



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO ACADÊMICO**

DOUGLAS MARTINS DE OLIVEIRA BESSA

**ESTRATÉGIAS DE PRODUÇÃO METABÓLICA E
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Clitoria guianensis***

**Gurupi, TO
2025**

Douglas Martins de Oliveira Bessa

**Estratégias de produção metabólica e aplicação biotecnológica de
fungos endofíticos isolados de *Clitoria guianensis***

Defesa de dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química. Foi avaliada para obtenção do título de Mestre em Química e aprovada em sua forma final pelo orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Dr^a. Vanessa Mara Chapla

**Gurupi, TO
2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- M386e Martins de Oliveira Bessa, Douglas.
Estratégias de produção metabólica e aplicação biotecnológica de fungos endofíticos isolados de *Clitoria guianensis*. / Douglas Martins de Oliveira Bessa. – Gurupi, TO, 2025.
92 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Química, 2025.
Orientadora : Vanessa Mara Chapla
1. Microbiologia. 2. Biotecnologia. 3. Química dos produtos naturais. 4. Metabolômica. I. Título

CDD 540

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Douglas Martins de Oliveira Bessa

Estratégias de produção metabólica e aplicação biotecnológica de fungos endofíticos isolados de *Clitoria guianensis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química. Foi avaliado para a obtenção do título de Mestre em Química e aprovado em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 04/02/2025

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a Vanessa Gisele Pasqualotto Severino, UFG

Prof.^a Dr.^a Melissa Budke Rodrigues, UFT

Prof.^a Dr.^a Vanessa Mara Chapla, UFT

*À Vanda P. de Oliveira e Lucrecia de O.
Bessa.*

“Vocês, humanos, sempre pensam que estão destinados às coisas, à tragédia ou à grandeza. O destino é um mito. O destino é o único mito. Os deuses não escolhem nada. Você escolhe.”

R. F. Kuang. A guerra da Papoula.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho durou mais do que os meses que foram dados para concluir o mestrado, com início ainda na graduação e com a ajuda de diversas pessoas. A princípio o maior de todos os agradecimentos deve ser dado a professora Dr.^a Vanessa M. Chapla, sem a senhora, sem o seu conhecimento e sem seu apoio, jamais seria capaz de concluir tudo isso. Muito obrigado por tudo.

Agradeço a pessoa que partiu e que deixou para mim uma sensaçãoagridoce em todo momento que penso nela, obrigado Vó Vanda. Os anos que pude compartilhar com a senhora foram fundamentais para que eu seja quem sou, sinto saudade de tudo sobre você, o cheiro, a voz, o toque, e acima de tudo, o amor. Quero dedicar esse trabalho a você, muito obrigado, te amarei até o meu último dia. Quero agradecer imensamente a minha mãe, Lucrecia O. Bessa, obrigado por todo apoio, dedicação e amor. Não houve momento na minha vida em que você não esteve presente, ao meu lado, e ajudando em cada etapa da minha vida, amo você. Agradeço a toda minha família, tios, avós, primos, em especial, meu pai, Reginaldo M. Rodrigues.

Agradeço a meus amigos por todo apoio, suporte e ajuda nos momentos difíceis. Além disso, peço desculpas publicamente pelos traumas que causei a Marcela, Hélio, Vitória, Luciana e Antunny. Falando em Marcela, obrigado por ser mais do que apenas uma amiga, você se tornou uma irmã e um apoio.

Quero agradecer a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse projeto, Luana, Kátia, Thainara, Millena, Alice, e a todo o grupo de pesquisa em química dos produtos naturais, muito obrigado. Agradeço também ao INCT-Bionat, Capes, CNPq, PPGQ e UFT, pelo apoio financeiro e estrutural para a realização do trabalho.

