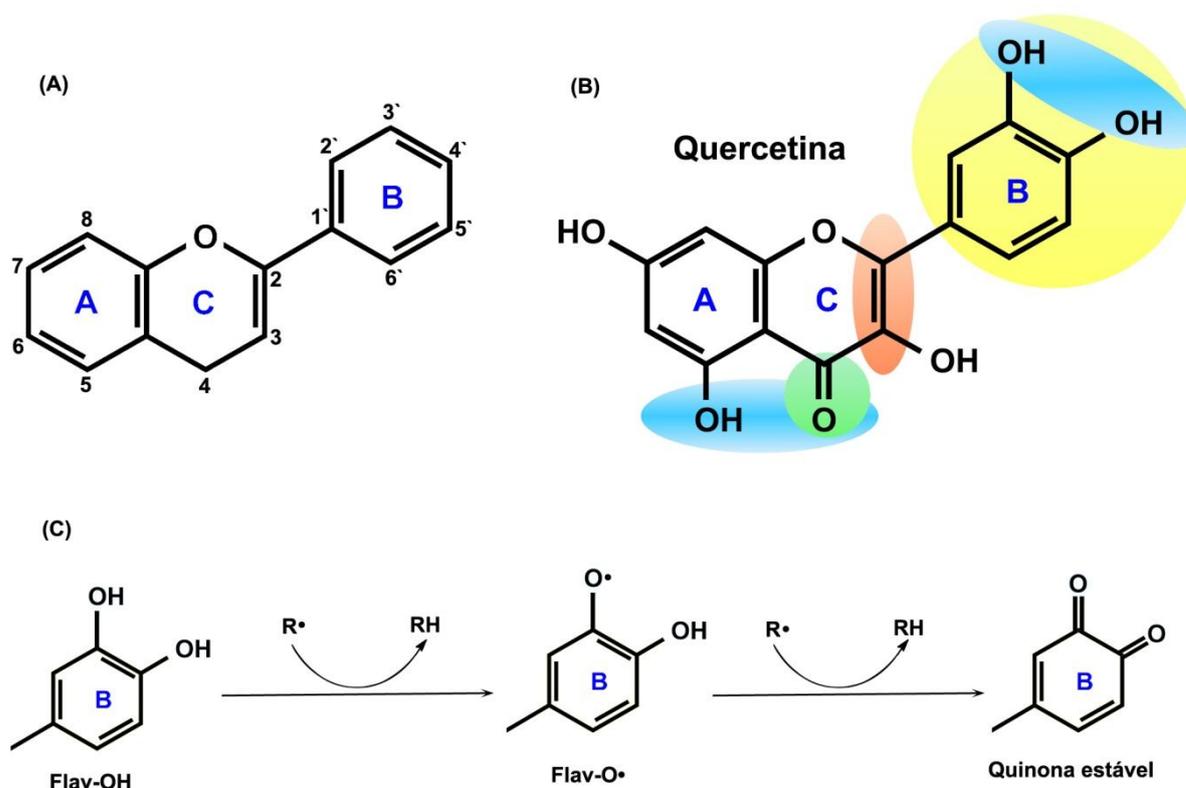
Os polifenóis são metabólitos secundários produzidos em plantas e fungos, sendo que alguns fazem parte da dieta do homem. Eles podem ser moléculas simples, como os ácidos fenólicos, ou complexos com alta polimerização, como no caso dos taninos, e estão divididos em dez classes.

Dentre os polifenóis, os flavonóides se destacam como compostos com atividades fisiológicas e farmacológicas diversificadas, como estrogênica, antitumoral, antimicrobiana, antialérgica, antiinflamatória e, a bem conhecida, atividade antioxidante e queladora de íons metálicos (116-119). Eles são moléculas pequenas com mais de 9.000 variantes conhecidas (120).

Alguns flavonóides têm demonstrado efeito benéfico em relação ao *diabetes mellitus*, agindo em várias vias, como na regulação das vias bioquímicas da glicose, na tolerância à glicose, perfil lipídico, biossíntese do glicogênio, captação de glicose e liberação de insulina (68, 121).

Sua atividade antioxidante está relacionada às características de sua molécula, como representado na Figura 7 (B). Eles têm capacidade de exercer a atividade antioxidante, agindo como anti-radical livre, a radicais hidroxila e ânion radical superóxido, evitando a peroxidação lipídica, e como quelador de metais.

Três grupos estruturais são importantes nesse processo: a estrutura catecol (orto-dihidroxi) no anel B, que possibilita a doação de elétrons aos radicais livres ( $R^\bullet$ ), transformando o flavonóide em um radical aroxila (Flav-O $\bullet$ ), ou quinona instável que, reagindo com um segundo radical livre, forma uma quinona estável [Figura 7 (C)]; a dupla ligação em conjugação com a função 4-oxo, que desloca elétrons do anel B; e a presença dos grupos hidroxila nos carbono 3 e 5 (122-123).



**Figura 7 – (A) Estrutura básica dos flavonóides. (B) Estrutura da molécula de quercetina com destaque para os grupamentos responsáveis pela atividade antioxidante. (C) Mecanismo de redução das EROs pelos flavonóides.**

O grupamento catecol ou anel B dihidroxilado (amarelo) é o maior responsável pela atividade antioxidante. Outros grupamentos importantes incluem a presença da instauração (vermelho) e da função 4-oxo (verde) no anel C. O grupamento catecol (azul) e outras funções orgânicas também podem exibir atividade queladora de metais, como o cobre e ferro. Adaptado de Bravo, 1998 (124), Williams, 2004 (120) e Pietta, 2000 (123).

Os flavonóides podem estar presentes no metabolismo intracelular, basicamente, das seguintes maneiras (120):

- conjugação com tióis, principalmente a glutathiona (GSH), para serem secretadas da célula no processo metabólico, podendo até regular os níveis de GSH na célula;
- metabolismo oxidativo, participando do processo oxidativo intracelular, por onde sua ação pode ser mediada (125);
- relação com o metabolismo do citocromo P450, pois os flavonóides podem induzir a produção de CYPs, podem modular, por estímulo ou inibição, essas enzimas e podem ser metabolizados por elas (126).

Porém, flavonóides também possuem atividade pró-oxidante, dependendo de sua concentração no meio reacional. O efeito pró-oxidante dos flavonóides é, via de regra, diretamente proporcional ao número total de grupos hidroxila presentes, principalmente no anel B, e é responsável pelos efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos, e pela produção de  $\text{OH}\cdot$ , via reação de Fenton, dos flavonóides isolados de várias plantas. A glicolisação e a metilação das hidroxilas podem diminuir esse efeito (127).

Plantas e fungos endofíticos são capazes de produzir flavonóides, estes compostos com atividades biológicas variadas, incluindo a atividade hipoglicêmica via ativação do  $\text{PPAR}\gamma$ . Além disso, foi demonstrado que fungos endofíticos podem produzir os mesmos metabólitos que seus hospedeiros, e vários estudos anteriormente publicados demonstraram que extratos produzidos a partir de plantas do gênero *Bauhinia* tiveram atividade antidiabética, incluindo o extrato aquoso da folha da *Bauhinia variegata*, que foi capaz de ativar o  $\text{PPAR}\gamma$  (87), e mostravam flavonóides compondo seus perfis metabólicos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral.

O objetivo deste trabalho foi isolar, das folhas da *Bauhinia variegata*, fungos endofíticos que pudessem ser utilizados como fonte de compostos antioxidantes e agonistas a receptores nucleares PPAR $\gamma$ .

### 2.2 Objetivos específicos.

Para alcançar o objetivo principal deste trabalho, foram realizadas as seguintes etapas:

- isolamento de fungos endofíticos das folhas de *Bauhinia variegata*;
- preparo do inóculo dos fungos em meio pré-fermentativo;
- produção de massa micelial dos fungos em cultura líquida submersa;
- partição líquido-líquido dos filtrados de cultura dos fungos para obtenção de diferentes extratos de cultura;
- teste de atividade antioxidante dos diferentes extratos obtidos;
- avaliação do teor de polifenóis nos extratos obtidos;
- avaliação do teor de flavonóides nos extratos obtidos;
- avaliação da citotoxicidade dos extratos em células mesangiais;
- avaliação da atividade agonista dos extratos frente ao receptor PPAR $\gamma$ .

### 3. MATERIAL E MÉTODOS.

#### 3.1 Equipamentos.

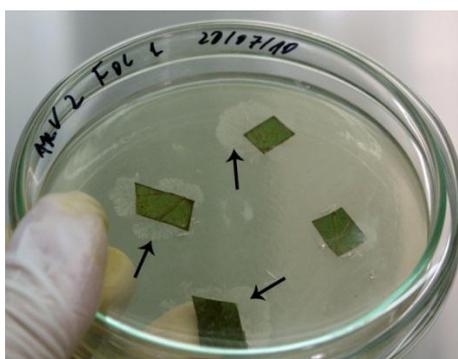
- Eletroporador Bio-Rad, Gene pulser II;
- Banho de água com temperatura controlável - Braun Thermomix 18BU;
- Capela de fluxo laminar Labconco purifie Class II Biosafety Cabinet;
- Capela de fluxo laminar Esco Labculture Class 2 type A2;
- Microscópio Nikon eclipse TS100;
- Microscópio Axiomager A1, Zeiss, acoplado a computador com *software* de processamento de imagem digital AxioVision<sup>®</sup>;
- Incubadora Sanyo COM-14AC;
- Centrífuga Jouan BR41;
- Espectrofotômetro Shimadzu UV-1601;
- Balança analítica AND HR-202;
- pHmetro digital microprocessado Del Lab DLA-PH;
- leitor de placas Beckman DTX 800;
- Ultracentrífuga Beckman J2-21;
- Freezer Nuare -85°C ultralow NU65-18G;
- Evaporador rotativo Heidolph Loaborota 4010;
- Agitador Biomixer QL-901;
- Agitador Braun Biotec;
- Refrigerador Bosch A II refrigerador 39;
- Freezer -20°C Brastemp 280;
- Geladeira Eletrolux Air flow DC 48.

#### 3.2 Métodos.

##### 3.2.1 Isolamento dos fungos endofíticos.

As folhas de *Bauhinia variegata* Linn. foram coletadas no Campus Universitário Darcy Ribeiro/Universidade de Brasília - DF, no período da manhã, no mês de julho de 2010. As folhas foram lavadas em água corrente e detergente líquido, com cuidado para que o tecido não fosse rompido e, em seguida, cada folha

foi imersa em etanol 70°GL por 60 segundos. A seguir, as folhas foram imersas, em sequência, por 60, 90 e 180 segundos em três recipientes distintos contendo hipoclorito de sódio (teor de cloro ativo a 2%), foram novamente mergulhadas em etanol 70°GL por 60 segundos e lavadas por imersão com agitação por 3 segundos em três recipientes distintos com água destilada previamente esterilizada. Depois, o excesso de água foi retirado das folhas com ajuda de papel de filtro esterilizado. Uma amostra da última água de lavagem das folhas foi utilizada para o controle negativo de crescimento microbiano. Fragmentos das folhas, cortadas com auxílio de uma tesoura esterilizada, foram depositados em uma placa de Petri contendo 20 mL de meio ágar Sabouraud dextrose (Figura 8). As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 3 a 5 dias. Repiques das colônias isoladas foram retirados e inoculados em meio sólido de ágar batata dextrose que foram novamente incubados a 30°C por 7 dias.



**Figura 8 - Crescimento inicial dos fungos endofíticos.**

As setas indicam o crescimento inicial de alguns fungos nas primeiras 24 horas de crescimento.

### **3.2.2 Manutenção das cepas.**

Os fungos isolados foram mantidos através de repiques periódicos em meio sólido inclinado (*slants*) de ágar Sabouraud dextrose, que foram incubados a 30°C por 7 dias. Após este período, a cultura foi mantida a 4°C.

### **3.2.3 Avaliação das características microscópicas dos fungos isolados - coloração com azul de algodão.**

Para uma observação das características microscópicas dos fungos isolados, os mesmos foram observados em microscópio óptico, após coloração com azul de algodão. Para isso, com o auxílio de um alça de platina, uma amostra foi retirada da

cultura isolada, disposta sobre a lâmina e a amostra foi espalhada de forma que os filamentos não se agrupassem. Uma gota de azul de algodão foi adicionada e a lâmina foi fixada sobre o fogo, com cuidado para que não ocorresse a ebulição do corante. Uma lamínula foi disposta sobre a lâmina e lacrada com esmalte. As lâminas foram observadas em microscópio Axiolmager A1, Zeiss, acoplado a computador com *software* de processamento de imagem digital AxioVision®.

#### **3.2.4 Fermentação em cultura líquida submersa.**

O fungo estoque foi repicado em cinco tubos de ensaios com meio ágar Sabouraud dextrose (*slants*). Após sete dias de incubação a 30°C, os micélios e conídios produzidos foram recolhidos por adição de 9 mL de água esterilizada à cultura e raspagem da mesma com auxílio de uma espátula. A suspensão de micélios e conídios foi recolhida e adicionada a 50 mL de meio pré-fermentativo, que foi mantido a 30°C, sob agitação constante a 150 rpm, por 48 horas. Após este período, todo o conteúdo foi inoculado em um segundo frasco contendo 1000 mL de meio fermentativo e mantido nas mesmas condições de temperatura e agitação por um período de 72 horas. Os meios utilizados foram descritos por Jackson e colaboradores em 1993 (128).

#### **3.2.5 Preparo dos extratos das culturas.**

Os micélios das culturas fermentativas foram separados dos fluidos de cultura por filtração a vácuo. Os fluidos de cultura foram submetidos à partição líquido-líquido com acetato de etila. A fração orgânica (acetato de etila) foi recuperada e concentrada com o auxílio de um evaporador rotativo (evaporação sob vácuo). Após a secagem total dos extratos, os mesmos foram pesados, dissolvidos em 1 mL de metanol e utilizados para avaliação das atividades antioxidante, quantificação de polifenóis, flavonóides, avaliação de citotoxicidade e atividade agonista dos receptores nucleares.

#### **3.2.6 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*.**

A atividade antioxidante dos extratos de cultura foi determinada de acordo com método descrito por Blois em 1958 (129). O branco da reação (controle negativo) foi obtido pelo preparo do meio reacional, substituindo o volume de amostra por metanol (130-131). A atividade sequestradora do radical, considerando

a absorvância do controle negativo como 100%, foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$Aa = \left[ \frac{ABS_{controle} - ABS_{amostra}}{ABS_{controle}} \right] \cdot 100$$

Onde:

Aa: atividade antioxidante (%).

ABS<sub>controle</sub>: absorvância do controle negativo a 517 nm.

ABS<sub>amostra</sub>: absorvância da amostra a 517 nm.

A porcentagem da atividade sequestradora foi analisada em gráfico do tipo dose-resposta, como função das diferentes concentrações dos extratos utilizados no ensaio, e a atividade antioxidante expressa por valor de IC<sub>50</sub>.

### **3.2.7 Quantificação de polifenóis totais.**

A quantificação de polifenóis totais foi realizada utilizando o método Folin-Ciocalteu, como método descrito por Georgetti e colaboradores (131). Para isso, 76,8 µg dos extratos foram adicionados a 250 µL de uma solução aquosa de carbonato de sódio a 10% e a 250 µL de uma solução aquosa de Folin-Ciocalteu 1 N. O volume final de reação foi completado para 2,5 mL com água destilada e a mistura reacional foi agitada, com auxílio de um agitador de tubos do tipo vortex. Após 60 minutos, as amostras tiveram suas absorvâncias medidas em espectrofotômetro a 760 nm. O ácido gálico foi usado como padrão e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico por massa ou volume de extrato (EAG/mL ou EAG/mg).

### **3.2.8 Quantificação de flavonóides totais.**

A quantificação de flavonóides totais foi determinada utilizando o método do cloreto de alumínio, como descrito por Georgetti e colaboradores (131). A quercetina foi utilizada como padrão para a obtenção da curva de calibração. Os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina por massa ou volume de extrato (EQ/mL ou EQ/mg). Nesse método, 125 µL de solução de cloreto de alumínio em 5% de metanol foram adicionados a 20 µL de extrato de cultura diluído em metanol.

O volume final foi completado para 2,5 mL com metanol e após 30 minutos as amostras tiveram suas absorvâncias medidas em espectrofotômetro a 425 nm.

### **3.2.9 Cultura de células.**

Para os ensaios de gene repórter foram utilizadas células mesangiais humanas doadas pela Disciplina de Nefrologia da Escola Paulista de Medicina, UNIFESP. As células foram cultivadas de acordo com método descrito por Chiellini e colaboradores (132).

Essas células foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), contendo 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 50 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina, e mantidas em placas Corning® de 148 cm<sup>2</sup> em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.2.10 Avaliação *in vitro* da citotoxicidade dos extratos em células mesangiais.**

A viabilidade celular e a citotoxicidade dos extratos foi determinada segundo o método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). O anel de tetrazólio presente no sal brometo de MTT, de coloração amarelada, é clivado por desidrogenases presentes na mitocôndria das células viáveis, formando cristais de formazana, de coloração azulada (133). Portanto, é considerado que a quantidade de células viáveis é proporcional à quantidade de cristais de formazana formada. No ensaio, as placas foram semeadas com 30.500 células mesangiais humanas por poço em meio de cultura DMEM, exceto no poço utilizado como branco de reação, que continha somente o meio de cultura. O volume reacional final foi de 100 µL. Após incubação de 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, foram adicionados 10 µL de MTT [5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato (PBS)] em todos os poços das placas, e as mesmas foram incubadas por 4 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para a dissolução do sal de formazana, o meio de cultura foi retirado dos poços e 100 µL de solução reveladora de MTT (HCl 0,04 M em isopropanol) foram adicionados. As placas foram deixadas sob agitação por 15 minutos à temperatura ambiente e a absorvância foi medida a 570 nm com auxílio de um leitor de placas Beckman Coulter DTX 800. A interpretação dos resultados foi feita por comparação entre os valores da absorvância obtidos nos poços tratados com os extratos e os obtidos nos controles.

### **3.2.11 Atividade agonista ao receptor PPAR $\gamma$ – ensaio de gene repórter.**

#### **3.2.11.1 Reagentes.**

Os reagentes utilizados para o cultivo das células mesangiais, como o meio de cultura DMEM e soro fetal bovino (SFB), foram obtidos comercialmente da GIBCO®. Penicilina, estreptomicina e rosiglitazona foram obtidos da Sigma-Aldrich®. A rosiglitazona foi ressuspensa em metanol:dimetil sulfoxido 3:2 (MEOH:DMSO 3:2).

A solução de rosiglitazona  $10^{-7}$  M em MEOH:DMSO (3:2) foi preparada e mantida estocada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Soluções dos extratos foram preparadas por diluição em metanol para obtenção de diferentes faixas de concentrações, cujo limite máximo foi dependente dos resultados obtidos no teste de citotoxicidade.

#### **3.2.11.2 Plasmídeos.**

O plasmídeo contendo um receptor quimérico formado pelo LBD do PPAR $\gamma$  fusionado ao DBD do fator de transcrição de levedura GAL4 (LBD-PPAR-gama/DBD-GAL4) e o plasmídeo contendo o gene repórter da luciferase dirigido pelo promotor mínimo do adenovírus E1b e por uma sequência com cinco sítios de ligação do GAL4 (UAS<sub>5x</sub>-Luc). Os plasmídeos utilizados continham a sequência do gene de resistência à ampicilina. O pCMV-Luc, com região promotora do citomegalovírus, foi utilizado como controle da transfecção realizada para o ensaio de gene repórter. A transcrição do RNA codificada pelo DNA complementar (cDNA) foi controlada pelo promotor do citomegalovírus fazendo com que a expressão do RNA ocorresse (134).

#### **3.2.11.3 Transformação.**

Para o processo de transformação, utilizado para introduzir um plasmídeo em uma célula procariótica, foi utilizada a cepa de bactéria *E. coli* DH5 $\alpha$  para replicação dos plasmídeos. Em um tubo de microcentrífuga, 100 a 1000 ng do plasmídeo a ser transformado foram incubados com 50  $\mu\text{L}$  de *E. coli* DH5 $\alpha$  durante 30 minutos em banho de gelo. Após esse período, as células foram submetidas a um choque térmico por 2 minutos em um banho de água a  $42^{\circ}\text{C}$ . Esse procedimento provocou a abertura dos poros da parede celular da bactéria e permitiu a entrada do plasmídeo na célula. Em seguida, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de meio de cultura LB (5 g de

extrato de levedura, 10 g de triptona e 10 g de NaCl em 1 L de água destilada) sem antibiótico e o meio foi incubado por 1 hora a 37°C, sob agitação constante, para que ocorresse a expressão da  $\beta$ -lactamase e, conseqüentemente, para o desenvolvimento da resistência ao antibiótico. Posteriormente, 50  $\mu$ L da suspensão de *E.coli* transformada foram semeados em uma placa de Petri contendo meio de cultura LB com 1,5% de ágar e 0,1 mg/mL de ampicilina, para seleção das células transformadas. A placa foi incubada por aproximadamente 16 horas a 37°C, sob agitação constante.