RESUMO

A estratégia de cocultivo tem como objetivo mimetizar condições ambientais de interações entre microrganismos, dessa forma, aprimorando a produção de metabólitos de interesse. Este estudo buscou utilizar a técnica de cocultivo entre os fungos endofíticos *Neopestalotiopsis* sp. Cg13, *Fusarium* sp. Cg43 e *Fusarium* sp. Cg45, isolados de *Clitoria guianensis*, planta comum no Cerrado tocantinense, e entre os endófitos e o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, visando analisar como a interação microbiana afeta a obtenção de compostos antimicrobianos e citotóxicos. Por meio da plataforma GNPS2 (*Global Natural Product Social Molecular Networking 2*) elaborou-se uma rede molecular com os dados de espectrometria de massas obtidos dos monocultivos e cocultivos, o que possibilitou a visualização, análise e anotação de compostos. As frações referentes às interações microbianas entre *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 e *Fusarium* sp. Cg45, e, *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 e *S. sclerotiorum* apresentaram maior diversidade química, quando comparados aos demais cocultivos, contudo, os monocultivos *Sclerotinia sclerotiorum*, e, *Fusarium* sp. Cg45 tiveram o perfil mais rico entre todas as frações. Anotou-se 35 compostos em diversos níveis, em que se pode atribuir a classe da maioria dos compostos como lipídios, ademais, determinou-se a estrutura química de 14 metabólitos. O estudo demonstrou que os cocultivos estimularam a produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, sendo que a fração 45xSS apresentou atividade antifúngica contra *S. sclerotiorum*, sugerindo que a interação endófito-patógeno é fundamental para produção de substâncias antagonistas. Nos testes antibacterianos, apenas os cocultivos endófito-endófito mostraram capacidade de inibir o crescimento das bactérias patogênicas *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter baumannii*, sendo as frações 43x45, 13x45 e 13x43. Além disso, nenhuma fração apresentou atividade citotóxica significativa contra as células humanas HaCaT e HCT-116, indicando a ausência de compostos tóxicos relevantes. Por não haver citotoxicidade, o uso dos microrganismos e das frações não geram riscos à saúde humana caso utilizados nos setores agrícola e farmacêutico.

Palavras-chaves: Fungos Endofíticos. Cocultivos. Perfil Metabolômico. *Sclerotinia sclerotiorum*. Interações Microbianas.

ABSTRACT

The co-culture strategy aims to mimic environmental conditions of interactions between microorganisms, thus improving the production of secondary metabolites of interest. This study intends to use the co-culture technique between the endophytic fungi *Neopestalotiopsis* sp. Cg13, *Fusarium* sp. Cg43 and *Fusarium* sp. Cg45, isolated from *Clitoria guianensis*, a common plant in the Cerrado of Tocantins, and between the endophytes and the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*, aiming to analyze how microbial interaction affects the production of antimicrobial and cytotoxic compounds. Using the GNPS2 platform (Global Natural Product Social Molecular Networking 2), a molecular network was created with the mass spectrometry data obtained from the monocultures and co-cultures, enabling the visualization, analysis and annotation of compounds, the fractions related to microbial interactions between *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 and *Fusarium* sp. Cg45, and *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 and *S. sclerotiorum* showed greater chemical diversity when compared to the other cocultures, however, the monocultures *S. sclerotiorum* and *Fusarium* sp. Cg45 had the richest profile among all fractions. A total of 35 compounds were recorded at different levels, in which the class of most compounds could be attributed to lipids, in addition, the chemical structure of 14 metabolites was determined. The study demonstrated that the co-cultures stimulated the production of secondary metabolites with antimicrobial activity, and the 45xSS fraction showed antifungal activity against *S. sclerotiorum*, suggesting that the endophyte-pathogen interaction is essential for the production of antagonistic substances. In the antibacterial tests, only the endophyte-endophyte cocultures showed the ability to inhibit the growth of the pathogenic bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*, with fractions 43x45, 13x45 and 13x43. Furthermore, none of the fractions showed significant cytotoxic activity against human HaCaT and HCT-116 cells, indicating the absence of relevant toxic compounds. Since there is no cytotoxicity, the use of microorganisms and fractions does not pose risks to human health if used in the agricultural and pharmaceutical sectors.