#### **3.2.11.4 Purificação de plasmídeos.**

Após a transformação das bactérias, uma colônia resistente foi selecionada e cultivada em 5 mL de meio LB, contendo 5  $\mu$ L de ampicilina (100 mg/mL) por 4 a 6 horas a 37°C, sob agitação. Em seguida, essas bactérias foram inoculadas em 400 mL do mesmo meio de cultura e incubadas por 16 horas a 37°C, sob agitação.

Ao término do período de crescimento, as bactérias foram separadas por centrifugação a 5059  $xg$  por 20 min, a 4°C, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi utilizado para a extração dos plasmídeos, que foram, posteriormente, purificados por cromatografia de troca iônica, de acordo com o protocolo descrito pelo *Quiagen Plasmid Maxi Kit*<sup>®</sup>.

#### **3.2.11.5 Método de transfecção e ensaio de gene repórter.**

O ensaio de gene repórter por meio de transfecção transiente foi o método utilizado na pesquisa e identificação de ligantes para receptores nucleares. Esse ensaio consistiu na inserção, por eletroporação, de plasmídeos de expressão e repórter no interior do núcleo das células de interesse (transfecção), seguido do tratamento das células com um ligante conhecido (padrão - rosiglitazona) ou com os extratos em estudo. Na presença de substâncias agonistas, o gene repórter (luciferase) teve sua transcrição aumentada e funcionou como indicador da atividade transcricional do receptor.

Para o ensaio de transfecção, as células foram coletadas por centrifugação, a 760,1  $xg$  por 5 minutos, e ressuspendidas em solução PBS contendo 0,1% de dextrose e 0,1% de cloreto de cálcio, para obtenção de uma suspensão contendo  $3 \times 10^7$  células/mL. A cada 500  $\mu$ L desta solução de células ressuspendidas foram adicionados 1,5  $\mu$ g do vetor de expressão PPAR $\gamma$ -GAL4 e 3  $\mu$ g do vetor do plasmídeo repórter GAL-luc. As células foram transferidas para cubetas e

submetidas à eletroporação a 350 mV e 700  $\mu$ F, usando um gerador de pulso modelo Gene Pulser II, da Bio-Rad<sup>®</sup>. Após a eletroporação, as células foram transferidas para o meio de cultura, distribuídas em placas Corning<sup>®</sup> de 12 poços (1 mL por poço) e tratadas com veículo (MEOH:DMSO, 3:2),  $10^{-7}$  M de rosiglitazona (controle) ou diferentes concentrações dos extratos.

Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, as células foram separadas por centrifugação a 760,1 xg e lisadas com tampão de lise 1X (Promega<sup>®</sup>). Para a determinação da atividade da luciferase, foram adicionados 20  $\mu$ L de luciferina (Kit Promega Corp<sup>®</sup>) à 20  $\mu$ L de lisado celular. A emissão de luz gerada pela reação enzimática entre a luciferina e a luciferase foi quantificada em luminômetro, e o resultado foi expresso em unidades relativas de luz. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **3.2.11.6 Cálculo da taxa de ativação.**

Para avaliar a taxa de ativação nos experimentos de transfecção e ensaio de gene repórter, os valores obtidos nas leituras do ensaio de atividade da luciferase para os experimentos realizados com os extratos foram comparados aos valores obtidos, no mesmo ensaio, para os experimentos realizados com a rosiglitazona, usada como controle positivo. Para calcular a taxa de ativação de cada ensaio foi assumido que a taxa de ativação dos experimentos tratados com o veículo (MEOH:DMSO, 3:2) eram de 1 unidade e a taxa de ativação das amostras e do controle positivo foram calculadas pela razão dos resultados obtidos nesses ensaios com relação ao resultado obtido para o veículo.

#### **3.2.12 Análise estatística.**

Todos os resultados apresentados representam a média dos experimentos  $\pm$  desvio padrão de, pelo menos, três ensaios distintos. Todas as análises estatísticas, assim como os gráficos apresentados, e os valores do IC<sub>50</sub> foram obtidos com auxílio do programa GraphPad Prism<sup>®</sup> 5.0. Quando pertinente, a análise de variância foi calculada pelo teste *one-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Isolamento dos fungos endofíticos das folhas de *Bauhinia variegata*.

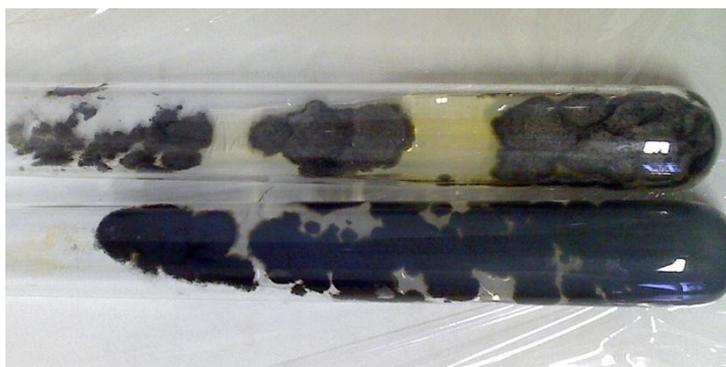
Folhas de *Bauhinia variegata* (Figura 9) foram utilizadas para o isolamento dos fungos endofíticos.



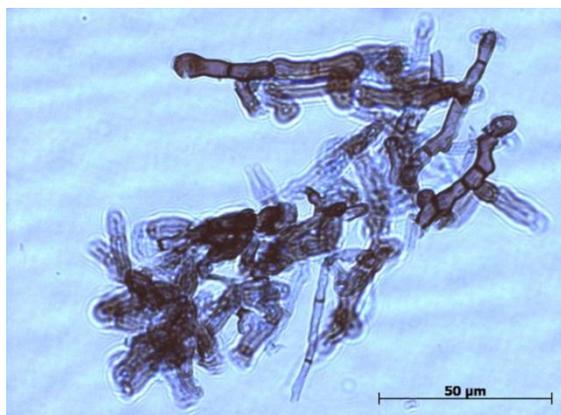
**Figura 9 - Folha de *Bauhinia variegata*.**

Após observação macroscópica para a separação das espécies de fungos endofíticos isolados das folhas de *B. variegata*, amostras das diferentes culturas de nove fungos foram submetidas à técnica de coloração com azul de algodão e observadas microscopicamente. As fotomicrografias dos nove fungos estudados podem ser observadas nas Figuras 10 a 18.

O Fungo I apresenta coloração verde escura (10.a) e na fotomicrografia apresenta hifas hialinas e marrons septadas e sem a presença de esporos (10.b e c).



a)



b)

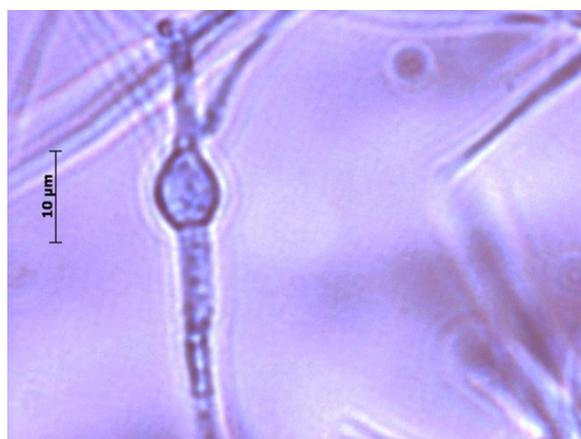
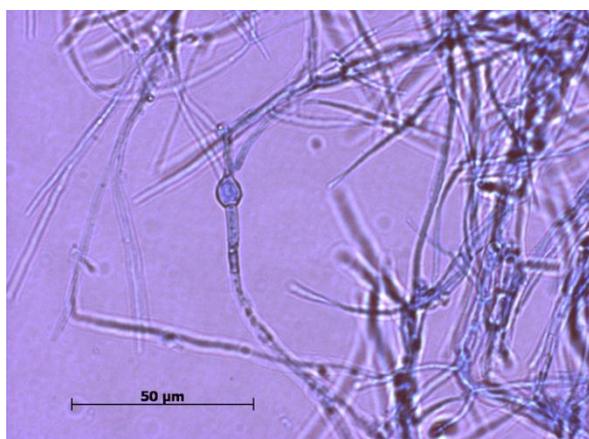


c)

**Figura 10 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo I isolado da folha da *Bauhinia variegata*.**

Amostras das colônias dos fungos isolados crescidos em meio Sabouraud dextrose (a) e coradas com azul de algodão e observadas ao microscópio óptico com aumento de 400x (b) e com aumento de 1000x (c).

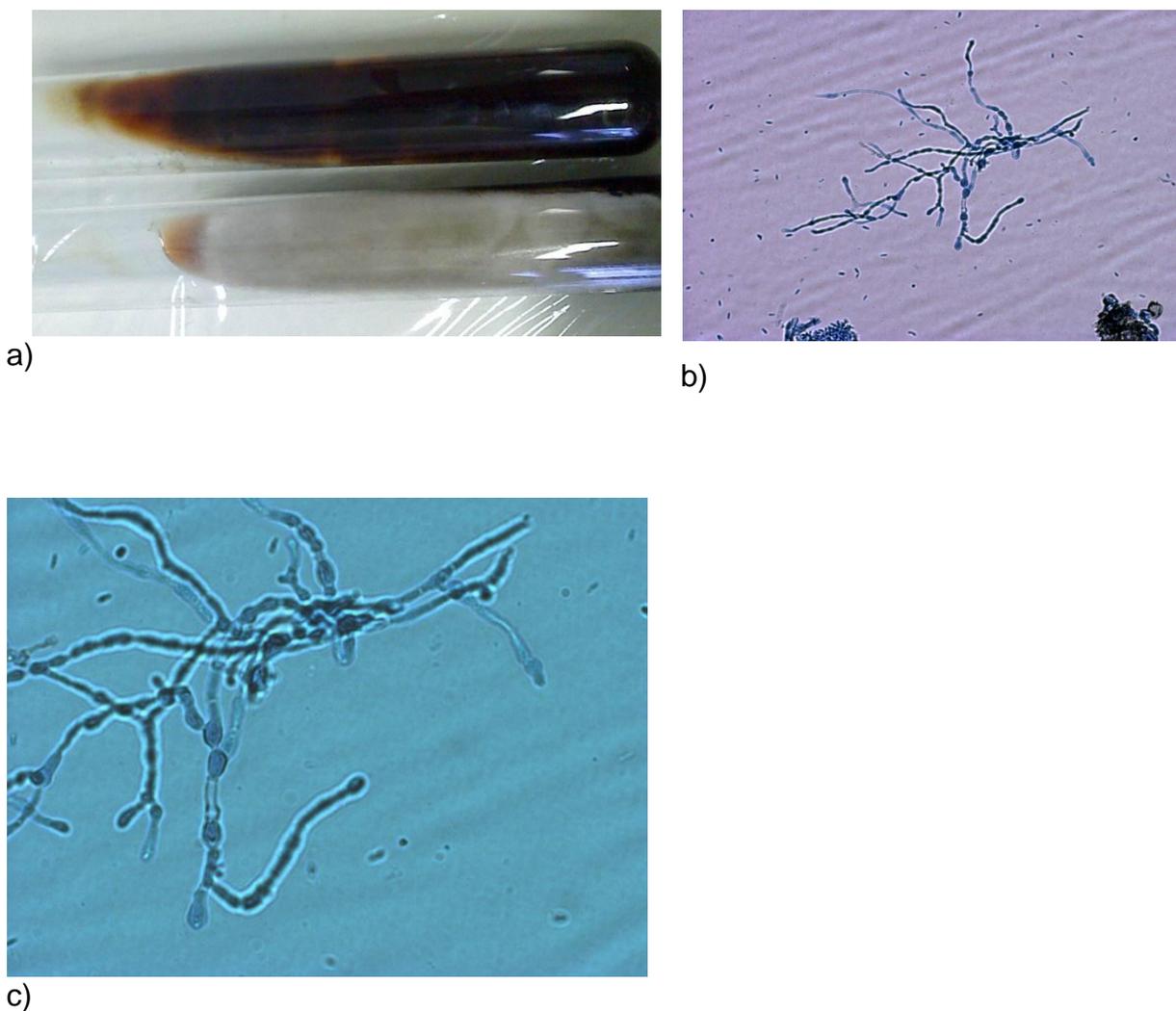
O fungo II apresenta coloração marrom clara (11.a) e na fotomicrografia apresenta hifas hialinas (11.b) com a presença de clamidósporo (11.c).



**Figura 11 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo II isolado da folha da *Bauhinia variegata*.**

Amostras das colônias dos fungos isolados crescidas em meio Sabouraud dextrose (a) e coradas com azul de algodão e observadas ao microscópio óptico com aumento de 400x (b) e com aumento de 1000x (c).

O Fungo III apresenta coloração cinza com característica macroscópicas de um fungo coelomiceto, sugerindo que o mesmo possa pertencente ao gênero *Phoma* sp. (12.a). Na micrografia, apresenta conídios asseptados com hifas hialinas que se tonam mais escuras (12.b) e clamidósporo (12.c).



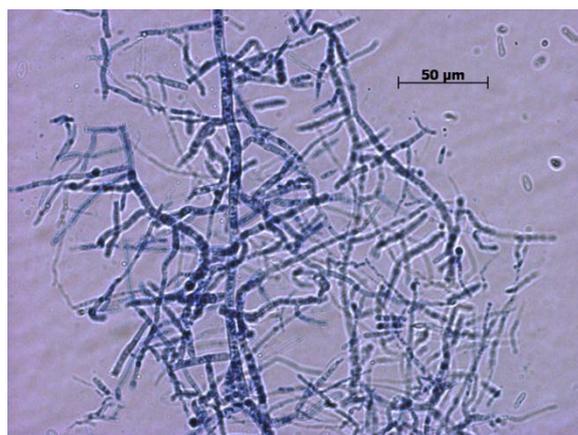
**Figura 12 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo III isolado da folha de *Bauhinia variegata*.**

Amostras das colônias dos fungos isolados crescidos em meio Sabouraud dextrose (a) e coradas com azul de algodão e observadas ao microscópio óptico com aumento de 200x (b) e com aumento de 400x (c).

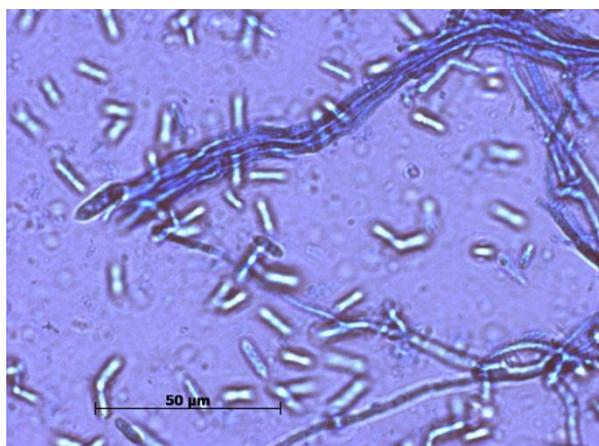
O fungo **IV** tem coloração predominantemente laranja, formando regiões negras em forma de círculo à medida que se desenvolve (13.a). Na fotomicrografia apresenta hifa hialina grossa septada (13.b) e esporos cenocíticos (13.c).



a)



b)



c)

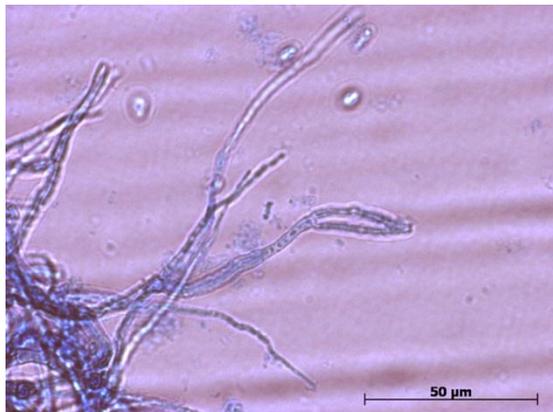
**Figura 13 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo IV isolado da folha de *Bauhinia variegata*.**

Amstras das colônias dos fungos isolados crescidos em meio Sabouraud dextrose (a) e coradas com azul de algodão e observadas ao microscópio óptico com aumento de 200x (b) e com aumento de 400x (c).

O fungo **V** tem coloração branca com regiões em marrom (14.a). Na fotomicrografia podem ser observados três diferentes tipos de esporos: grandes com septo, pequenos asseptados e de tamanho intermediário com forma arredondada (14.c). É possível também verificar hifas hialinas septadas (14.b).



a)



b)

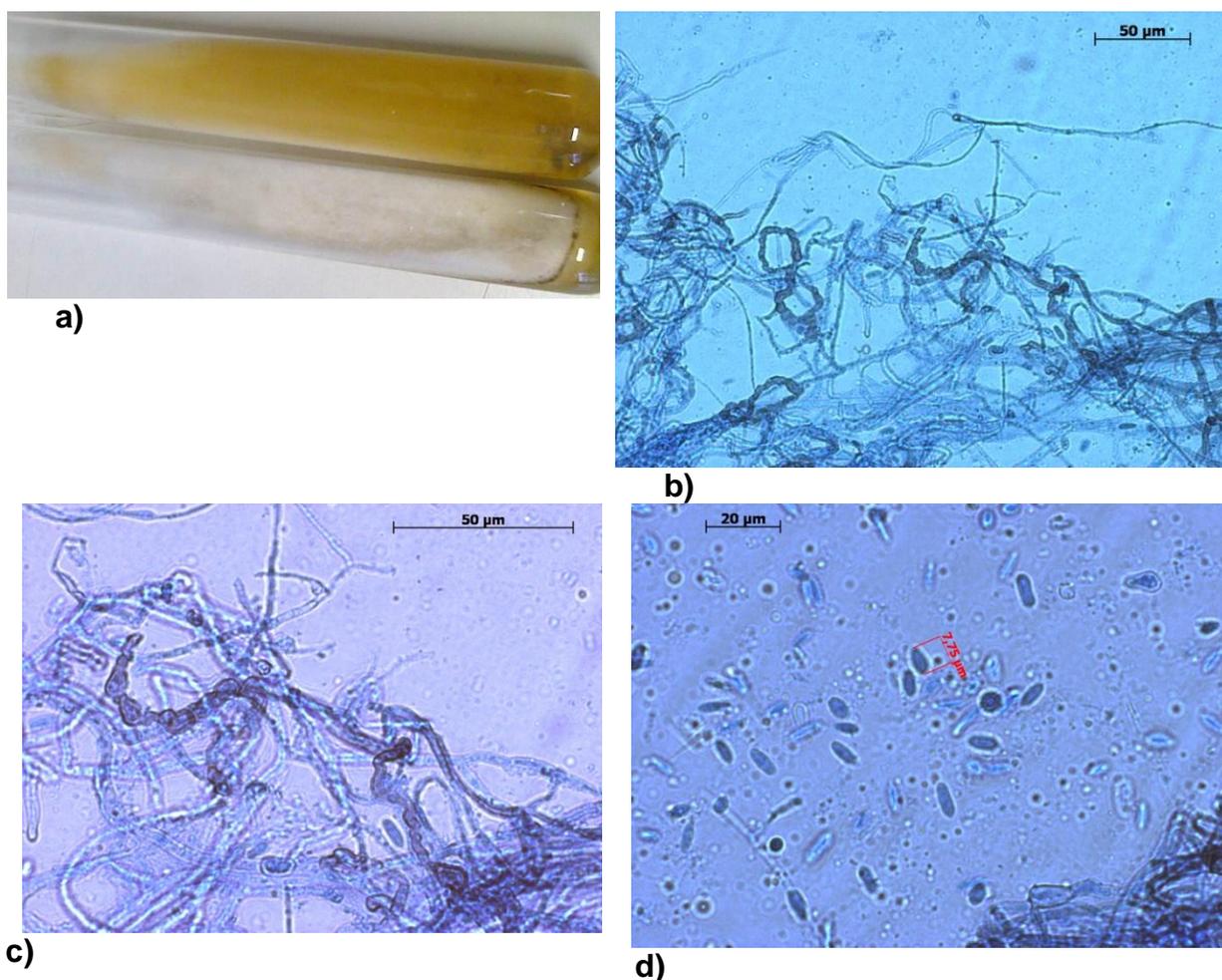


c)

**Figura 14 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo **V** isolado da folha de *Bauhinia variegata*.**

Amostras das colônias dos fungos isolados crescidos em meio Sabouraud dextrose (a) e coradas com azul de algodão e observadas ao microscópio óptico com aumento de 400x (b) e com aumento de 1000x (c).