Key-words: Endophytic Fungi. Co-cultures. Metabolomic Profile. *Sclerotinia sclerotiorum*. Microbial Interactions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Abundância de fungos endofíticos pertencentes a diversos filos	23
Figura 2 – Microestruturas de <i>Fusarium</i> sp.	25
Figura 3 – Microestruturas de <i>Neopestalotiopsis</i>	27
Figura 4 – Estruturas químicas dos produtos naturais bioativos produzidos por fungos endofíticos	30
Figura 5 – Fluxograma de trabalho do GNPS	31
Figura 6 – <i>Clitoria guianensis</i> Benth	35
Figura 7 – Fluxograma de trabalho para obtenção das frações	38
Figura 8 – Monocultivos e cocultivos dos fungos endofíticos e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	43
Figura 9 – Rede molecular das frações referentes aos monocultivos e cocultivos*	47
Figura 10 – Diagrama de perturbação das entidades de massas comuns e/ou específicas acumuladas entre os monocultivos e cocultivos em seus diferentes níveis de interação*.....	48
Figura 11 – <i>Cluster</i> com predominância de cocultivos das frações obtidas dos cocultivos <i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cg13 com <i>Fusarium</i> sp. Cg45 (13x45) e <i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cg13 com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (13xSS).....	49
Figura 12 – Diagrama de Venn relacionando as entidades de massas dos monocultivos e cocultivos	50
Figura 13 – Diagrama de Venn relacionando as entidades de massas do monocultivos Cg45 e SS, com as do cocultivo referente, 45xSS	51
Figura 14 - Diagrama de Venn relacionando as entidades de massas do monocultivos com os cocultivos referentes	52
Figura 15 – Estruturas químicas dos compostos anotados	60
Figura 16 – <i>Clusters</i> da rede molecular com compostos anotados	65
Figura 17 – Ensaio antifúngico de poços difusos contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	67
Figura 18 – Ensaio antibacteriano contra <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i>	70
Figura S1 – Comparação entre os cromatogramas do cocultivo 13x45 e os respectivos monocultivos	87
Figura S2 – Comparação entre os cromatogramas do cocultivo 13xSS e os respectivos monocultivos	88
Figura S3 – Comparação entre os cromatogramas do cocultivo 43xSS e os respectivos monocultivos	89
Figura S4 – Comparação entre os cromatogramas do cocultivo 45xSS e os respectivos monocultivos	90
Figura S5 – Comparação entre os cromatogramas do cocultivo 43x45 e os respectivos monocultivos	91
Figura S6 – Ampliação do diagrama de perturbação das entidades de massas	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fungos endofíticos encontrados nos diferentes biomas brasileiros	24
Tabela 2. Compostos produzidos por espécies endofíticas de <i>Fusarium</i> e suas aplicações ...	26
Tabela 3. Compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos	29
Tabela 4. Monocultivos e Cocultivos (fungo-fungo) para produção de novos metabólitos secundários	37
Tabela 5. Massas dos extratos brutos obtidos dos monocultivos e cocultivos	45
Tabela 6. Metabólitos identificados nas frações dos monocultivos e cocultivos	53
Tabela 7. Percentual de inibição do ensaio antifúngico contra <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	67
Tabela 8. Atividade antibacteriana qualitativa das frações	70
Tabela 9. Ensaio de citotoxicidade	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PPGQ	Programa de Pós-Graduação em Química
UFT	Universidade Federal do Tocantins
OSMAC	<i>One Strain Many Compounds</i> – Uma Cepa Diversos Compostos
BDA	Batata, Dextrose e Ágar
LGC/LNBio-CNPENM	Laboratório de Gestão de Compostos/ Laboratório Nacional de Biotecnologia - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
LC	Cromatografia Líquida
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> – Cromatografia Líquida de Ultra Performance
MS	<i>Mass Spectrum</i> - Espectrometria de massas
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> - Espectrometria de massas em tandem
GNPS2	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking 2</i>
AcOEt	Acetato de etila
Met 80%	Metanol 80%
Cg	<i>Clitoria guianensis</i>
SS	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Cg13	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cg13
Cg43	<i>Fusarium</i> sp. Cg43
Cg45	<i>Fusarium</i> sp. Cg45
13x43	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cg13 com <i>Fusarium</i> sp. Cg43
13x45	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cg13 com <i>Fusarium</i> sp. Cg45
43x45	<i>Fusarium</i> sp. Cg45 com <i>Fusarium</i> sp. Cg43
13xSS	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cg13 com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
45xSS	<i>Fusarium</i> sp. Cg45 com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
43xSS	<i>Fusarium</i> sp. Cg43 com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
UPLC-MS/MS	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> – (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplado à Espectrometria de Massas)
COCONUT	<i>Collection of Open Natural Products</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
ChEBI	<i>Chemical Entities of Biological Interest</i>
FoodB	<i>Resource on food constituents</i>
NAtlas	<i>The Natural Products Atlas</i>
CAS	<i>Chemical Abstracts of American Chemical Society</i>
MassIVE	<i>Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment</i>
EMNPD	<i>Endophyte Microorganism Natural Product Database</i>
PFA 3,7%	Paraformaldeído 3,7%
PI	Percentual de inibição
Rc	Raio do crescimento micelial do grupo controle
Re	Raio do crescimento micelial nos tratamentos
BHI	Brain Heart Infusion
DO	Densidade óptica
UFC	Unidade Formadora de Colônia
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
HaCaT	Células queratinócitos humanos, não tumoral
HCT-116	Célula epitelial humana, câncer de cólon
RT	Tempo de retenção
m/z	Relação massa/carga

EC ₅₀	concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo
ID	Identificação
IS	índice de seletividade inicial
HCA	<i>High-Content Analysis</i>
LDV	<i>Low Dead Volume</i>
CDD	<i>Collaborative Drug Discovery</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
Lyso PC	Lisofosfatidilcolina
LPC	Lisofosfatidilcolina
Lyso PE	Lisofosfatidiletanolamina

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
mm	Milímetro
mL	Mililitro
g	Gramas
L	Litro
nm	Nanômetros
μg	Micrograma
xg	Unidades de gravidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1	Fungos	21
3.1.1	Fungos endofíticos	22
3.1.2	Cepas endofíticas de <i>Fusarium</i>	25
3.1.3	Cepas endofíticas de <i>Neopestalotiopsis</i>	26
3.2	Produtos naturais de fungos endofíticos	28
3.2.1	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>	30
3.2.2	Estratégias para aprimorar a produção metabólica microbiana	32
3.3	Cerrado	33
3.3.1	<i>Clitoria guianensis</i> Benth	34
4	METODOLOGIA	36
4.1	Material fúngico e identificação de cepas	36
4.2	Monocultivo e cocultivo (fungo-fungo) dos microrganismos	36
4.3	Extração sólido-líquido dos extratos brutos e fracionamento	37
4.4	Caracterização química das frações de álcool metílico 80%	38
4.5	Construção de redes moleculares e anotação de compostos	39
4.6	Determinação de atividade antifúngica	40
4.7	Determinação da atividade antibacteriana	41
4.8	Avaliação da citotoxicidade	41
5	RESULTADOS E ANÁLISE	43
5.1	Monocultivos e cocultivos e obtenção das frações de álcool metílico 80%	43
5.2	Construção das redes moleculares e caracterização química das frações de álcool metílico 80%	45
5.3	Anotação de compostos	53
5.4	Ensaio antimicrobianos	65