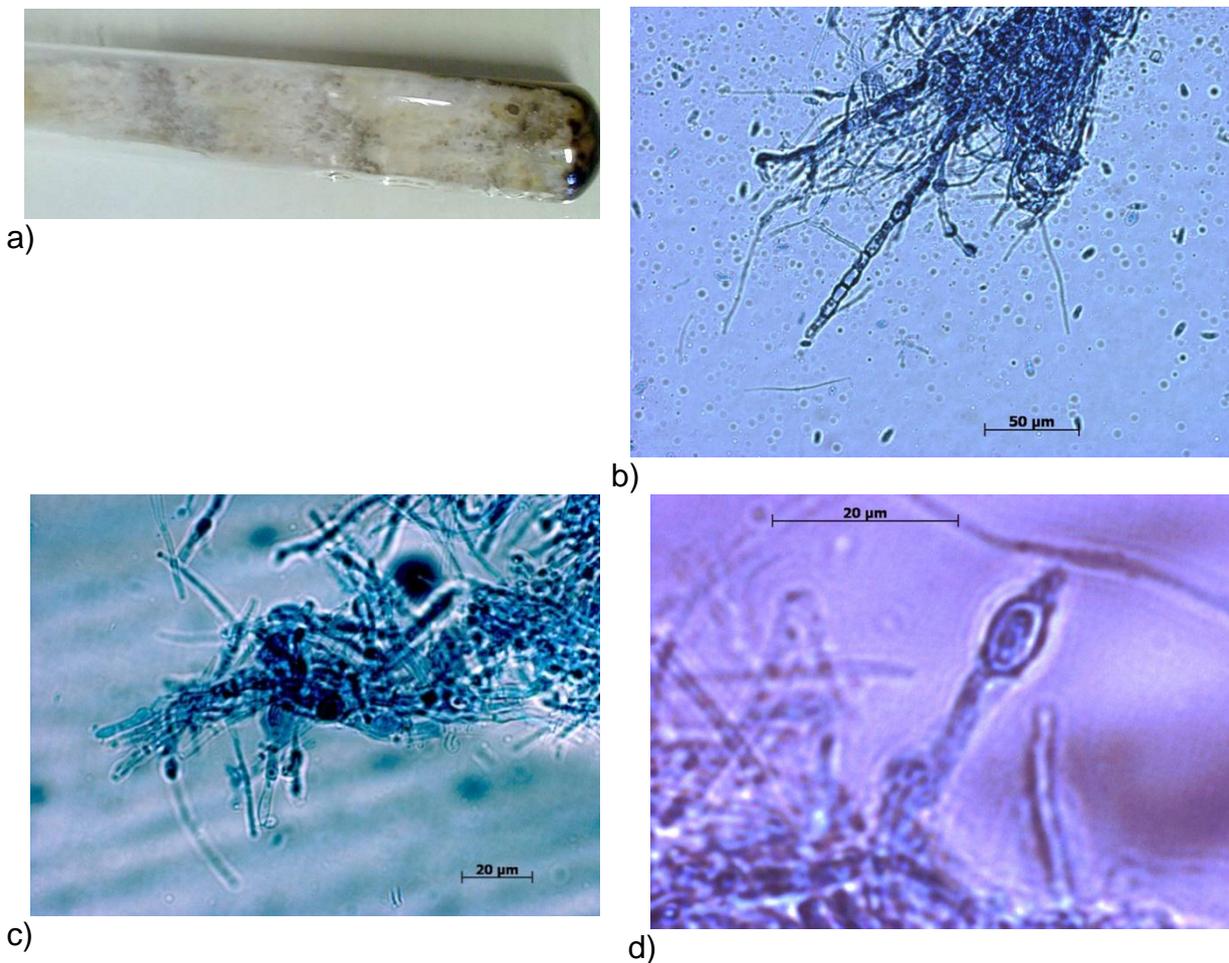
O fungo **VI** apresenta coloração branca com aspecto parecido ao de algodão (15.a). Na fotomicrografia, apresenta hifas hialinas finas e hifas septadas espessas com coloração marrom claro (15.b e c). Dois tipos de esporos puderam ser observados em aumento de 400 vezes, um com cicatriz (marca no esporo que se forma quando o esporo se solta do conidióforo) e arredondado e outro maior em formato cilíndrico (15.d).



**Figura 15 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo VI isolado da folha de *Bauhinia variegata*.**

Amostras das colônias dos fungos isolados crescidos em meio Sabouraud dextrose (a) e coradas com azul de algodão e observadas ao microscópio óptico com aumento de 200x (b), com aumento de 400x (c) e com aumento de 400x indicando o tamanho do esporo (d).

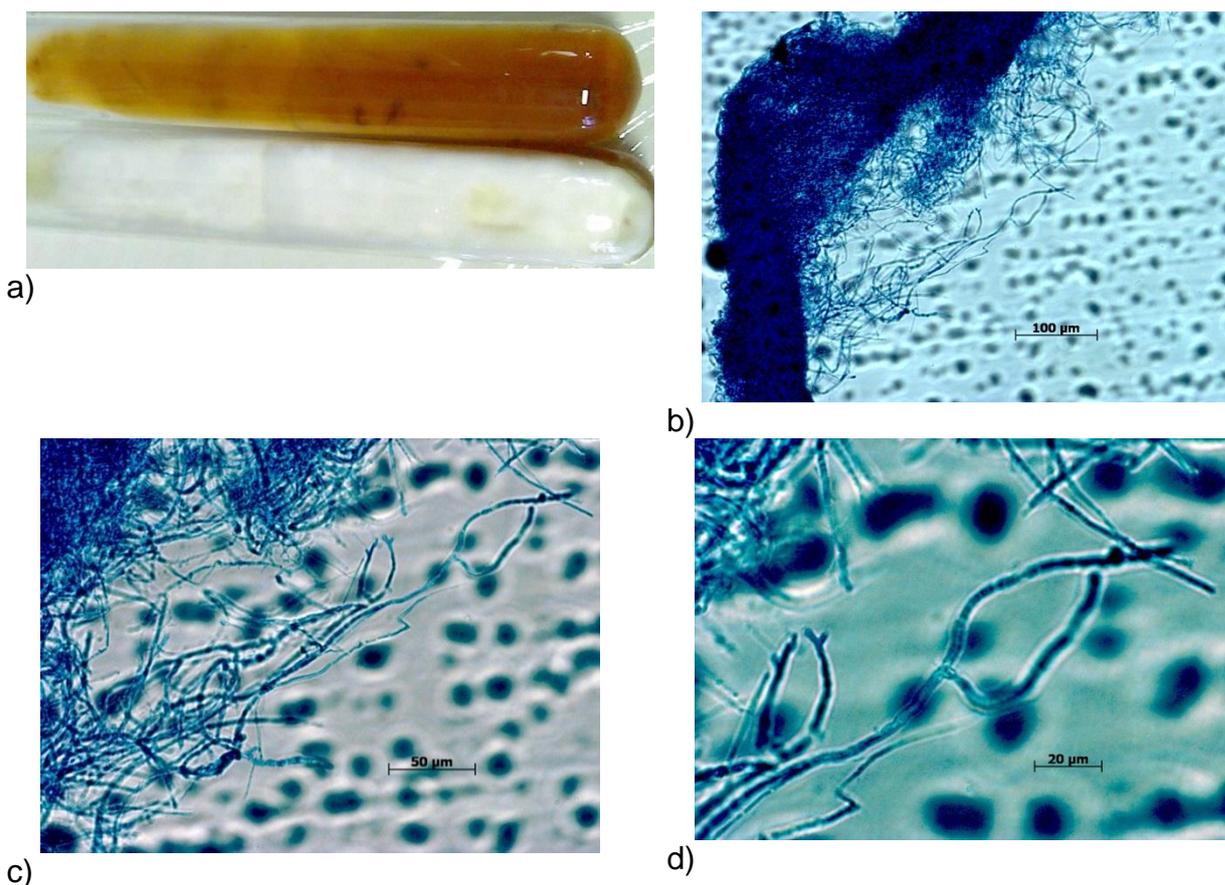
O fungo **VII** apresenta coloração marrom bem claro com regiões escuras (16.a). Apresenta hifas, de espessuras largas, hialinas e marrom claro septadas (16.b e c), com presença de esporos (16.c) além de um clamidósporo (16.d).



**Figura 16 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo VII isolado da folha de *Bauhinia variegata*.**

Amostras das colônias dos fungos isolados crescidos em meio Sabouraud dextrose (a) e coradas com azul de algodão e observadas ao microscópio óptico com aumento de 200x (b), com aumento de 400x (c) e com aumento de 1000x (d).

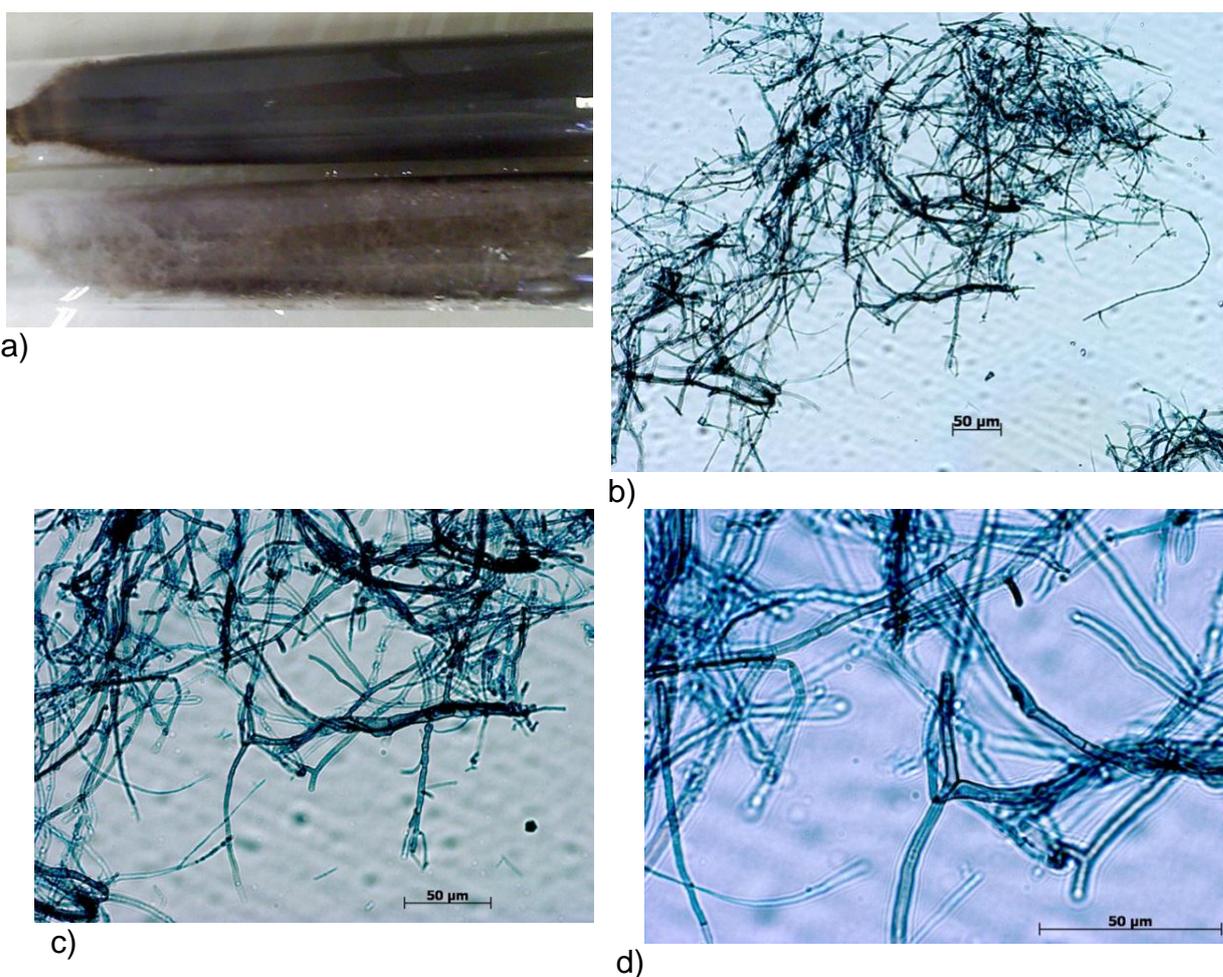
O fungo **VIII**, assim como o fungo **VI**, tem aspecto parecido com o de algodão, mas tem consistência mais macia ao ser tocado com alça de cultura para o repique. Sua coloração é mais esbranquiçada (17.a). No processo de produção de sua lâmina, suas hifas se aglomeram mais que a dos outros fungos (17.b). Apresenta hifas hialinas e septadas com ausência de esporos (17.d).



**Figura 17 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo VIII isolado da folha de *Bauhinia variegata*.**

Amostras das colônias dos fungos isolados crescidos em meio Sabouraud dextrose (a) e coradas com azul de algodão e observadas ao microscópio óptico com aumento de 200x (b), com aumento de 400x (c) e com aumento de 1000x (d).

O fungo **IX** apresenta hifas jovens de coloração clara que passam a coloração mais escura (marrom) com o envelhecimento da cultura (18.a). Na observação microscópica apresenta algumas hifas de espessura larga e de coloração bem escura (demateacea) (18.b e c). Possui também hifas hialinas e de espessura fina (18.d).



**Figura 18 – Aspecto macroscópico da colônia em meio Sabouraud dextrose e fotomicrografias do fungo IX isolado da folha de *Bauhinia variegata*.**

Amostras das colônias dos fungos isolados crescidos em meio Sabouraud dextrose (a) e coradas com azul de algodão e observadas ao microscópio óptico com aumento de 100x (b), com aumento de 200x (c) e com aumento de 400x (d).

#### 4.2 Fermentação em cultura líquida submersa e obtenção dos extratos das culturas.

Os fungos endofíticos isolados das folhas de *Bauhinia variegata* foram submetidos a um processo fermentativo. Os micélios produzidos foram filtrados e seus pesos úmidos determinados (Tabela 2). Os fluidos das culturas foram submetidos à partição líquido-líquido com acetato de etila e os extratos, após evaporação do solvente extrator, foram pesados. O rendimento com relação ao volume de meio extraído e massa micelial produzida estão apresentados na Tabela 2.

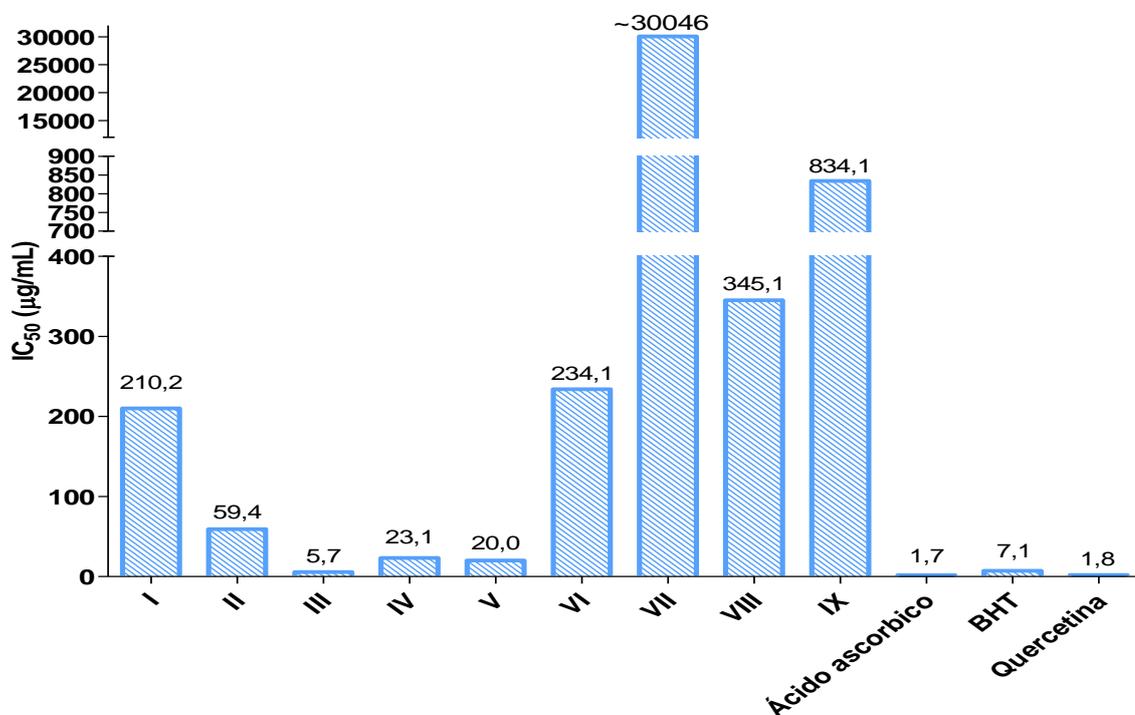
**Tabela 2 - Rendimento dos extratos dos fluidos de cultura.**

Fungo	Massa micelial (peso úmido) (g)	Extrato de acetato de etila - extraído do fluido de cultura (mg)	Rendimento do extrato com relação ao volume de meio fermentativo extraído (% p/v)	Rendimento do extrato com relação à massa micelial úmida produzida (% p/p)
I	62,19	82,0	0,008	0,066
II	6,32	70,4	0,007	0,557
III	30,88	49,2	0,005	0,080
IV	22,54	62,6	0,006	0,139
V	28,81	58,6	0,006	0,102
VI	26,86	215,0	0,021	0,400
VII	7,11	166,0	0,017	1,167
VIII	37,00	179,0	0,018	0,242
IX	8,97	243,6	0,024	1,358

### 4.3 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*.

Os extratos de cultura obtidos pela extração com acetato de etila foram submetidos à avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH·, em comparação com padrões de atividade antioxidante conhecida, ácido ascórbico, butilhidroxitolueno (BHT) e quercetina. Os resultados foram analisados em gráfico do tipo dose-resposta e o IC<sub>50</sub> calculado para cada extrato e padrão utilizados.

Para facilitar a visualização dos resultados obtidos no ensaio de avaliação de atividade antioxidante, os valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os extratos e controles foram expressos em gráfico, como mostrado na Figura 19.



**Figura 19 - Valores de IC<sub>50</sub> obtidos para os extratos e padrões avaliados no ensaio de atividade antioxidante.**

A atividade antioxidante dos extratos metanólicos foi determinada pelo ensaio com radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH·), usando 250 mM de DPPH· e 50 µL das soluções de extrato nas concentrações de 0,036 a 150,6 µg de extrato seco/mL. O controle negativo foi obtido pelo preparo do meio reacional sem adição de amostras e os padrões usados foram o ácido ascórbico, hidroxibutil tolueno (BHT) e quercetina. Os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos por plotagem dos resultados em gráfico do tipo dose-resposta.

Entre os nove extratos testados (fungos I a IX), um deles (III) mostrou grande capacidade no sequestro de radical DPPH· (IC<sub>50</sub> 5,68 µg/mL). Sua atividade foi mais baixa que a do ácido ascórbico (IC<sub>50</sub> 1,7 µg/mL) e maior que a do BHT (IC<sub>50</sub> 7,16

$\mu\text{g/mL}$ ). Entre os outros extratos, o II ( $\text{IC}_{50}$  59,38  $\mu\text{g/mL}$ ), o IV ( $\text{IC}_{50}$  23,16  $\mu\text{g/mL}$ ) e o V ( $\text{IC}_{50}$  20,03  $\mu\text{g/mL}$ ) também se destacaram pela alta atividade antioxidante. Os extratos I ( $\text{IC}_{50}$  210,1  $\mu\text{g/mL}$ ), VI ( $\text{IC}_{50}$  234,1  $\mu\text{g/mL}$ ) e VIII ( $\text{IC}_{50}$  345,1  $\mu\text{g/mL}$ ) mostraram atividade moderada e os extratos IX ( $\text{IC}_{50}$  834,1  $\mu\text{g/mL}$ ) e VII ( $\text{IC}_{50}$  ~30046  $\mu\text{g/mL}$ ), mostraram as atividades antioxidantes mais baixas entre os extratos analisados.

#### 4.4 Quantificação de polifenóis e flavonóides totais.

Os extratos obtidos pela extração dos fluidos de cultura com o acetato de etila foram submetidos à quantificação de polifenóis e flavonóides de acordo com os métodos de Folin-Ciocalteu e cloreto de alumínio, respectivamente (131). Como padrões para a construção das curvas de calibração dos referidos métodos foram utilizados o ácido gálico e a quercetina. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 20, 21 e 22 e nas Tabelas 3 e 4.

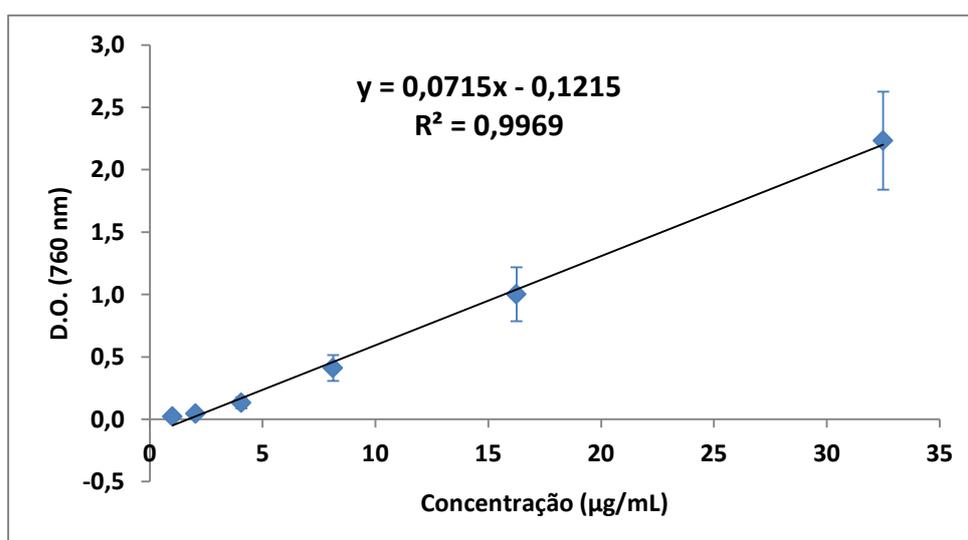


Figura 20 – Curva de calibração do ácido gálico.

Tabela 3 - Quantificação de polifenóis totais nos extratos de cultura.

Fungo	Massa micelial úmida (g)	Extrato do fluido de cultura (mg)	Polifenóis totais (EAG, µg/mg)	Rendimento com relação à massa de extrato (%)	Rendimento com relação à massa micelial (%)
I	62,19	82	117,3	11,73	0,0155
II	6,32	70,4	81,8	8,18	0,0911
III	30,87	49,2	192,7	19,27	0,0307
IV	22,54	62,6	109,1	10,91	0,0303
V	28,81	58,6	106,2	10,62	0,0216
VI	26,86	215	72,5	7,25	0,0580
VII	7,11	166	56,6	5,66	0,1321
VIII	37	179	111,8	11,18	0,0541
IX	8,96	243,6	64,3	6,43	0,1748

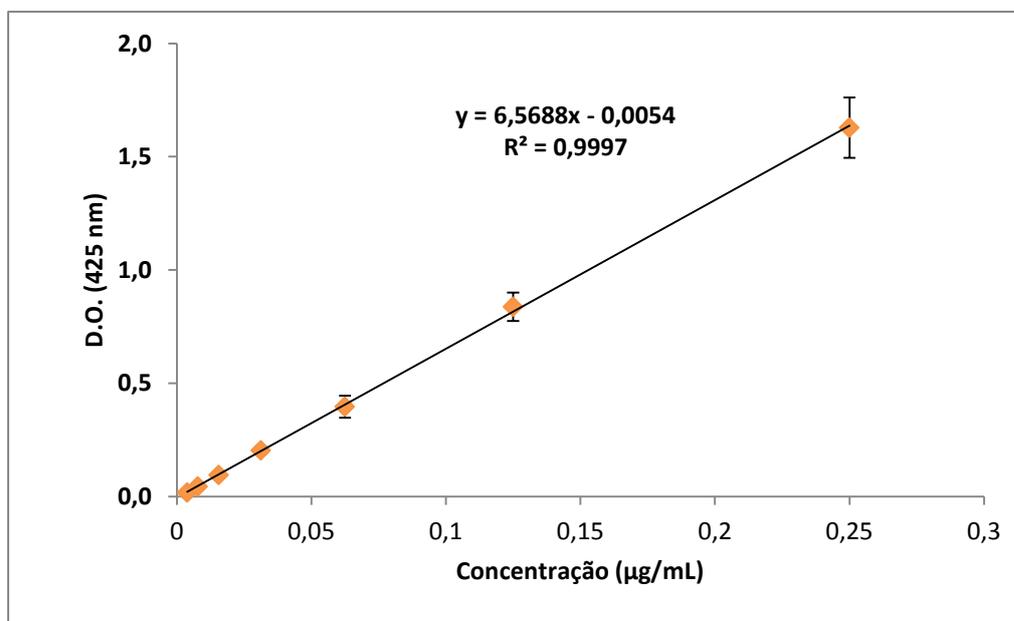


Figura 21 – Curva de calibração da quercetina.

Tabela 4 - Quantificação de flavonóides totais nos extratos de cultura.

Fungo	Massa micelial umida (g)	Extrato do fluido de cultura (mg)	Flavonóides totais (EQ, $\mu\text{g}/\text{mg}$ )	Rendimento com relação à massa de extrato (%)	Rendimento com relação à massa micelial (%)
I	62,19	82	4,6	0,46	0,0006
II	6,32	70,4	4,0	0,4	0,0045
III	30,87	49,2	6,7	0,67	0,0011
IV	22,54	62,6	5,9	0,59	0,0016
V	28,81	58,6	5,7	0,57	0,0012
VI	26,86	215	2,3	0,23	0,0018
VII	7,11	166	1,5	0,15	0,0035
VIII	37	179	1,6	0,16	0,0008
IX	8,96	243,6	1,93	0,193	0,0052

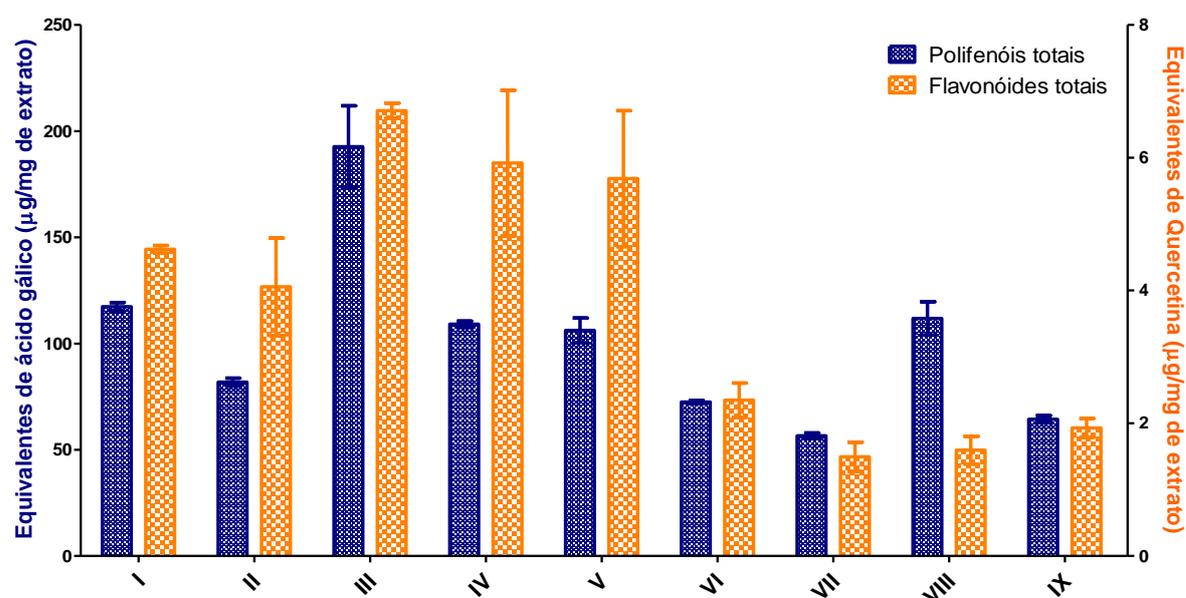
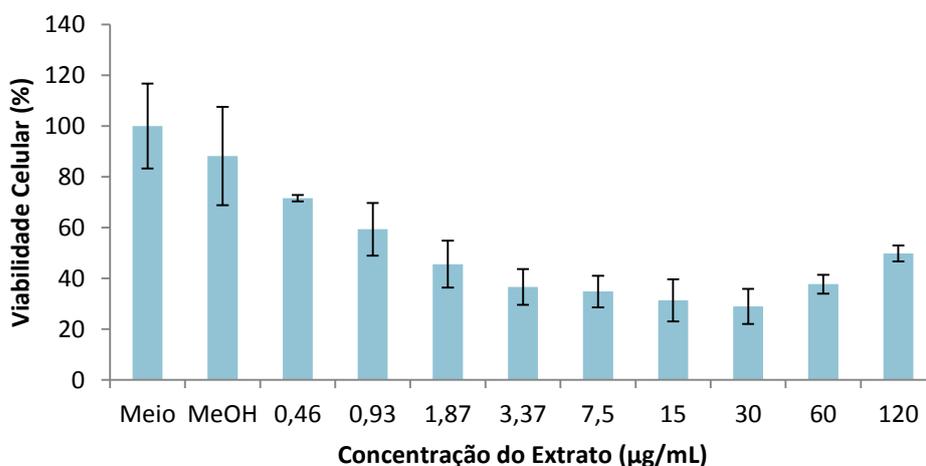


Figura 22 - Comparação entre o teor de polifenóis e de flavonóides dos extratos dos fluidos de cultura dos fungos endofíticos de *Bauhinia variegata*.

O nove extratos apresentaram alto teor de polifenóis (de 56,6 a 192,7  $\mu\text{g}$  EAG/ $\text{mg}$  de extrato) e flavonóides (de 1,5 a 6,7  $\mu\text{g}$  EQ/ $\text{mg}$  de extrato).

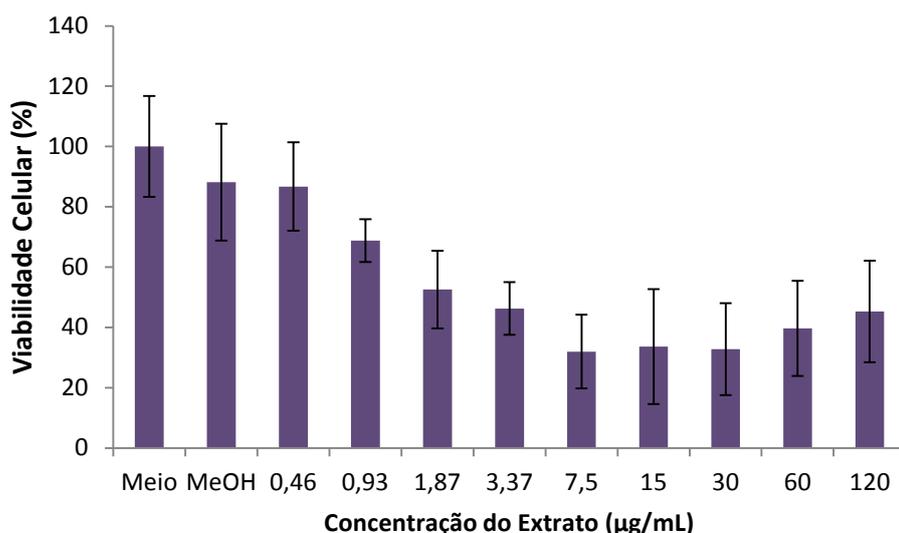
#### 4.5 Avaliação da citotoxicidade dos extratos – ensaio do MTT.

Para avaliar se os extratos de cultura exerciam alguma atividade citotóxica nas células mesangiais humanas, e encontrar as concentrações máximas destes extratos que poderiam ser aplicados no ensaio de gene repórter sem causar danos a este tipo de células usado na transfecção dos plasmídeos do PPAR $\gamma$ , as células mesangiais foram tratadas com concentrações crescentes dos extratos, ou com o solvente usado na diluição dos mesmos, e a viabilidade celular foi determinada pela aplicação do ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). Os resultados deste ensaio podem ser vistos nas Figuras 23 a 31. As concentrações dos extratos que causaram uma inibição na atividade metabólica das células fazendo com que as mesmas exibissem uma viabilidade celular abaixo de 70% foram desconsideradas para o ensaio de gene repórter.



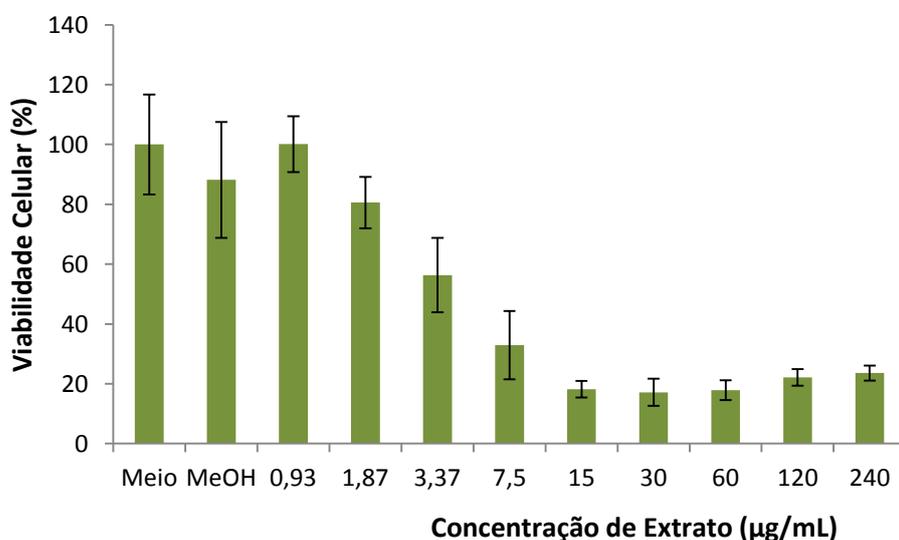
#### Figura 23 – Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo I.

Células mesangiais humanas foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (MeOH) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo I. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo ou extratos, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%.



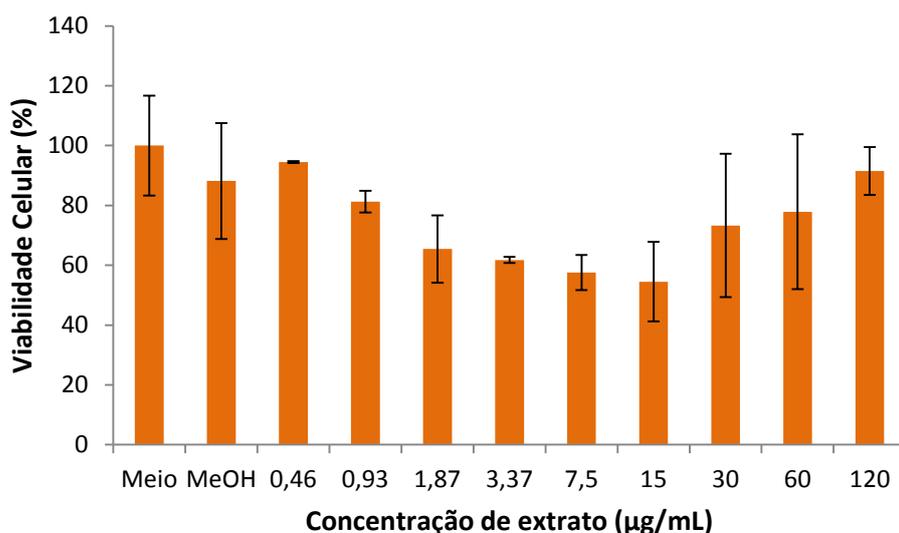
**Figura 24 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo II.**

Células mesangiais humanas foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (MeOH) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo II. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo ou extratos, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%.



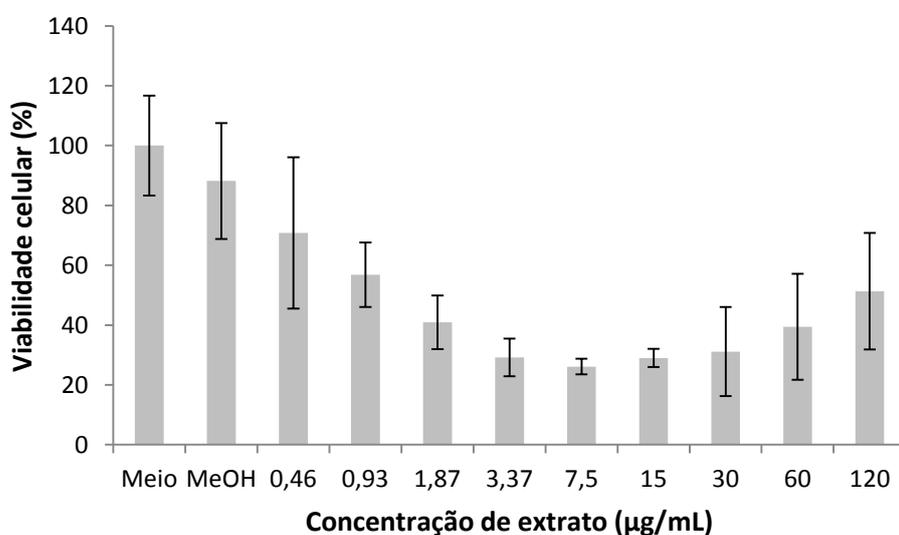
**Figura 25 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo III.**

Células mesangiais humanas foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (MeOH) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo III. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo ou extratos, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%.



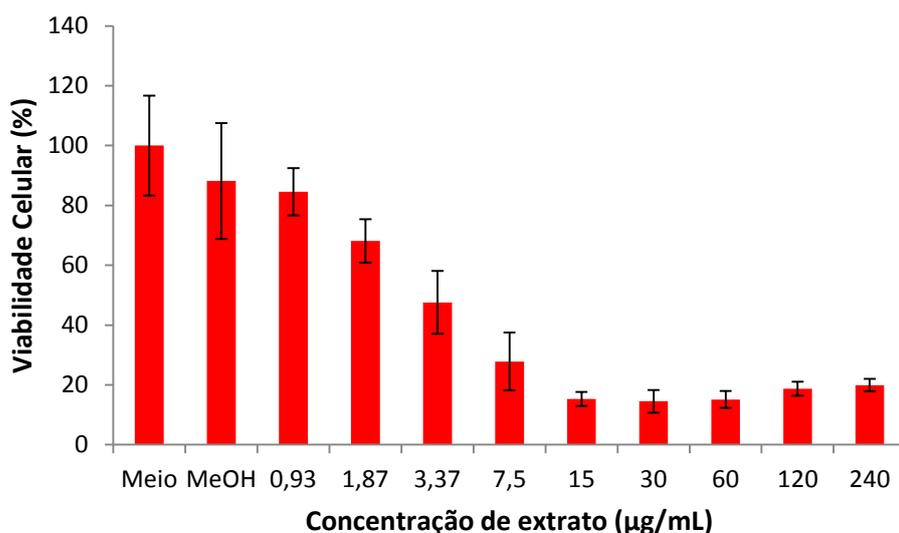
**Figura 26 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo IV.**

Células mesangiais humanas foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (MeOH) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo IV. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo ou extratos, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%.