5.5	Ensaio citotóxico	72
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE A – Material suplementar	87

1 INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos são conhecidos por habitarem o interior de tecidos vegetais, como caule, raízes, sementes, folhas, entre outros. Estes são geralmente fungos e bactérias, que não causam danos aparentes às plantas hospedeiras durante parte do seu ciclo de vida, são conhecidos como endófitos. A interação simbiótica que ocorre entre microrganismo e planta hospedeira varia de acordo com as espécies, podendo haver formação de compostos que ajudam no desenvolvimento e sobrevivência da planta. Esses, podem atribuir resistência a fitopatógenos e insetos, aumentar a resistências do hospedeiro a condições físicas e químicas, além de atuarem como fitorreguladores. Por ser uma relação simbiótica, o microrganismo endofítico encontra na planta um habitat, no qual recebe nutrientes e tem menor competição com outros microrganismos (KUMAR *et al.*, 2020; RANA *et al.*, 2019a; SINGH *et al.*, 2024).

Os fungos possuem variedade de aplicações, podendo ser utilizados em diversos setores de interesse humano, como alimentício, farmacêutico e agrícola, dessa forma, fungos endofíticos são uma fonte potencial para obtenção de novas substâncias bioativas de relevância (KUMAR *et al.*, 2020; RANA *et al.*, 2019a; SINGH *et al.*, 2024). Fungos endofíticos são capazes de produzir uma variedade de metabólitos com potencial biotecnológico, por apresentarem diversas atividades biológicas, como, antitumoral, antiviral, antifúngica, e, antibacteriana, como exemplo comum tem-se o uso de fungos para a obtenção de antibióticos, como a penicilina (ARIANTARI *et al.*, 2019; TIWARI; BAE, 2022).

Existem diversos fatores que afetam a produção de metabólitos, sendo o principal, o nicho ecológico em que o microrganismo produtor se encontra, além dos tipos de interações e estresses que sofrem. A pluralidade dos compostos produzidos e de suas respectivas atividades biológicas dependem das condições de crescimento do microrganismo (ARIANTARI *et al.*, 2019; TIWARI; BAE, 2022).

O nicho ecológico ao qual os microrganismos pertencem influencia sua produção metabólica e diversidade química, com isso, ao imitar situações habituais no ciclo de vida dos fungos, torna-se possível a descoberta de novos metabólitos. Os fungos habitam ambientes comunitários, conseqüentemente, interagem com outros fungos, bactérias e insetos, podendo ser uma existência cooperativa ou competitiva. Essas interações suscitam no estímulo de vias metabólicas, e o despertar de genes silenciados, dessa forma, a técnica de cocultivos é aplicada com o intuito de mimetizar as condições ecológicas, e assim, incentivar a produção

de novos metabólitos (GUO; XI; LU, 2024; KNOWLES *et al.*, 2022; XU *et al.*, 2023b; ZHUANG; ZHANG, 2021).

De acordo com dados do Ministério do Meio Ambiente e Mudança do Clima (2024), o Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando aproximadamente de 22% do território brasileiro, e se estende por diversos estados. É o bioma predominante no estado do Tocantins, sendo conhecido por possuir uma grande biodiversidade, considerado a savana mais rica do mundo abrigando cerca de 11.627 espécies de plantas nativas catalogadas, muitas dessas são de uso medicinal e de recuperação de solos degradados. O Cerrado é um dos biomas que mais sofre com as ações humanas, tendo um número significativo de espécies em risco de extinção, mesmo assim, possui poucas áreas com proteção integral. Até o ano de 2022, mais de 100 espécies de fungos endofíticos foram isoladas e identificadas em plantas do cerrado, havendo predominância em espécies dos gêneros *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Trichoderma* e *Penicillium* (ALVES; MORAIS, 2019; BRASIL, 2024; DE MELO; MARTINS, 2020; IBGE, 2019; DOS REIS; DO VALE; LORENZI, 2022).