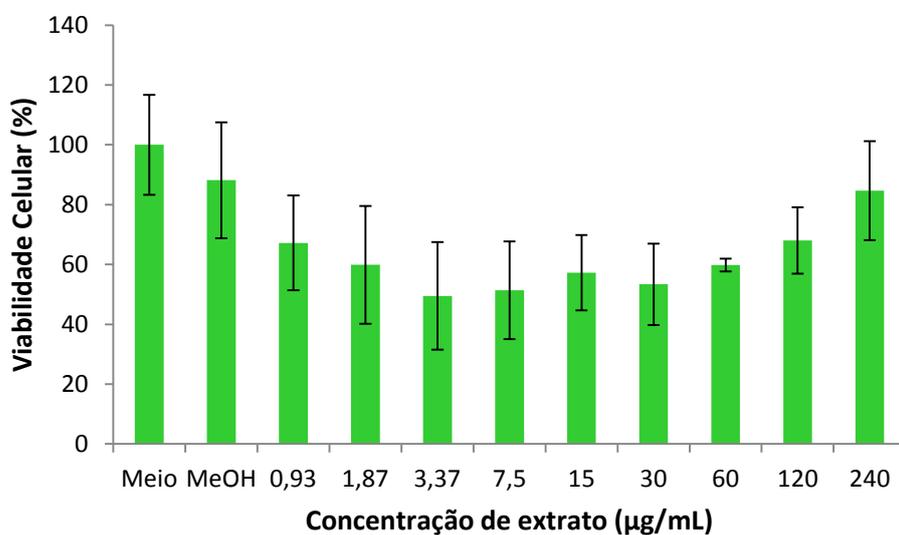
**Figura 27 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo V.**

Células mesangiais humanas foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (MeOH) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo V. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo ou extratos, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%.



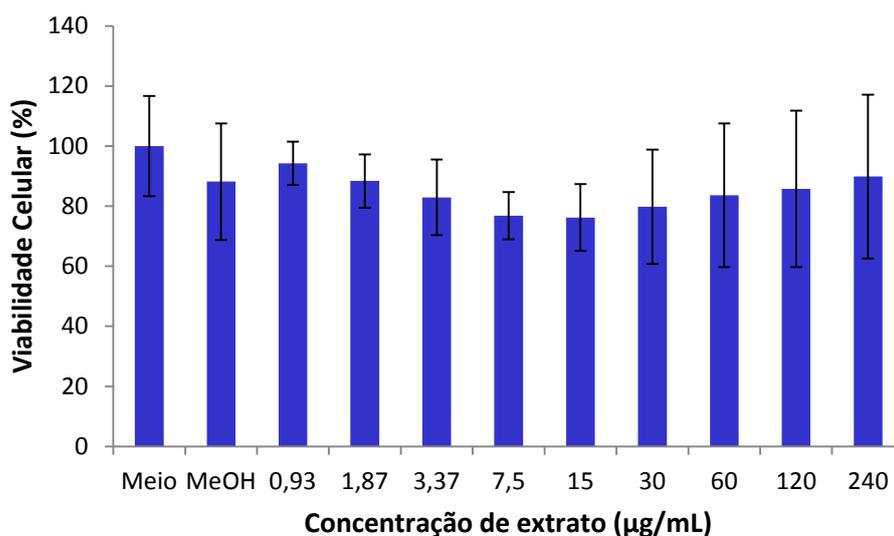
**Figura 28 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo VI.**

Células mesangiais humanas foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (MeOH) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo VI. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo ou extratos, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%.



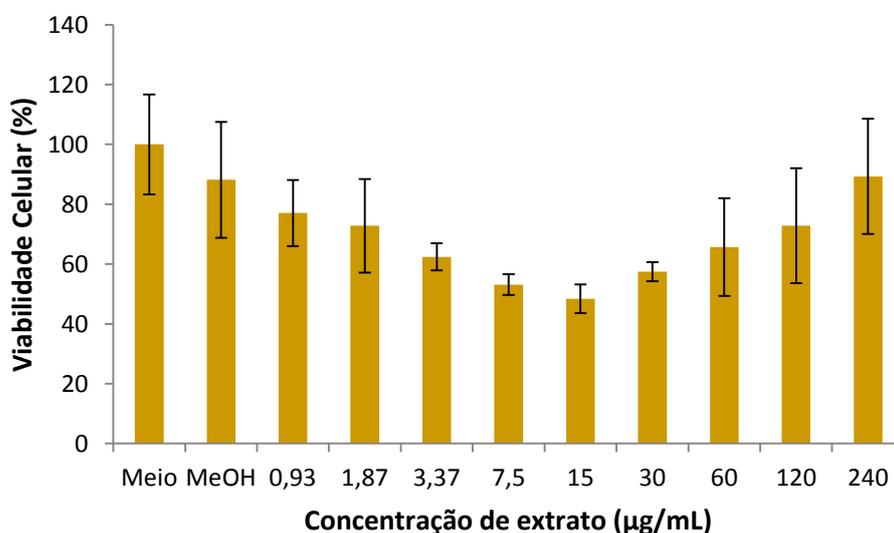
**Figura 29 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo VII.**

Células mesangiais humanas foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (MeOH) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo VII. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo ou extratos, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%.



**Figura 30 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo VIII.**

Células mesangiais humanas foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (MeOH) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo VIII. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo ou extratos, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%



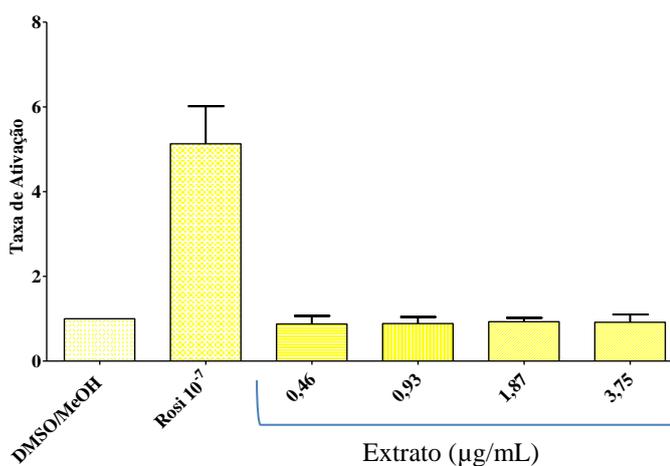
**Figura 31 - Avaliação da citotoxicidade dos extratos de cultura do Fungo IX.**

Células mesangiais humanas foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (MeOH) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo IX. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo ou extratos, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%.

#### 4.6 Avaliação da atividade agonista ao receptor PPAR $\gamma$ – ensaio de gene repórter.

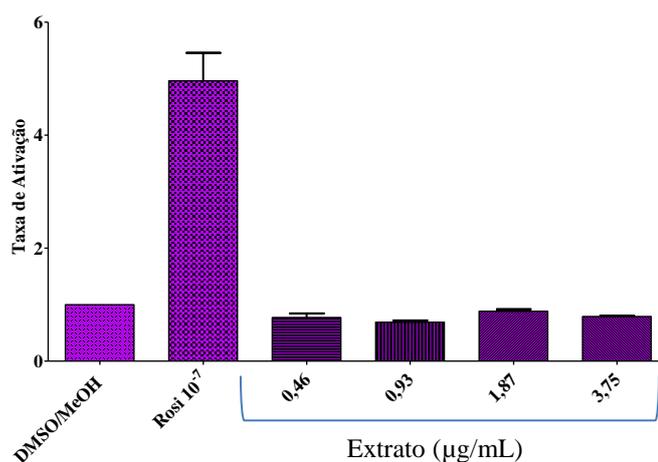
Os extratos de cultura foram submetidos à avaliação de sua capacidade agonista aos receptores do tipo PPAR $\gamma$ , pelo emprego do ensaio de gene repórter. Os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 32 a 40. Os dados foram expressos como média da taxa de ativação da transcrição em relação ao veículo (DMSO/MeOH), de pelo menos 3 experimentos distintos. A rosiglitazona, em uma concentração de  $10^{-7}$  M, foi utilizada como controle positivo. Os resultados foram analisados estatisticamente por análise de variância (teste *one-way* ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls.

Pode-se observar que o extrato do fungo VII foi capaz de ativar o receptor PPAR $\gamma$ , apresentando uma taxa de ativação equivalente a cerca de 35% da taxa de ativação da rosiglitazona (Figura 38).



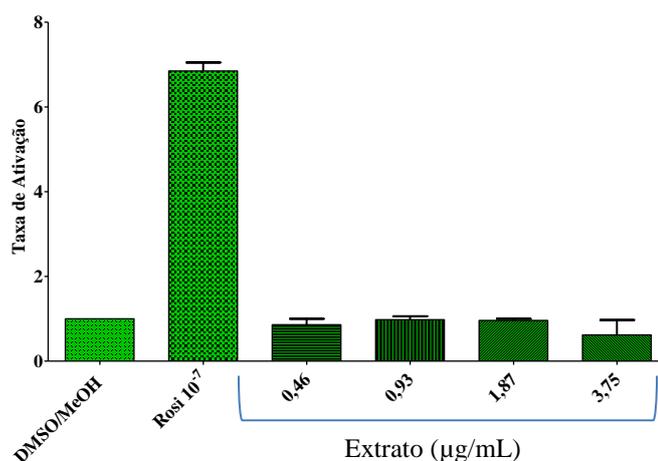
**Figura 32 – Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo I.**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com o vetor de expressão para PPAR $\gamma$  e o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 3:2), rosiglitazona  $10^{-7}$  M (controle positivo) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo I. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da taxa de ativação do PPAR $\gamma$ .



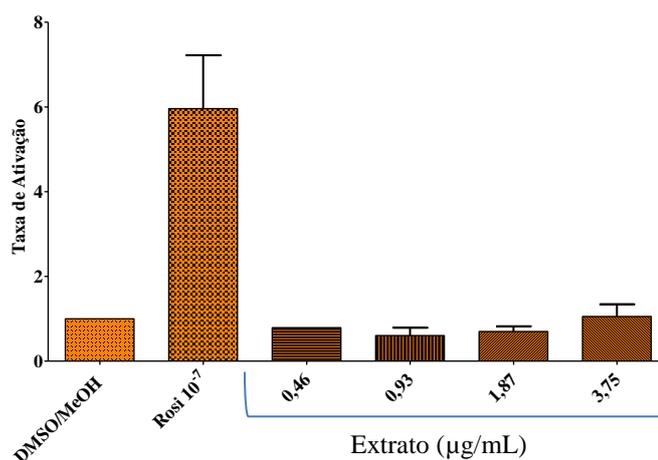
**Figura 33 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo II.**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com o vetor de expressão para PPAR $\gamma$  e o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 3:2), rosiglitazona 10<sup>-7</sup> M (controle positivo) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo II. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da taxa de ativação do PPAR $\gamma$ .



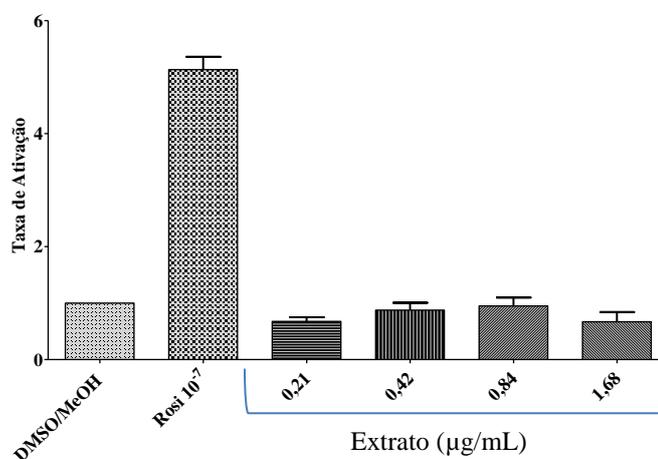
**Figura 34 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo III.**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com o vetor de expressão para PPAR $\gamma$  e o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 3:2), rosiglitazona 10<sup>-7</sup> M (controle positivo) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo III. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da taxa de ativação do PPAR $\gamma$ .



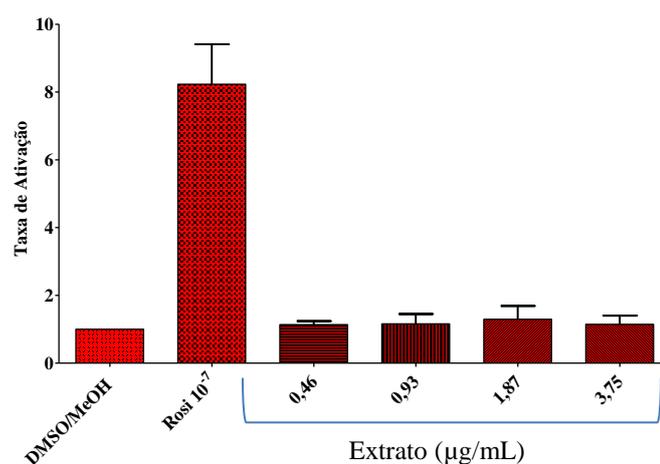
**Figura 35 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo IV.**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com o vetor de expressão para PPAR $\gamma$  e o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 3:2), rosiglitazona 10<sup>-7</sup> M (controle positivo) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo IV. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da taxa de ativação do PPAR $\gamma$ .



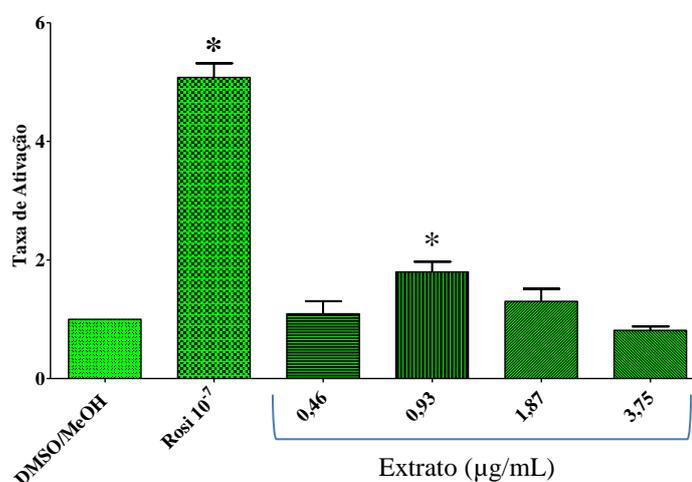
**Figura 36 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo V.**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com o vetor de expressão para PPAR $\gamma$  e o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 3:2), rosiglitazona 10<sup>-7</sup> M (controle positivo) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo V. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da taxa de ativação do PPAR $\gamma$ .



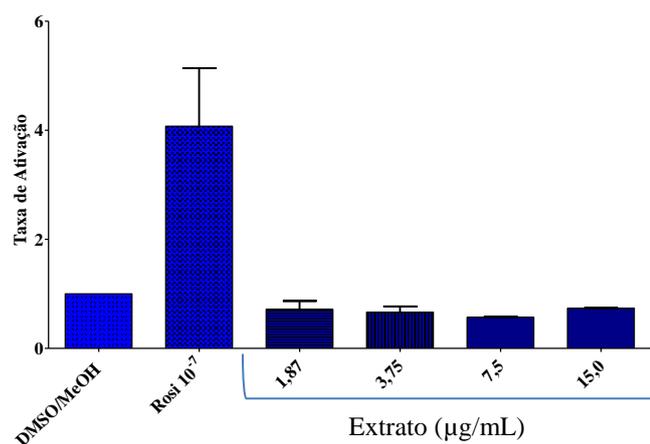
**Figura 37 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo VI.**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com o vetor de expressão para PPAR $\gamma$  e o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 3:2), rosiglitazona 10<sup>-7</sup> M (controle positivo) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo VI. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da taxa de ativação do PPAR $\gamma$ .



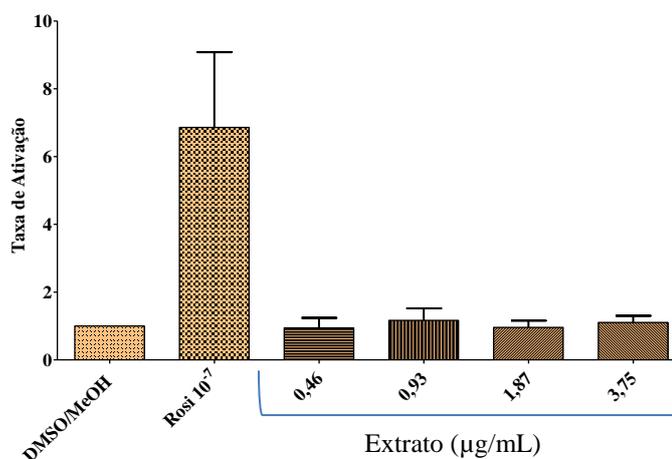
**Figura 38 – Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo VII.**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com o vetor de expressão para PPAR $\gamma$  e o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 3:2), rosiglitazona 10<sup>-7</sup> M (controle positivo) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo VII. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da taxa de ativação do PPAR $\gamma$ . \*, significativamente diferente do controle negativo (DMSO:MeOH),  $p < 0,05$ , pela análise de variância (*one-way ANOVA*) seguida de teste de comparação múltiplas de Newman-Keuls.



**Figura 39 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo VIII.**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com o vetor de expressão para PPAR $\gamma$  e o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 3:2), rosiglitazona 10<sup>-7</sup> M (controle positivo) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo VIII. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da taxa de ativação do PPAR $\gamma$ .



**Figura 40 - Ativação do receptor proliferador peroxissomal gama (PPAR $\gamma$ ) pelos extratos de cultura do fungo IX.**

Células mesangiais humanas foram co-transfectadas com o vetor de expressão para PPAR $\gamma$  e o gene repórter luciferase e tratadas com veículo (DMSO:MeOH, 3:2), rosiglitazona 10<sup>-7</sup> M (controle positivo) ou concentrações crescentes de extrato acetato de etila da cultura resultante do processo fermentativo do fungo IX. Os dados apresentados representam média  $\pm$  desvio padrão da taxa de ativação do PPAR $\gamma$ .

#### 4.7 Resumo dos resultados obtidos.

Os resultados obtidos para a avaliação dos extratos de cultura dos fungos endofíticos isolados quanto a sua atividade antioxidante, teor de polifenóis, teor de flavonóides, avaliação de citotoxicidade às células mesangiais e atividade agonista aos receptores PPAR $\gamma$  estão resumidos na Tabela 5.

**Tabela 5 – Resumo dos resultados.**

Extrato	Extrato de acetato de etila - extraído do fluido de cultura (mg)	Atividade antioxidante (IC <sub>50</sub> em $\mu\text{g/mL}$ )	Polifenóis totais (EAG, $\mu\text{g/mg}$ )	Flavonóides totais (EQ, $\mu\text{g/mg}$ )	Atividade citotóxica (IC <sub>50</sub> em $\mu\text{g/mL}$ )	Ativou PPAR $\gamma$ ?
I	82,0	210,2	117,3	4,6	1,93	Não
II	70,4	59,4	81,8	4,0	2,19	Não
III	49,2	5,7	192,7	6,7	4,31	Não
IV	62,6	23,1	109,1	5,9	7,49	Não
V	58,6	20,0	106,2	5,7	1,85	Não
VI	215,0	234,1	72,5	2,3	4,31	Não
VII	166,0	~ 30046	56,6	1,5	3,03	Sim
VIII	179,0	345,1	111,8	1,6	-	Não
IX	243,6	834,1	64,3	1,9	7,50	Não

## 5. DISCUSSÃO

O diabetes é um dos problemas de saúde pública mais desafiadores do século 21. Em 2030, estima-se que haverá 439 milhões de pessoas portadoras dessa síndrome metabólica (14), responsável por várias complicações na saúde, e que impede uma boa qualidade de vida.

É fato que a mudança no estilo de vida pode prevenir o diabetes tipo 2 em pessoas propensas a essa enfermidade (135). Porém, o aumento do êxodo rural para as grandes cidades, o sedentarismo e a cultura da alimentação sem qualidade são fatores que contribuem muito para o aumento de casos do diabetes.

As terapias disponíveis atualmente no tratamento do diabetes tipo 2 ficam menos eficazes à medida em que ocorre a diminuição do número de células  $\beta$ . E com exceção da insulina, todas as terapias têm ação limitada no controle dos níveis glicêmicos, sendo que, em alguns casos, a terapia combinada é necessária para que esse controle ocorra. Além disso, algumas terapias estão relacionadas a efeitos adversos importantes, como ganho de peso, hipoglicemia severa e disfunções vasculares e cardíacas (136).