A *Clitoria guianensis* Benth, popularmente conhecida como vergateza, é uma planta medicinal utilizada para a produção de garrafadas, tônico do sistema nervoso e banhos de purificação, possuindo propriedades diuréticas e purgativas, é oriunda do Cerrado e pertence à subfamília *Faboideae* e família *Fabaceae*. O gênero *Clitoria* possui cerca de 71 espécies com características arbustivas ou herbáceas, trepadeiras etc. As mesmas podem ser encontradas em regiões tropicais ou subtropicais, como no Brasil (DURIGAN, 2018; NEVES *et al.*, 2024; SIBBR, 2020).

Ferraz *et al.*, 2024 isolou os fungos endofíticos de folhas e caule de *C. guianensis*, dentre os isolados obteve-se microrganismos do gênero *Fusarium* e *Neopestalotiopsis*, os endófitos obtidos da planta apresentaram potencial de inibição de fitopatógenos fúngicos como *Fusarium oxysporum*, *Byopolaris aryzae* e *Curvularia lunata*. Bessa (2022) relatou que os fungos endofíticos *Fusarium* sp. Cg43, *Fusarium* sp. Cg45 e *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 isolados de *C. guianensis* apresentaram, em um ensaio antagonista, valores de inibição do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* iguais e/ou superiores a 50%. Por consequência, os respectivos fungos foram escolhidos para a produção de extratos brutos, análise do perfil químico e avaliação de suas atividades biológicas, contudo, os extratos brutos obtidos com acetato de etila não apresentaram percentual significativo na inibição do crescimento do fitopatógeno.

Entre os endófitos relatados, o gênero *Fusarium* destaca-se por ser considerado cosmopolita, e, tendo espécies encontradas na forma de parasitas, endófitos e/ou saprófitas,

conhecidos por produzirem diversos metabólitos com atividades de interesse, como beauvericina e fusaritoamida A (AHMED *et al.*, 2023; IBRAHIM *et al.*, 2018b; TOGHUEO, 2020). O gênero *Neopestalotiopsis* são produtores de compostos de interesse agrícola, como eugenol e fumiquinona B (GRIGOLETTO *et al.*, 2019; TANAPICHATSAKUL *et al.*, 2019).

Ao considerar o potencial biotecnológico de fungos endofíticos presentes em *C. guianensis*, este projeto teve o intuito de produzir extratos brutos e frações das espécies fúngicas e analisar os metabólitos produzidos pelos fungos *Fusarium* sp. Cg43, *Fusarium* sp. Cg45 e *Neopestalotiopsis* sp. Cg13. Além disso, testar uma estratégia de obtenção de extratos e frações em cocultivos para avaliar a produção metabólica dos fungos em condições de consórcio com outros microrganismos, e, avaliar as frações obtidos para determinar seu potencial biotecnológico como antifúngicos, antibacterianos e sua atividade citotóxica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção metabólica dos fungos endofíticos *Fusarium* sp. Cg43, *Fusarium* sp. Cg45 e *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 isolados de *Clitoria guianensis*, aplicando a estratégia de cocultivo para verificar a produção de compostos bioativos com potencial para aplicação biotecnológica.

2.2 Objetivo específico

- Obter extratos brutos e frações dos fungos endofíticos *Neopestalotiopsis* sp. Cg13, *Fusarium* sp. Cg43 e *Fusarium* sp. Cg45;
- Realizar cocultivo entre os endófitos *Neopestalotiopsis* sp. Cg13, *Fusarium* sp. Cg43, *Fusarium* sp. Cg45, e, entre os endófitos e o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*;
- Obter extratos brutos e frações referentes aos cocultivos;
- Obter o perfil químico das frações por técnicas cromatográficas e espectrometria de massa;
- Construir redes moleculares dos espectros de massas obtidos das frações e anotar os compostos produzidos pelos microrganismos;
- Avaliar a atividade antibacteriana das frações frente às bactérias Gram-negativas *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia*;
- Avaliar a atividade antifúngica das frações frente ao *S. sclerotiorum*;
- Avaliar a atividade citotóxica das frações frente a células tumorais e não tumorais.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Fungos

Os fungos são organismos eucarióticos que desempenham papel fundamental na degradação e decomposição de matéria orgânica, podendo ser encontrados em qualquer nicho ecológico existente. Ademais, são importantes para diversos setores de interesse humano, como farmacológico, com ênfase na produção de antibióticos; agrícola, para controle biológico de insetos e pragas; e alimentício, na produção de alimentos e bebidas fermentados (HESHAM *et al.*, 2020; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016). Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e de sequenciamento de DNA de fungos, pode-se estimar a existência de 12 milhões de espécies fúngicas. Dessas, em média apenas 148.000 foram descritas atualmente (WU *et al.*, 2019; ZHOU; MAY, 2023).

O Reino *Fungi* foi definido por volta de 1969, para haver diferenciação entre os demais Reinos, considerava-se que os fungos integravam o Reino *Plantae*, na subdivisão *Thallophyta*, pois, são capazes de utilizar fontes de carbono como alimento. Porém, possuem características próximas ao Reino *Animalia*, como a presença de quitina e flagelo posterior, tornando-se então necessária a divisão dos fungos em um novo Reino (AZEVEDO; BARATA, 2018). O Reino *Fungi* possui categorias denominadas *Filos* que são fundamentadas, sobretudo, em estruturas esporuladoras originadas via sexual. O Reino *Fungi* é dividido em nove *Filos*, sendo eles, *Opisthospordia*, *Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Blastocladiomycota*, *Zoopagomycota*, *Mucoromycota*, *Glomeromycota*, *Basidiomycota* e *Ascomycota* (LI *et al.*, 2021; NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2019).

Em 1928, Alexander Fleming, acidentalmente, descobriu o bioativo conhecido como penicilina produzido a partir da espécie *Penicillium chrysogenum*, que inibia o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Surgindo então o primeiro antibiótico, uma revolução para a época, que salvou milhares de vidas durante a Segunda Guerra Mundial. A indústria farmacêutica utiliza de fungos e de seus diversos metabólitos para a produção de drogas de interesse, como a ciclosporina, um imunossupressor produzido pela espécie *Tolupocladium inflatum* (CHAPLA *et al.*, 2018; DURAND; RAOULT; DUBOURG, 2019).

As enzimas são produtos de relevância industrial, que podem ser obtidas de animais ou vegetais, no entanto, enzimas microbianas apresentam potencial no contexto industrial, devido a facilidade de sua produção em larga escala por processos fermentativos. A

engenharia genética possibilitou a melhora da produção de enzimas por espécies selvagens, fazendo com que houvesse aumento do rendimento de produção. As principais enzimas produzidas por fungos e suas aplicações são amilases (indústria alimentícia), protease (indústria alimentícia, farmacêutica e higiene) e celulase (indústria têxtil) (WÖSTEN, 2019).

No setor agrícola, fungos demonstram enorme potencial como agentes de controle de pragas. Visto que, podem reduzir estas populações, sem causar danos no ambiente, por serem presentes em diversos ecossistemas, além de reduzir ou evitar o uso de produtos químicos. O potencial de biocontrole dos fungos pode ser aplicado em uma diversidade de pragas, como, insetos em qualquer estágio de desenvolvimento, fungos e bactérias fitopatógenos (GRABKA *et al.*, 2022).

O número de espécies fúngicas em risco de extinção está crescendo rapidamente nos últimos anos, a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para Conservação da Natureza é a fonte mais confiável em relação às espécies de plantas e fungos em risco, no entanto, a cobertura em relação às espécies fúngicas é pequena. Existem diversos fatores responsáveis pelos riscos de extinção de espécies, sendo os mais importantes as mudanças climáticas e o desmatamento. Por esses motivos, fungos precisam ser preservados, já que são fundamentais para diversas áreas de interesse humano (MUELLER *et al.*, 2022; NIC LUGHADHA *et al.*, 2020).