As tiazolidinadionas, agonistas totais do  $\text{PPAR}\gamma$ , são utilizadas terapêuticamente para corrigir o desequilíbrio glicêmico ocorrido no diabetes tipo 2 (88). Além de ativar genes que regulam a sensibilidade à insulina, ativam outros genes que promovem efeitos adversos. Este fato já despertava alguma preocupação quando as tiazolidinadionas foram lançadas no mercado e, atualmente, algumas dessas substâncias já tiveram sua comercialização proibida (137-138). A troglitazona foi a primeira a ser retirada do mercado por causa dos efeitos hepatotóxicos. A rosiglitazona e a pioglitazona, regulamentadas e aprovadas para controle de glicemia no tratamento do diabetes tipo 2 em 1999, já tiveram vários efeitos adversos graves associados ao seu uso, sendo que a rosiglitazona foi retirada do mercado (8) e a pioglitazona já foi proibida na França e na Alemanha (139).

Por estas razões, o interesse por novos compostos com atividade hipoglicemiante tem crescido nos últimos anos. A procura por substâncias mais seguras e que possam impedir o desenvolvimento da doença, além de políticas

públicas no fomento da pesquisa e educação, são ações importantes na luta contra esta e outras enfermidades.

A etnofarmacobotânica é uma importante ferramenta na busca de novos fármacos, pois faz uso do conhecimento popular tradicional de grupos sociais específicos sobre o uso das plantas medicinais para orientar a busca de substâncias com atividade biológica na natureza (140). Esse uso tradicional das plantas é encarado como uma pré-triagem para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

Assim, o uso popular de plantas com atividade hipoglicemiante, como é o caso da *Bauhinia variegata*, em grande parte das vezes é uma alternativa utilizada para a escolha das espécies que passarão pelo *screening* na busca de substâncias para o tratamento do diabetes tipo 2. Conhecendo o histórico de uso popular das espécies de *Bauhinia* como hipoglicemiantes, Costa e colaboradores, em 2005, avaliaram a atividade agonista do extrato aquoso das folhas da *Bauhinia variegata* aos PPARs e demonstraram que este extrato foi capaz de ativar o PPAR $\gamma$  (87).

Além disso, outros trabalhos mostraram que plantas do gênero *Bauhinia* são produtoras de polifenóis e flavonóides, metabólitos secundários que a planta normalmente produz para suportar adversidades e que fazem parte das armas utilizadas por ela para se adaptar durante o processo evolutivo. Por esta razão, quanto mais estresse a planta sofre, mais metabólitos secundários ela produz. Esses grupos de compostos geralmente apresentam atividade antioxidante, além das mais variadas ações biológicas no tratamento de doenças (38, 43, 141-144).

Os fungos endofíticos hospedados pelas plantas também são responsáveis pela produção de grande parte dos metabólitos que lhe conferem essa proteção. Eles têm uma relação simbiótica muito estreita, variando do limite da patogenicidade ao mutualismo. Acredita-se que essa relação começou há milhares de anos e que, em alguns casos, possa ter havido transferência genética de um organismo a outro, conferindo a ambos a capacidade de produção dos mesmos metabólitos. Essa relação fantástica da natureza abre portas para uma exploração muito mais sustentável por causa da grande versatilidade dos fungos.

Se alguma substância hipoglicemiante produzida por fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* for identificada, com a adequação dos processos fermentativos para máxima produção deste metabólito de interesse, não haverá necessidade da

exploração da planta. Isso poderia aumentar o acesso ao fármaco, diminuindo o custo de produção do medicamento e o impacto ambiental.

### **5.1 Isolamento de fungos e produção dos extratos.**

Fungos filamentosos são os organismos mais utilizados nos processos biotecnológicos industriais por causa de sua habilidade em promover a decomposição de inúmeros substratos e de produzir várias substâncias de interesse para as indústrias de medicamentos, alimentos e produtos agrícolas, como enzimas e fármacos. Eles são capazes de produzir grande variedade de metabólitos secundários (145-146), com função de promover a adaptação e interação aos mais variados ambientes onde vivem, sendo essa uma das razões porque vêm sendo estudados como uma promissora fonte de moléculas com atividade biológica (145).

Fungos endofíticos são comumente encontrados em plantas e têm, como uma de suas características principais, uma relação simbiótica ou mutualística com o seu hospedeiro (45, 147-148). Essa relação promove a produção dos metabólitos secundários que vêm sendo considerados como fontes de substâncias com um potencial farmacológico importante.

É crescente o número de trabalhos que têm demonstrado o isolamento e a atividade biológica de extratos de fungos endofíticos (47, 54-55, 149-151). Além das atividades enzimáticas produzidas por estes microrganismos (152-153), estes trabalhos citam compostos com atividade citotóxica e antibacteriana (150), atividade antitumoral (44, 59, 154) e antiinflamatória (154).

Após o trabalho publicado por Stierle e colaboradores em 1993, mostrando que o fungo endofítico *Taxomyces andreanae* extraído da planta *Taxus brevifolia*, que produz taxol, também era capaz de produzir este metabólito, foi postulada a ideia de que fungos endofíticos teriam a capacidade de produzir os mesmos metabólitos que seus hospedeiros (64).

Porém, espécies de fungos endofíticos que colonizam a *Bauhinia variegata* ainda não foram descritos na literatura como fonte de substância hipoglicemiantes. Até o momento, não há artigos publicados indexados na *U.S. National Library of Medicine (PubMed)* do *National Institutes of Health* ou no *National Center for Biotechnology Information* que mostrem que fungos endofíticos tenham sido

testados ou possam ser utilizados como produtores de compostos agonistas de receptores nucleares.

Com base nisso, sabendo que o extrato aquoso das folhas da *Bauhinia variegata* foi capaz de ativar o PPAR $\gamma$  (87) e que fungos endofíticos podem ter um metabolismo similar ao de sua planta hospedeira, a bioprospecção dos fungos endofíticos desta planta se torna importante na procura de novas substâncias com atividade biológica e que podem ser candidatas a fármacos no tratamento do diabetes tipo 2.

Nesse intuito é que os procedimentos de isolamento de fungos endofíticos das folhas de *Bauhinia variegata* foram realizados. A droga vegetal foi coletada em Brasília, DF, e o isolamento dos fungos endofíticos de suas folhas mostrou a presença de vários fungos filamentosos. A diversidade morfológica dos fungos isolados, tanto macroscópica quanto microscópica, sugere a presença de várias espécies diferentes.

As imagens macroscópicas e microscópicas desses fungos podem ser observadas nas Figuras 10 a 18. As características observadas em meio de cultura e na microscopia óptica permitiram verificar algumas diferenças entre os fungos. Algumas características importantes desses organismos puderam ser observadas, porém, a identificação das espécies isoladas ainda não foi concluída, uma vez que, para não incorrer em erros de identificação, os fungos isolados serão identificados geneticamente. Quando semeados em meios de cultura, algumas características dos fungos podem sofrer alterações, como a não esporulação e perda da patogenicidade (155).

Dos fungos isolados, nove foram escolhidos, de acordo com suas diferenças macroscópicas, para passarem pelo processo fermentativo.

O processo fermentativo tem um papel fundamental na produção de metabólitos secundários pelos fungos. As condições do processo, como pH do meio de cultura, temperatura de incubação, aeração, fonte de nitrogênio e carbono e concentração do inócuo do fungo são determinantes nesse processo, pois, no meio natural desses organismos, as pressões seletivas sofridas por eles em ambiente hostil é que ditarão a produção dos seus metabólitos (156).

No processo fermentativo, os fungos mostraram rendimentos diferentes, tanto na produção micelial quanto na produção de extrato pela extração líquido-líquido do meio de cultura com acetato de etila, como mostra a Tabela 2.

Dentre os nove fungos, os que apresentaram maior rendimento de extrato obtido em relação à massa micelial produzida foram os fungos **VII** (1,1673%) e **IX** (1,3578%). Apesar da baixa quantidade de micélio, eles foram capazes de produzir boa quantidade de extrato quando comparados com os outros fungos. Já os fungos **II** (0,5569%) e **VI** (0,4002%) produziram uma quantidade mediana de extrato relativamente à quantidade de massa micelial quando comparados aos outros fungos. Os fungos **VIII** (0,2418%), **IV** (0,1388%) e **V** (0,1017%) produziram baixo rendimento de extrato e outros fungos, **I** (0,0659%) e **III** (0,0796%), foram os que mostraram menor rendimento na produção de extratos.

A otimização dos processos fermentativos, ou até a engenharia genética desses organismos, são ferramentas importantes na obtenção de maior rendimento de metabólitos secundário e devem ser tomados em conta em futuras produções de extratos.

No início da prospecção, os extratos produzidos foram os extratos metanólicos dos micélios e os extratos obtidos por partição líquido-líquido do meio de cultura com acetato de etila. Somente os resultados obtidos para estes últimos extratos estão apresentados neste trabalho. Portanto, é importante ressaltar que parte dos extratos obtidos, os extratos metanólicos da massa micelial, ainda precisam ser avaliados, além dos outros fungos endofíticos isolados das folhas de *Bauhinia variegata* que ainda não passaram pelo processo fermentativo. Essa grande variedade de fungos obtidos mostra que muito trabalho ainda precisa ser feito no sentido de elucidar o potencial farmacológico que esses microrganismos possuem, principalmente porque poucos trabalhos existem sobre o assunto.

## **5.2 Atividade Antioxidante**

Os processos oxidativos que ocorrem no organismo estão associados a várias patologias humanas, como doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e diabetes. Moléculas antioxidantes podem ser usadas para prevenir ou tratar estas enfermidades e podem ser produzidas por vários microrganismos (65, 146).

Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos produzidos, determinou-se a capacidade que os extratos tinham de doar um radical hidrogênio ao radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•). Na reação, em solução com etanol o DPPH• tem

uma coloração violeta que se torna amarela, com a formação do difenil picrihidrazina, à medida em que é reduzido pela molécula doadora do radical hidrogênio (antioxidante) (129). Quanto mais amarela a solução estiver em presença do agente antioxidante, maior sua habilidade em sequestrar o radical livre ou de doar elétrons.

A capacidade dos extratos dos fungos em sequestrar o DPPH•, foi expressa em IC<sub>50</sub> (µg/mL).

Entre os nove extratos testados, o extrato do fungo **III** foi o que mostrou maior capacidade na redução do radical estável DPPH, com IC<sub>50</sub> de 5,68 µg/mL. Sua atividade mostrou-se um pouco menor que as dos controles ácido ascórbico, com IC<sub>50</sub> de 1,7 µg/mL, e quercetina, com IC<sub>50</sub> de 1,85 µg/mL, e um pouco maior que a do BHT, com IC<sub>50</sub> de 7,16 µg/mL (Figura 19). Considerando que o extrato é composto por uma mistura de substâncias e que, ainda assim, teve uma atividade antioxidante próxima e de compostos puros usados como controle, este resultado é bastante promissor.

Entre os outros extratos, o extrato do fungo **II**, com IC<sub>50</sub> de 59,38 µg/mL, o do fungo **IV**, com IC<sub>50</sub> de 23,16 µg/mL e o do fungo **V**, com IC<sub>50</sub> de 20,03 µg/mL, também se destacaram pela suas capacidades antioxidantes.

Os extratos do fungo **I**, com IC<sub>50</sub> de 210,1 µg/mL, o do fungo **VI**, com IC<sub>50</sub> de 234,1 µg/mL, e o do fungo **VIII**, com IC<sub>50</sub> de 345,1 µg/mL, mostraram uma atividade antioxidante moderada e os extratos do fungo **IX**, com IC<sub>50</sub> de 834,1 µg/mL, e do fungo **VII**, com IC<sub>50</sub> de aproximadamente 30.046 µg/mL, mostraram as mais baixas atividades antioxidantes, quando comparados aos outros extratos.

Os resultados obtidos são animadores quando comparados aos resultados publicados na literatura. Srinivasan e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antioxidante do extrato etanólico do fungo endofítico *Phyllosticta sp.*, extraído de uma planta medicinal da Índia, e encontraram IC<sub>50</sub> de 2.030,25 µg/mL (157).

Em outro trabalho, Samarth e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antioxidante do extrato de cinco plantas com atividade radio-protetora em ratos submetidos à radiação gama, sugerindo que essa atividade poderia ser atribuída a sua capacidade de sequestrar EROs gerados pela radiação ionizante. Os seguintes resultados foram encontrados: *Adhatoda vasica* com IC<sub>50</sub> de 337 µg/mL; *Amaranthus paniculatus* com IC<sub>50</sub> de 548 µg/mL; *Brassica compestris* com IC<sub>50</sub> de 398 µg/mL;

*Mentha piperita* com IC<sub>50</sub> de 273 µg/mL e *Spirulina fusiformis* com IC<sub>50</sub> de 620 µg/mL (158).

Em 2010, Pal e colaboradores publicaram um trabalho mostrando a atividade antioxidante de diferentes extratos do corpo de frutificação do fungo comestível *Pleurotus saquarrosulus* (Mont.) Singer. O extrato que obteve maior atividade sequestradora de DPPH• foi o extrato aquoso obtido a quente, com IC<sub>50</sub> de 340 µg/mL (159).

Em outro estudo, Nakajima e colaboradores avaliaram a atividade de um fungo, *Inonotus obliquus*, que é usado na medicina tradicional e com atividades antiinflamatória, contra estresse oxidativo e antitumoral mostradas em outros trabalhos. O extrato metanólico do corpo de frutificação desse fungo resultou em uma atividade do sequestro do DPPH• com IC<sub>50</sub> de 65,5 µg/mL.

Karaman e colaboradores (2010) estudaram a atividade antioxidante e antimicroniana de alguns fungos comestíveis e com propriedades medicinais. Os fungos coletados e suas atividades antioxidantes foram: *Ganoderma lucidum* com IC<sub>50</sub> de 20,68 µg/mL, *Ganoderma applanatum* com IC<sub>50</sub> de 7,8 µg/mL, *Meripilus giganteus* com IC<sub>50</sub> de 155,2 µg/mL, *Laetiporus sulphureus* com IC<sub>50</sub> de 59,2 µg/mL, *Flammulina velutipes* com IC<sub>50</sub> de 828,3 µg/mL, *Coriolus versicolor* com IC<sub>50</sub> de 239,3 µg/mL, *Pleurotus ostreatus* com IC<sub>50</sub> de 469,1 µg/mL e *Panus tigrinus* com IC<sub>50</sub> de 205,9 µg/mL (160).

Em outro trabalho, Sousa e colaboradores (2004) avaliaram a atividade antioxidante da kaempferitrina, um flavonóide encontrado nas folhas da *Bauhinia forticata* e com atividade hipoglicemiante em ratos com diabetes induzida por aloxana. A capacidade de redução do DPPH• pela kaempferitrina apresentou um IC<sub>50</sub> de 84,0 µM (67).

Esses resultados sugerem que os extratos dos fungos endofíticos isolados da *Bauhinia variegata* tem uma excelente capacidade antioxidante e podem ser considerados como uma fonte para extração de compostos com essa atividade.

Além disso, a descoberta de novas moléculas com atividade antioxidante poderia ajudar no tratamento de síndromes metabólicas causadas pelo estresse oxidativo, pois estas moléculas poderiam ser avaliadas para aplicação no reestabelecimento do equilíbrio do sistema redox fisiológico.

### 5.3 Quantificação de Polifenóis e Flavonóides.

Os polifenóis são metabólitos secundários produzidos em plantas e fungos e que, geralmente, estão envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta e agentes patogênicos. Eles são responsáveis pela ação antioxidante da maioria dos compostos derivados das plantas (161).

Com base nisso, o passo seguinte do trabalho foi avaliar a teor de polifenóis e flavonóides que os fungos produziram para tentar relacionar a quantidade desses metabólitos com a atividade antioxidante apresentada pelos extratos dos fungos endofíticos isolados da *B. variegata*.

Para isso, dois métodos foram utilizados, o método do reagente Folin-Ciocalteu, para quantificação de polifenóis, e o método do cloreto de alumínio, para quantificação de flavonóides.

O princípio do método do reagente de Folin-Ciocalteu está na capacidade do íon fenolato em doar elétron, ou seja, ser oxidado. Nesse método, os derivados de benzeno podem ser facilmente determinados quando em pH alcalino, próximo a 10, pois o íon fenolato pode ser oxidado com facilidade nessas condições. O reagente de Folin-Ciocalteu é capaz de reagir completamente com compostos fenólicos quando o carbonato de sódio saturado é adicionado ao meio reacional, formando a coloração azul escura que tem absorvância máxima por volta de 760 nm (131, 162).

Os flavonóides fazem parte da classe dos polifenóis e, em geral, possuem atividades fisiológicas e farmacológicas diversificadas, como estrogênica, antitumoral, antimicrobiana, antialérgica, antiinflamatória, atividade antioxidante e queladora de íons metálicos (116-119). Sua atividade antioxidante está relacionada às características de sua molécula, mostradas na Figura 7, e para sua quantificação pode ser usado o método do cloreto de alumínio. Nesse método, o íon alumínio forma um complexo estável com os grupos hidroxila dos flavonóides, permitindo um desvio no comprimento de onda, evitando a interferência de outros fenóis (162).

Os resultados da quantificação de polifenóis e flavonóides totais obtidos foram expressos como Equivalentes de Ácido Gálico por miligrama de extrato (EAG/mg) e Equivalentes de Quercetina por miligrama de extrato (EQ/mg), respectivamente, e estão mostrados nas Tabelas 3 e 4 e Figura 22.

Dentre os nove extratos, o do fungo número III mostrou a maior quantidade de polifenóis, com 192,7  $\mu\text{g}$  EAG/mg, e flavonóides totais, com 6,7  $\mu\text{g}$  EQ/mg. Quatro

outros extratos apresentaram alto teor de polifenóis, o do fungo **I**, com 117,3 µg EAG/mg, do fungo **IV**, com 109,1 µg EAG/mg, **V**, com 106,2 µg EAG/mg, e **VIII**, com 111,8 µg EAG/mg. Quatro extratos mostraram altos teores de flavonóides, dos fungos **I** (4,6 µg EQ/mg), **II** (4,0 µg EQ/mg), **IV** (5,9 µg EQ/mg) e **V** (5,6 µg EQ/mg).

Os extratos dos fungos **II** (81,8 µg EAG/mg), **VI** (72,5 µg EAG/mg), **VII** (56,6 µg EAG/mg) e **IX** (64,3 µg EAG/mg) foram os que apresentaram os mais baixos teores de polifenóis e os extratos dos fungos **VI** (2,3 µg EQ/mg), **VII** (1,5 µg EQ/mg), **VIII** (1,6 µg EQ/mg) e **IX** (1,9 µg EQ/mg) foram os que apresentaram os menores teores de flavonóides.

Assim como na avaliação da atividade antioxidante, os teores de polifenóis e flavonóides também apresentaram valores superiores aos de alguns trabalhos publicados na literatura. Apesar de pequenas diferenças, quase todos os trabalhos utilizaram os mesmos métodos para a quantificação de polifenóis e flavonóides, com uma exceção que será comentada.

Ennajar e colaboradores (2009) obtiveram o extrato acetato de etila das folhas da *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae), uma planta medicinal utilizada no tratamento de diabetes, diarreia e reumatismo, além de ter ação diurética. Na quantificação de polifenóis encontraram 0,116 µg EAG/mg e na quantificação de flavonóides encontraram 0,024 µg EQ/mg, além de um IC<sub>50</sub> 273 µg/mL na determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH• (163).

Em outro estudo, com objetivo de determinar a capacidade antioxidante em seis fungos comestíveis do gênero *Morchella*, Gursoy e colaboradores (2009), quantificaram polifenóis e flavonóides totais nos extratos metanólicos desses fungos. Os resultados obtidos foram, para *Morchella rotunda*, 16,98 µg EAG/mg e 0,59 µg EQ/mg; *Morchella crassipes* (Ventenat), 18,59 µg EAG/mg e 0,47 µg EQ/mg; *Morchella esculenta* var. *umbrina*, 21,33 µg EAG/mg e 0,25 µg EQ/mg; *Morchella deliciosa*, 12,36 µg EAG/mg e 0,15 µg EQ/mg; *Morchella elata*, 15,36 µg EAG/mg e 0,30 µg EQ/mg; *Morchella cônica*, 25,38 µg EAG/mg e 0,24 µg EQ/mg; e *Morchella angusticeps*, 16,55 µg EAG/mg e 0,26 µg EQ/mg, respectivamente, para polifenóis e flavonóides.

Em outro trabalho, Liu e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antioxidante e quantificaram polifenóis e flavonóides dos extratos do corpo de frutificação fungo endofítico *Xylaria* sp. (cepa YX-28) isolado de uma planta da

espécie *Ginkgo biloba* com mais de mil anos de idade na China. Os solventes utilizados para o preparo dos extratos foram hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona e metanol. O que chama bastante atenção é o teor de polifenóis no extrato metanólico (54,51  $\mu\text{g}$  EAG/mg) em relação ao extrato do acetato de etila (16,94  $\mu\text{g}$  EAG/mg), pois a quantidade de polifenóis no extrato metanólico foi mais de três vezes maior que a do outro extrato. Mas mesmo assim, a maior quantidade de polifenóis produzida pelo fungo *Xylaria sp.* (cepa YX-28) não superou a menor produção de polifenóis encontrada entre os fungos endofíticos isolados da *B. variegata* (fungo VII). A quantidade de flavonóides também foi bem superior, quase 6 vezes maior, quando comparados os teores dos extratos de acetato de etila (15,21  $\mu\text{g}$  RE/mg) e metanol (86,76  $\mu\text{g}$  RE/mg). Porém, não foi possível comparar com os resultados dos extratos dos fungos isolados da *B. variegata*, pois a curva padrão utilizada pelos pesquisadores na quantificação foi feita com rutina (Equivalentes de Rutina /mg de extrato seco) e não quercetina (164).

No mesmo trabalho citado anteriormente, Pal e colaboradores (2010) quantificaram polifenóis e flavonóides e novamente o extrato aquoso obtido a quente foi o que obteve maior rendimento com 82,5  $\mu\text{g}$  EAG/mg e 5,45  $\mu\text{g}$  EQ/mg de polifenóis e flavonóides, respectivamente (159).

Como já discutido, os polifenóis e flavonóides são moléculas reconhecidamente antioxidantes e que podem exercer papel importante nas vias metabólicas. Mas o que não se pode deixar de lembrar é a capacidade pró-oxidante que algumas dessas substâncias apresentam.

Alguns flavonóides, inclusive a quercetina, têm sido descritos como mutagênicos em ensaios *in vitro* (165-167). O mecanismo de ação do processo pró-oxidante está relacionado à formação do radical aroxila pelo flavonóide (Flav-O•) quando ele reage com o primeiro radical livre no processo antioxidante, mediado pelo grupamento catecol [anel B, Figura 7 (C) e (B)]. Ao invés de reagir com um segundo radical livre, em presença de íons metálicos, o Flav-O• pode reagir com oxigênio gerando ânions radicais superóxidos (123).

Lapidot e colaboradores (2002) induziram o estresse oxidativo em cultura de células  $\beta$  pancreáticas por meio da glicose oxidase (GO), que produz  $\text{H}_2\text{O}_2$ , por 20 horas, levando a uma diminuição de 50% na proliferação celular. Eles observaram que ao adicionar antioxidantes, como quercetina, catequina e ácido ascórbico,

inesperadamente, houve uma diminuição mais acentuada da proliferação celular ao invés de aumentá-la pelo efeito da atividade antioxidante dessas moléculas. Com isso, sugeriram que o processo oxidativo sinérgico ocorre por causa da interação do  $H_2O_2$  com o ferro presente no meio de cultura, que é reduzido por compostos fenólicos presentes nos antioxidantes, formando  $OH\cdot$ , que é um potente agente oxidante. Em seguida, mostraram que, ao introduzir outra fonte oxidante, pela via da GO e metamioglobulina, induziam a produção do radical ferril. Por essa via, os flavonóides, nas mesmas condições, exerceram atividade antioxidante, fazendo com que a viabilidade celular aumentasse (168). Isso mostra que mesmo tendo potencial no tratamento de doenças, os polifenóis precisam ser estudados para que seu mecanismo específico de ação possa ser elucidado e o efeito pró-oxidante seja evitado.

#### 5.4 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

O brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) é um sal de tetrazólio de coloração amarela, que em células competentes é reduzido na mitocôndria, principalmente pela enzima succinato desidrogenase, a um produto azul, chamado cristal de formazana, que é insolúvel em água. Este cristal, quando é solubilizado em álcool, pode ser quantificado por análise espectrofotométrica.

Este ensaio é sensível e quantitativo por causa da relação entre a atividade celular e a absorvância produzida ser linear, ou seja, o crescimento ou morte celular podem ser medidos pela absorvância dos cristais produzidos no ensaio (133).

Para o planejamento dos ensaios de gene repórter, a citotoxicidade dos extratos foi avaliada pelo ensaio do MTT. Assim, foi possível determinar a concentração tóxica dos extratos e evitar falsos resultados nos experimentos com as células mesangiais.

Como pode ser observado nas Figuras 23 a 31, os extratos, em sua maioria, apresentaram citotoxicidade em concentrações baixas, acima de  $3,37 \mu\text{g/mL}$ . A presença de altos teores de flavonóides e polifenóis nesses extratos sugere que esta citotoxicidade pode ser atribuída à atividade pró-oxidante desses compostos.

O curioso é que em alguns extratos, os dos fungos **IV**, **V**, **VII** e **IX**, nas concentrações acima de  $15 \mu\text{g/mL}$ , a viabilidade celular se mostrou aumentada. Uma possível explicação para este resultado poderia ser a do efeito da ação

reduzora de flavonóides presentes nos extratos sobre o MTT. Peng e colaboradores (2005) mostraram que na ausência de células os flavonóides luteolina e quercetina são capazes de reduzir o MTT, produzindo o cristal de formazana (169). Além disso, em outro trabalho, Talore e colaboradores (2007) mostraram que o meio de cultura e a presença de soro fetal bovino, mesmo em baixa concentração, podem influenciar a redução do MTT por alguns flavonóides, como quercetina, rutina e luteolina (170).

Como foi discutido anteriormente, a concentração de flavonóides nos extratos é bastante acentuada quanto comparada a outros trabalhos publicados anteriormente. O aumento na concentração de alguns extratos nos ensaios realizados pode ter sido responsável por esse efeito redutor de algum flavonóide presente nesses extratos sobre o MTT. Assim, esta interferência da ação redutora dos extratos sobre o MTT precisa ser verificada. O ensaio do DPPH•, usado para avaliação da capacidade antioxidante dos extratos, não é sensível a esta atividade pró-oxidante dos flavonóides. Por isso, o estudo do mecanismo de ação desses extratos deve ser feito para elucidar melhor como a atividade antioxidante ocorre, além de seu possível efeito pró-oxidante. Porém, como este efeito ocorreu apenas nas concentrações mais altas dos extratos, concentrações estas acima daquelas determinadas como citotóxicas, este efeito não foi considerado como um risco de falsos negativos neste ensaio especificamente.

### **5.5 Atividade agonista ao PPAR $\gamma$ .**

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR) estão envolvidos na regulação da transcrição de vários genes do metabolismo energético e estão distribuídos em vários tecidos do organismo (71).

Para avaliar se os extratos apresentavam atividade agonista sobre os receptores PPAR $\gamma$ , foram realizados ensaios de co-transfecção de células mesangiais humanas com o plasmídeo para expressão do receptor quimérico (construído como o LBD do PPAR $\gamma$  fusionado com o DBD do fator de transcrição de leveduras GAL4) e com o plasmídeo com um gene repórter da luciferase dirigido pelo promotor mínimo do adenovírus E1b e por uma sequência de cinco sítios de ligação ao GAL4 (UAS<sub>5x</sub>-Luc), seguidos de tratamento com os diferentes extratos nas concentrações máximas estabelecidas pelos resultados do ensaio de citotoxicidade (171).

Dentre os fungos isolados nas folhas da *Bauhinia variegata*, um deles, o fungo **VII**, mostrou uma atividade agonista parcial ao receptor PPAR $\gamma$  na concentração de 0,93  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 38), correspondente a 35% da atividade agonista da rosiglitazona na concentração de  $10^{-7}\text{M}$ . Este achado pode contribuir para a descoberta de moléculas agonistas que podem ser testadas para uso como hipoglicemiantes em tratamento do diabetes tipo 2.

Os hipoglicemiantes orais tiazolidinadionas, que favorecem a sensibilização da insulina mediada pela ativação do PPAR $\gamma$ , foram muito utilizadas para o tratamento do diabetes, porém vários efeitos adversos severos fizeram com que essa terapia fosse repensada, por causa do grande número de genes regulados pelos PPARs.

Por muito tempo se procurou substâncias que fossem capazes de ativar diferentes isoformas dos PPARs, principalmente agonistas duplos que ativassem as isoformas  $\gamma$  e  $\alpha$ , por se supor que essas substâncias fossem capazes de prevenir o desenvolvimento de complicações cardiovasculares relacionadas ao diabetes. Porém, os resultados não foram animadores. A capacidade agonista parcial ou total de substâncias aos PPARs está relacionada, entre outros, à sua habilidade em melhorar a dislipidemia e a de exercer um efeito no controle de peso. Porém, como compostos agonistas duplos de PPAR têm sido associados a efeitos adversos, o uso de desses tipos de agonistas, de pan-agonistas e, mais recentemente, até mesmo de agonistas totais tem sido repensado. Assim, fármacos novos continuam a ser investigados para se descobrir um medicamento seguro, que possam oferecer benefícios em vários estágios do diabetes (172).

Em estudo publicado em 2007, por Nissem e colaboradores, foi mostrado que o tratamento com rosiglitazona foi associado a um aumento significativo do risco de infarto do miocárdio e com um aumento no risco de morte por causas cardiovasculares. Apesar do mecanismo exato da relação entre os problemas cardiovasculares e a administração de rosiglitazona não estar elucidado, os autores consideraram que suas descobertas eram preocupantes, devido à alta incidência de eventos cardiovasculares em pacientes com diabetes, e uma vez que a exposição desses pacientes à rosiglitazona era generalizada (138). No mesmo ano Lincoff e colaboradores publicaram um trabalho mostrando que o uso da pioglitazona por

pessoas diabéticas aumentou o risco de infarto no miocárdio, mas com ausência no risco de morte associado ao seu uso (173).

Esses achados começaram a colocar em xeque o uso de terapias utilizando essas substância no tratamento do diabetes tipo 2 pela ativação do PPAR $\gamma$  (174).

Porém, um estudo publicado em 2010, por Choi e colaboradores, mostrou outro mecanismo de ação do aumento da sensibilidade à insulina mediado pelo PPAR $\gamma$ : quando ocorre a fosforilação do PPAR $\gamma$  pela quinase 5 dependente de ciclina (Cdk5), a atividade transcricional de alguns genes específicos fica modificada. Um desses genes é o que transcreve a adiponectina, uma adipocina sensibilizadora de insulina. Os pesquisadores mostram que tanto ligantes agonistas parciais como agonistas totais eram capazes de impedir a fosforilação do PPAR $\gamma$  pela Cdk5 e restaurar a expressão desse gene (175).

Esses achados sugerem que agonistas parciais e mais seletivos podem ter efeitos mais positivos como ligantes de PPAR $\gamma$ , pois, dessa forma, diminuiriam os efeitos adversos causados pela ativação da transcrição indesejada de alguns genes, favorecidas pela ligação de agonistas totais, mas ainda impediriam a fosforilação do PPAR $\gamma$  pela Cdk5, melhorando a sensibilidade à insulina. Esses resultados indicam uma nova perspectiva na procura de ligantes de PPAR e o extrato do fungo **VII** se apresenta como um bom candidato.

Flavonóides têm demonstrado efeito benéfico em relação ao *diabetes mellitus*, agindo em várias vias, como na regulação nas vias bioquímicas da glicose, na tolerância à glicose, perfil lipídico, biossíntese do glicogênio, captação de glicose e liberação de insulina (68, 121). Vários flavonóides já foram descritos como agonistas das isoformas de PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$  (176-180). Como existe uma relação do PPAR $\gamma$  e a formação de EROs (98, 112-114), esperava-se que os extratos com maior atividades antioxidante, e os que tivessem maior quantidade de polifenóis e flavonóides, fossem os que apresentassem a melhor atividade agonista do PPAR $\gamma$ . Porém, o único extrato (**VII**) que demonstrou essa atividade agonista foi o que apresentou menor atividade antioxidante e menor teor de polifenóis e flavonóides.

Como já discutido, os flavonóides podem apresentar atividade antioxidante e pró-oxidante, dependendo de sua concentração no meio reacional. Esta característica dos flavonóides poderia explicar alguns dos resultados obtidos neste estudo. Apesar de todos os outros extratos terem demonstrado atividade

antioxidante quando ensaiados com o radical estável DPPH•, é importante considerar que os flavonóides podem apresentar atividade antioxidante pelo sequestro de outros tipos de radicais específicos, que não foram verificadas neste ensaio utilizado. Além disso, este resultado, aparentemente desconhecido, entre a atividade antioxidante e atividade agonista de PPAR $\gamma$  dos extratos, pode ser compreendido se lembrado que a atividade pró-oxidante dos fenóis, entre eles os flavonóides, está relacionada à sua capacidade de quelar ou reduzir metais (181), e o ensaio de atividade antioxidante que utiliza o DPPH• não é um ensaio dependente da presença de metais como catalisadores de reação.

O estudo conjunto da atividade agonista a receptores nucleares e atividade antioxidante caminha na mesma direção que os achados recentes sobre a relação PPAR/EROs nos processos patológicos do diabetes. Um melhor entendimento desta relação poderia auxiliar no entendimento do mecanismo de ação dos antioxidantes no tratamento de diabetes e suas complicações.

## 6. CONCLUSÃO

- Entre os extratos de cultura dos fungos endofíticos das folhas de *Bauhinia variegata* obtidos pela extração líquido-líquido com acetato de etila, os extratos dos fungos **I, II, III, IV, V, VI, VIII e IX** apresentaram atividade antioxidante, quando avaliados pelo ensaio do DPPH•.
- O extrato do fungo **VII** apresentou uma atividade agonista ao PPAR $\gamma$  correspondente a cerca de 35% da atividade agonista exibida pela rosiglitazona numa concentração de  $10^{-7}$  M.
- Todos os extratos apresentaram alta concentração de polifenóis e flavonóides.
- O extrato VII foi o que apresentou o menor teor de polifenóis e flavonóides, mas mesmo assim, maior do que os publicados em alguns artigos na literatura.
- Os extratos mostraram uma relação direta entre o teor de polifenóis e de flavonóides e a atividade antioxidante.
- Todos os extratos apresentaram citotoxicidade às células mesangiais humanas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. In: Surveillance DoND, editor. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneve: Report of a WHO Consultation; 1999.
2. Sheetz MJ, King GL. Molecular Understanding of Hyperglycemia's Adverse Effects for Diabetic Complications. JAMA: The Journal of the American Medical Association. 2002 November 27, 2002;288(20):2579-88.
3. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. The Lancet. 2001;358(9277):221-9.
4. Heise T, Nosek L, Rønn BB, Endahl L, Heinemann L, Kapitza C, et al. Lower Within-Subject Variability of Insulin Detemir in Comparison to NPH Insulin and Insulin Glargine in People With Type 1 Diabetes. Diabetes. 2004 June 1, 2004;53(6):1614-20.
5. Lorenzo C, Wagenknecht LE, D'Agostino RB, Rewers MJ, Karter AJ, Haffner SM. Insulin Resistance,  $\beta$ -Cell Dysfunction, and Conversion to Type 2 Diabetes in a Multiethnic Population. Diabetes Care. 2010 January 1, 2010;33(1):67-72.
6. Association AD. Standards of Medical Care in Diabetes—2009. Diabetes Care. 2009 January 2009;32(Supplement 1):S13-S61.
7. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. The New England Journal of Medicine. 2002;346(6):393.
8. Singh S, Loke YK, Furberg CD. Long-term Risk of Cardiovascular Events With Rosiglitazone. JAMA: The Journal of the American Medical Association. 2007 September 12, 2007;298(10):1189-95.
9. Chiasson JL, Josse RG, Hunt JA, Palmason C, Rodger NW, Ross SA, et al. The Efficacy of Acarbose in the Treatment of Patients with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: A Multicenter, Controlled Clinical Trial. Annals of internal medicine. 1994;121(12):928.
10. Zimmerman BR. Sulfonylureas. Endocrinology & Metabolism Clinics of North America. 1997;26(3):511-22.
11. Brasil. Diabetes Mellitus. In: Básica DdA, editor. 1ª ed. Brasília - DF: Ministério da Saúde; 2006. p. 64.
12. Franco OH, Steyerberg EW, Hu FB, Mackenbach J, Nusselder W. Associations of Diabetes Mellitus With Total Life Expectancy and Life Expectancy With and Without Cardiovascular Disease. Arch Intern Med. 2007 June 11, 2007;167(11):1145-51.

13. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes. *Diabetes Care*. 2004;27(5):1047.
14. Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2010;87(1):4-14.
15. Butler MS. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*. 2004;67(12):2141-53.
16. Ganesan A. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2008;12(3):306-17.
17. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*. 2001 Mar;109 Suppl 1:69-75.
18. WHO. *The Use of Herbal Medicines in Primary Health Care*. Yangon, Myanmar: World Health Organization 2009.
19. Harvey AL. Natural products as a screening resource. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2007;11(5):480-4.
20. Cragg GM, Newman DJ, Snader KM. Natural Products in Drug Discovery and Development. *Journal of Natural Products*. 1997;60(1):52-60.
21. Abel U, Koch C, Speitling M, Hansske FG. Modern methods to produce natural-product libraries. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2002;6(4):453-8.
22. Bindseil KU, Jakupovic J, Wolf D, Lavayre J, Leboul J, van der Pyl D. Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2001;6(16):840-7.
23. Dobson CM. Chemical space and biology. *Nature*. 2004;432(7019):824-8.
24. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products*. 2003;66(7):1022-37.
25. Li JW-H, Vederas JC. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*. 2009 July 10, 2009;325(5937):161-5.
26. Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 2008;13(19-20):894-901.
27. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*. 2007;70(3):461-77.
28. Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Sasse F, Jansen R, Murali TS. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*. 2009;In Press, Corrected Proof.

29. Mayer AMS, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2010;31(6):255-65.
30. Adrio JL, Demain AL. Fungal biotechnology. *Int Microbiol*. 2003 Sep;6(3):191-9.
31. Udway DW, Zeigler L, Asolkar RN, Singan V, Lapidus A, Fenical W, et al. Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 19;104(25):10376-81.
32. Subramanian B, Nakeff A, Tenney K, Crews P, Gunatilaka L, Valeriote F. A new paradigm for the development of anticancer agents from natural products. *J Exp Ther Oncol*. 2006;5(3):195-204.
33. Newman DJ. Natural Products as Leads to Potential Drugs: An Old Process or the New Hope for Drug Discovery? *Journal of Medicinal Chemistry*. 2008;51(9):2589-99.
34. Pinto AC, Silva DHS, Bolzani VdS, Lopes NP, Epifanio RdA. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quimica Nova*. 2002;25:45-61.
35. Basso LA, Silva LHPd, Fett-Neto AG, Azevedo Junior WFd, Moreira ÍdS, Palma MS, et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100:575-606.
36. Silva JMC, Bates JM. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot. *BioScience*. 2002;52(3):225-34.
37. Bustamante MMC, Martinelli LA, Silva DA, Camargo PB, Klink CA, Domingues TF, et al. <sup>15</sup>N Natural Abundance in woody plants and soils of central Brazilian savannas (Cerrado). *Ecological Applications*. 2004;14(sp4):200-13.
38. Reddy MVB, Reddy MK, Gunasekar D, Caux C, Bodo B. A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. *Phytochemistry*. 2003;64(4):879-82.
39. Menezes FdS, Minto ABM, Ruela HS, Kuster RM, Sheridan H, Frankish N. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2007;17:8-13.
40. Azevedo C, Maciel F, Silva L, Ferreira A, Da Cunha M, Machado O, et al. Isolation and intracellular localization of insulin-like proteins from leaves of *Bauhinia variegata*. *Brazilian journal of medical and biological research*. 2006;39(11):1435-44.
41. Silva KLd, Cechinel Filho V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Quimica Nova*. 2002;25:449-54.

42. Rocha FD, Teixeira VL, Pereira RC, Kaplan MAC. Diabetes mellitus e estresse oxidativo: produtos naturais como alvo de novos modelos terapêuticos. *Rev Bras Farm.* 2006;87:49-54.
43. Duarte MR, Silva AG, Costa RE, Faria LT. *Bauhinia variegata*: diagnose morfoanatômica e análise comparativa entre exemplares de regiões climáticas distintas. *LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY.* 2007;26(6):837.
44. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science.* 1993 April 9, 1993;260(5105):214-6.
45. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A-K, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research.* 2002;106(9):996-1004.
46. Hawksworth DL. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology.* 2004;50:9-18.
47. Gallo MBC, Pupo MT, Bastos JK, Nunes AS, Cavalcanti BC, Moraes MO, et al. Atividade Citotóxica de Extratos de Fungos Endofíticos Isolados de *Smallanthus sonchifolius*. *Revista Brasileira de Biociências.* [NOTA CIENTÍFICA]. 2007 jul. 2007;5(2):402-4.
48. Saikkonen K, Faeth S, Helander M, Sullivan T. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 1998;29:319-43.
49. Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. *Introductory mycology*: John Wiley and Sons; 1996.
50. Márquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, Roossinck MJ. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science.* 2007;315(5811):513.
51. Carroll G. *Fungal Endophytes in Stems and Leaves: From Latent Pathogen to Mutualistic Symbiont.* *Ecology.* 1988;69(1):2-9.
52. Roossinck MJ. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nat Rev Micro.* [10.1038/nrmicro2491]. 2011;9(2):99-108.
53. Arnold AE. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews.* 2007;21(2-3):51-66.
54. Campos FF, Rosa LH, Cota BB, Caligiorne RB, Rabello ALT, Alves TMA, et al. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2008;2(12):e348.

55. Hussain H., Krohn K., Draeger S., Meier K., B. S. Bioactive Chemical Constituents of a Sterile Endophytic Fungus from *Melilotus dentatus*. *Records of Natural Products*. 2009;3(2):114-7.
56. Strobel GA, Miller RV, Martinez-Miller C, Condrón MM, Teplow DB, Hess WM. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Microbiology*. 1999 August 1, 1999;145(8):1919-26.
57. Li J, Strobel G, Sidhu R, Hess W, Ford EJ. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*. 1996;142(8):2223.
58. Liu K, Ding X, Deng B, Chen W. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009 Sep;36(9):1171-7.
59. Zhang P, Zhou PP, Yu LJ. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Current microbiology*. 2009;59(3):227-32.
60. Zhao K, Sun L, Ma X, Li X, Wang X, Ping W, et al. Improved taxol production in *Nodulisporium sylviforme* derived from inactivated protoplast fusion. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(20):4175-82.
61. Salituro GM, Pelaez F, Zhang BB. Discovery of a Small Molecule Insulin Receptor Activator. *Recent Prog Horm Res*. 2001 January 1, 2001;56(1):107-26.
62. Guo B, Dai J-R, Ng S, Huang Y, Leong C, Ong W, et al. Cytonic Acids A and B: Novel Tridepside Inhibitors of hCMV Protease from the Endophytic Fungus *Cytonaema* Species. *Journal of Natural Products*. 2000;63(5):602-4.
63. Zhou X, Zhu H, Liu L, Lin J, Tang K. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;86(6):1707-17.
64. Tan R, Zou W. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*. 2001;18(4):448-59.
65. Zhang HW, Song YC, Tan RX. Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep*. 2006 Oct;23(5):753-71.
66. Zareba G, Serradell N, Castaner R, Davies SL, Prous J, Mealy N. Phytotherapies for diabetes. *Drugs of the Future*. 2005 Dec;30(12):1253-82.
67. Sousa E, Zanatta L, Seifriz I, Creczynski-Pasa TB, Pizzolatti MG, Szpoganicz B, et al. Hypoglycemic effect and antioxidant potential of kaempferol-3,7-O-(alpha)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* leaves. *J Nat Prod*. 2004 May;67(5):829-32.
68. Volpato GT, Damasceno DC, Rudge MV, Padovani CR, Calderon IM. Effect of *Bauhinia forficata* aqueous extract on the maternal-fetal outcome and oxidative

stress biomarkers of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2008 Feb 28;116(1):131-7.

69. Almeida ER, Guedes MC, Albuquerque JFC, Xavier H. Hypoglycemic effect of *Bauhinia cheilandra* in rats. *Fitoterapia.* 2006;77(4):276-8.

70. Joshi CS, Priya ES, Venkataraman S. Acute and subacute toxicity studies on the polyherbal antidiabetic formulation Diakyur in experimental animal models. *Journal of health science.* 2007;53(2):245-9.

71. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med.* 2002;53:409-35.

72. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocrine Reviews.* 1999 October 1, 1999;20(5):649-88.

73. Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.* 2001;294(5548):1866.

74. Barra GB, Velasco LFR, Pessanha RP, Campos AM, Viana FNM, Dias SMG, et al. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004 Fevereiro 2004;48(1):25-39.

75. Evans RM. The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology. *Mol Endocrinol.* 2005 Jun;19(6):1429-38.

76. King-Jones K, Thummel CS. Nuclear receptors [mdash] a perspective from *Drosophila*. *Nat Rev Genet.* [10.1038/nrg1581]. 2005;6(4):311-23.

77. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Progress in Lipid Research.* 2006;45(2):120-59.

78. Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome proliferator-activated receptor activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor- $\kappa$ B signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(49):32833.

79. Guo Q, Sahoo SP, Wang PR, Milot DP, Ippolito MC, Wu MS, et al. A novel peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha/\gamma$  dual agonist demonstrates favorable effects on lipid homeostasis. *Endocrinology.* 2004 Apr;145(4):1640-8.

80. Chen Q, Chen J, Sun T, Shen J, Shen X, Jiang H. A yeast two-hybrid technology-based system for the discovery of PPAR $\gamma$  agonist and antagonist. *Anal Biochem.* 2004 Dec 15;335(2):253-9.

81. Henry RR, Lincoff AM, Mudaliar S, Rabbia M, Chognot C, Herz M. Effect of the dual peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha/\gamma$  agonist aloglitazar on risk of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes

(SYNCHRONY): a phase II, randomised, dose-ranging study. *The Lancet*. 2009 2009/7/17/;374(9684):126-35.

82. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2006 Dec;58(4):726-41.

83. Volpato G, Damasceno D, Calderon I, Rudge M. Revisão de plantas brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do diabetes mellitus. *Rev Bras Pl Med*. 2002;4:35-45.

84. Negri G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2005;41:121-42.

85. Macedo M, Ferreira A. Plantas hipoglicemiantes utilizadas por comunidades tradicionais na Bacia do Alto Paraguai e Vale do Guaporé, Mato Grosso-Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 14 (Supl 1). 2004:45-7.

86. Pereira VC. Atividade agonista do extrato de *Tabebuia heptaphylla* sobre os receptores proliferadores peroxissomais Alfa (PPAR $\alpha$ ), Beta/Delta (PPAR $\beta$ /d) e Gama (PPAR $\gamma$ ). Pós-Graduação em Ciências da Saúde. 2008;Mestre.

87. Costa M. Extrato de *Bauhinia variegata* sobre a Atividade Transcricional Mediada pelo Receptor dos Proliferadores Peroxissomais-gama (PPAR $\gamma$ ). Brasília: Universidade de Brasília.; 2005.

88. Shen P, Liu MH, Ng TY, Chan YH, Yong EL. Differential effects of isoflavones, from *Astragalus membranaceus* and *Pueraria thomsonii*, on the activation of PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , and adipocyte differentiation in vitro. *J Nutr*. 2006 Apr;136(4):899-905.

89. Bajaj M, Suraamornkul S, Hardies LJ, Glass L, Musi N, DeFronzo RA. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha and PPAR-gamma agonists on glucose and lipid metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2007 Aug;50(8):1723-31.

90. Fiévet C, Fruchart J-C, Staels B. PPAR[alpha] and PPAR[gamma] dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Current Opinion in Pharmacology*. 2006;6(6):606-14.

91. Balakumar P, Rose M, Ganti SS, Krishan P, Singh M. PPAR dual agonists: Are they opening Pandora's Box? *Pharmacological Research*. 2007;56(2):91-8.

92. Nissen SE, Wolski K, Topol EJ. Effect of Muraglitazar on Death and Major Adverse Cardiovascular Events in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2005 November 23/30, 2005;294(20):2581-6.

93. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2000 December 1, 2000;279(6):L1005-L28.
94. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *NATURE-LONDON*. 2000:239-47.
95. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5:S18–S25.
96. Barreiros A, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quimica Nova*. 2006;29(1):113.
97. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Reviews Neuroscience*. 2004;5:S18-S25.
98. Hwang J, Kleinhenz DJ, Lassègue B, Griendling KK, Dikalov S, Hart CM. Peroxisome proliferator-activated receptor- ligands regulate endothelial membrane superoxide production. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2004;288(4):C899.
99. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*. 2004;55:373-99.
100. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Jul-Aug;7(7-8):1040-52.
101. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 January 1, 2005;25(1):29-38.
102. Reddy PH. Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Asthma: Implications for Mitochondria-Targeted Antioxidant Therapeutics. *Pharmaceuticals*. 2011;4(3):429-56.
103. Rhee SG. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science*. 2006 June 30, 2006;312(5782):1882-3.
104. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;28(10):1456-62.
105. Wiernsperger NF. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes & Metabolism*. 2003;29(6):579-85.
106. King GL, Loeken MR. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol*. 2004 Oct;122(4):333-8.
107. Lupi R, Del Guerra S, Mancarella R, Novelli M, Valgimigli L, Pedulli GF, et al. Insulin secretion defects of human type 2 diabetic islets are corrected in vitro by a new reactive oxygen species scavenger. *Diabetes Metab*. 2007 Nov;33(5):340-5.

108. Zunino S. Type 2 diabetes and glycemic response to grapes or grape products. *J Nutr.* 2009 Sep;139(9):1794S-800S.
109. Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E. Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008 Dec;9(4):329-43.
110. Tanaka Y, Gleason CE, Tran POT, Harmon JS, Robertson RP. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999 September 14, 1999;96(19):10857-62.
111. Olson LK, Sharma A, Peshavaria M, Wright CV, Towle HC, Robertson RP, et al. Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 beta cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1995 September 26, 1995;92(20):9127-31.
112. Yuan X, Zhang Z, Gong K, Zhao P, Qin J, Liu N. Inhibition of Reactive Oxygen Species/Extracellular Signal-Regulated Kinases Pathway by Pioglitazone Attenuates Advanced Glycation End Products-Induced Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells in Rats. *Biological & Pharmaceutical Bulletin.* 2011;34(5):618-23.
113. Poynter ME, Daynes RA. Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\alpha$  Activation Modulates Cellular Redox Status, Represses Nuclear Factor- $\kappa$ B Signaling, and Reduces Inflammatory Cytokine Production in Aging. *Journal of Biological Chemistry.* 1998 December 4, 1998;273(49):32833-41.
114. Teissier E, Nohara A, Chinetti G, Paumelle R, Cariou B, Fruchart JC, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  induces NADPH oxidase activity in macrophages, leading to the generation of LDL with PPAR- $\alpha$  activation properties. *Circulation research.* 2004;95(12):1174.
115. Pesant M, Sueur S, Dutartre P, Tallandier M, Grimaldi PA, Rochette L, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  (PPAR $\delta$ ) activation protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced apoptosis. *Cardiovascular Research.* 2006 February 1, 2006;69(2):440-9.
116. Das S, Rosazza JPN. Microbial and Enzymatic Transformations of Flavonoids. *Journal of Natural Products.* 2006;69(3):499-508.
117. Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. *Curr Top Med Chem.* 2001 Dec;1(6):569-90.
118. Reiterer G, Toborek M, Hennig B. Quercetin Protects Against Linoleic Acid-Induced Porcine Endothelial Cell Dysfunction. *The Journal of Nutrition.* 2004 April 1, 2004;134(4):771-5.
119. Nazari M, Ghorbani A, Hekmat-Doost A, Jeddi-Tehrani M, Zand H. Inactivation of Nuclear Factor- $\kappa$ B by citrus flavanone hesperidin contributes to apoptosis

and chemo-sensitizing effect in Ramos cells. *European Journal of Pharmacology*. 2011;650(2-3):526-33.

120. Williams RJ, Spencer JPE, Rice-Evans C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical Biology and Medicine*. 2004;36(7):838-49.

121. da Cunha AM, Menon S, Menon R, Couto AG, Bürger C, Biavatti MW. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. *Phytomedicine*. 2009;In Press, Corrected Proof.

122. Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*. 2007;104(2):466-79.

123. Pietta P-G. Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000;63(7):1035-42.

124. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*. 1998;56(11):317-33.

125. Spencer JPE, Kuhnle GGC, Williams RJ, Rice-Evans C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. *Biochemical Journal*. 2003;372(Pt 1):173.

126. Hodek P, Trefil P, Stiborová M. Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*. 2002;139(1):1-21.

127. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002;13(10):572-84.

128. JACKSON M, KARWOWSKI J, HUMPHREY P, KOHL W, BARLOW G, TANAKA S. Calbistrins, novel antifungal agents produced by *Penicillium restrictum*. *The Journal of Antibiotics*. 1993;46(1):34-8.

129. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. 1958;181(4617):1199-200.

130. Rodrigues T, Santos AC, Pigoso AA, Mingatto FE, Uyemura SA, Curti C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis--potentially implicated mechanisms. *Br J Pharmacol*. 2002 May;136(1):136-42.

131. Georgetti SR, Casagrande R, Moura-de-Carvalho Vicentini FT, Verri JWA, Fonseca MJV. 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*. 2006;64(1):99-106.

132. Chiellini G, Apriletti JW, Yoshihara HA, Baxter JD, Ribeiro RCJ, Scanlan TS. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chemistry & Biology*. 1998;5(6):299-306.
133. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
134. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-[Delta]12,14-Prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR[gamma]. *Cell*. 1995;83(5):803-12.
135. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, et al. Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus by Changes in Lifestyle among Subjects with Impaired Glucose Tolerance. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(18):1343-50.
136. Israili ZH. Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Therapeutics*. 2011;18(2):117.
137. Day C. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabetic Medicine*. 1999;16(3):179-92.
138. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *New England Journal of Medicine*. 2007 Jun 14;356(24):2457-71.
139. Society TE. Statement to providers on the suspension of sales of pioglitazone by regulatory agencies in France and Germany. Maryland. : The Endocrine Society. 2011 Jun 13.
140. Elisabetsky E. Etnofarmacologia. *Ciência e Cultura*. 2003;55:35-6.
141. Buer CS, Imin N, Djordjevic MA. Flavonoids: new roles for old molecules. *Journal of integrative plant biology*. 2010;52(1):98-111.
142. Han R-M, Tian Y-X, Liu Y, Chen C-H, Ai X-C, Zhang J-P, et al. Comparison of Flavonoids and Isoflavonoids as Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(9):3780-5.
143. Shu X-S, Lv J-H, Tao J, Li G-M, Li H-D, Ma N. Antihyperglycemic effects of total flavonoids from *Polygonatum odoratum* in STZ and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;124(3):539-43.
144. Wu ZB, Zhao YY, Yang XW, Liang H. Flavonoids from *Bauhinia glauca* subsp. *pernervosa*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2009 Jun;57(6):628-31.
145. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002 Sep;66(3):447-59, table of contents.

146. Strobel G, Daisy B, Castillo U, Harper J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*. 2004;67(2):257-68.
147. Cannon PF, Simmons CM. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. *Mycologia*. 2002;94(2):210.
148. Faeth SH. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos*. 2002;98(1):25-36.
149. Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 December 1, 2003;67(4):491-502.
150. Hazalin NAMN, Ramasamy K, Lim SM, Wahab IA, Cole ALJ, Majeed A, et al. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2009;9(1):46.
151. Rocha R, Luz DE, Engels C, Pileggi SAV, Jaccoud Filho DS, Matiello RR, et al. Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009;40(1):73-8.
152. Silva RLdO, Luz JS, Silveira EBd, Cavalcante UMT. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Botanica Brasilica*. 2006;20:649-55.
153. Mahapatra S, Banerjee D. Extracellular tannase production by endophytic *Hyalopus* sp. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2009;55(3):255-9.
154. Deshmukh SK, Mishra PD, Kulkarni Almeida A, Verekar S, Sahoo MR, Periyasamy G, et al. Anti Inflammatory and Anticancer Activity of Ergoflavin Isolated from an Endophytic Fungus. *Chemistry & Biodiversity*. 2009;6(5):784-9.
155. Dhingra OD, Sinclair J. Basic plant pathology methods. Lewis Publishers (Boca Raton); 1995.
156. Hölker U, Höfer M, Lenz J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;64(2):175-86.
157. Srinivasan K, Jagadish L, Shenbhagaraman R, Muthumary J. Antioxidant Activity of Endophytic Fungus *Phyllosticta* sp. Isolated from *Guazuma tomentosa*. *Journal of Phytology*. 2010;2(6).
158. Samarth RM, Panwar M, Kumar M, Soni A, Kumar A. Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts. *Food Chemistry*. 2008;106(2):868-73.

159. Pal J, Ganguly S, Tahsin KS, Acharya K. In vitro free radical scavenging activity of wild edible mushroom, *Pleurotus squarrosulus* (Mont.) Singer. *Indian journal of experimental biology*. 2010;48(12):1210.
160. Karaman M, Jovin E, Malbaša R, Matavuly M, Popovi M. Medicinal and edible lignicolous fungi as natural sources of antioxidative and antibacterial agents. *Phytotherapy Research*. 2010.
161. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 2004 May 1, 2004;79(5):727-47.
162. Oliveira FM. Desenvolvimento de formulações tópicas fotoquimioprotetoras contendo extrato de própolis: estudos de estabilidade, permeação e retenção cutânea in vitro e de eficácia in vivo. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2007.
163. Ennajar M, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Abderraba M, Raies A, et al. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of essential oils and various extracts of *Juniperus phoenicea* L.(Cupressacees). *Journal of food science*. 2009;74(7):M364-M71.
164. Liu X, Dong M, Chen X, Jiang M, Lv X, Yan G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chemistry*. 2007;105(2):548-54.
165. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*. 1997;22(5):749-60.
166. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology*. 2002;177(1):91-104.
167. Ohshima H, Yoshie Y, Auriol S, Gilibert I. Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998;25(9):1057-65.
168. Lapidot T, Walker MD, Kanner J. Antioxidant and Prooxidant Effects of Phenolics on Pancreatic  $\beta$ -Cells in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002;50(25):7220-5.
169. Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005;45(2):108-11.
170. Talorete T, Bouaziz M, Sayadi S, Isoda H. Influence of medium type and serum on MTT reduction by flavonoids in the absence of cells. *Cytotechnology*. 2006;52(3):189-98.

171. Amato AA. Investigação da atividade farmacológica de benzilideno-e acridinilideno-tiazolidinedionas e de isoflavonas nos receptores alfa, beta/delta e gama ativados por proliferadores peroxissomais. Brasília: Universidade de Brasília; 2008.
172. Chang F, Jaber LA, Berlie HD, O'Connell MB. Evolution of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Ann Pharmacother*. 2007 Jun;41(6):973-83.
173. Lincoff AM, Wolski K, Nicholls SJ, Nissen SE. Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 2007;298(10):1180.
174. Jones D. Potential remains for PPAR-targeted drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2010;9(9):668-9.
175. Choi JH, Banks AS, Estall JL, Kajimura S, Bostrom P, Laznik D, et al. Anti-diabetic drugs inhibit obesity-linked phosphorylation of PPAR $\gamma$  by Cdk5. *Nature*. [10.1038/nature09291]. 2010;466(7305):451-6.
176. Ding L, Jin D, Chen X. Luteolin enhances insulin sensitivity via activation of PPAR[ $\gamma$ ] transcriptional activity in adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2010;21(10):941-7.
177. Liu L, Shan S, Zhang K, Ning Z-Q, Lu X-P, Cheng Y-Y. Naringenin and hesperetin, two flavonoids derived from *Citrus aurantium* up-regulate transcription of adiponectin. *Phytotherapy Research*. 2008;22(10):1400-3.
178. Nakagawa K, Kishida H, Arai N, Nishiyama T, Mae T. Licorice flavonoids suppress abdominal fat accumulation and increase in blood glucose level in obese diabetic KK-A y mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2004;27(11):1775-8.
179. Wang J-q, Li J, Zou Y-h, Cheng W-m, Lu C, Zhang L, et al. Preventive effects of total flavonoids of *Litsea coreana* leave on hepatic steatosis in rats fed with high fat diet. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;121(1):54-60.
180. Liang Y-C, Tsai S-H, Tsai D-C, Lin-Shiau S-Y, Lin J-K. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-[ $\gamma$ ] by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Letters*. 2001;496(1):12-8.
181. Behling EB, Sedão MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Bianchi LP. Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*. 2004;15(3):285-92.