3.1.1 Fungos endofíticos

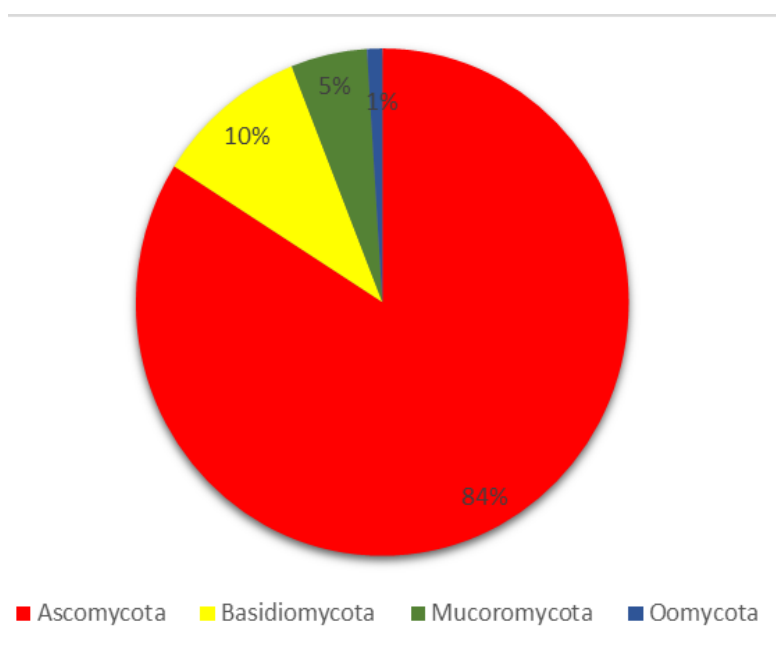
Endófitos são definidos como microrganismos simbiotes que habitam os tecidos vegetais, sem causar dano aparente à planta, sendo associados a diversas partes das plantas, como, sementes, raízes, caule, folhas, flores e frutos. Ao analisar a interação simbiótica entre os microrganismos endofíticos e o hospedeiro, nota-se a formação de produtos naturais que auxiliam no desenvolvimento e sobrevivência da planta. Os quais podem atribuir resistência a fitopatógenos e a insetos, e atuarem como fitorreguladores. Por ser uma relação simbiótica, o microrganismo endofítico encontra no hospedeiro um habitat, no qual recebe nutrientes e tem menor competição com outros microrganismos (KOUR *et al.*, 2023; RANA *et al.*, 2019b; TIWARI; BAE, 2022).

Na relação mutualística entre os endofíticos e a planta hospedeira, é oferecido nutriente e proteção ao fungo, que em troca produz uma diversidade de compostos químicos e produtos biológicos, como alcalóides, ciclohexanos, flavonóides, hidrocarbonetos, quinina, terpenos e enzimas. Esses produtos apresentam variedade de atividades biológicas que

favorecem as plantas, tais quais, antimicrobiana, antioxidante, antiparasitária, além disso, podem favorecer a planta em relação a tolerância a estresses, como variação de pH, mudanças climáticas e presença de compostos tóxicos (ALAM *et al.*, 2021; RANA *et al.*, 2019b; SPORMANN, 2023).

Por serem fungos associados a plantas, os endofíticos, em sua maioria, pertencem ao filo *Ascomycota* (Figura 1), e colonizam plantas em diversos tipos de ambiente, como no Ártico e Antártida, desertos, florestas tropicais, savanas, mangues, ilhas geotermiais e florestas costeiras. Fungos endofíticos compõem uma parcela considerável da biodiversidade fúngica, estimando que haja cerca de 1,5 milhões de espécies de fungos endofíticos a serem descobertas. Os gêneros dominantes entre os fungos endofíticos isolados são *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Piriformospora* (RANA *et al.*, 2019b; SINGH *et al.*, 2024; TIWARI; BAE, 2022).

Figura 1 – Abundância de fungos endofíticos pertencente a diversos filios



Fonte: Adaptado (RANA *et al.*, 2019b).

O Brasil, um país de dimensões continentais, tem grande potencial para explorar a biodiversidade de fungos endofíticos, graças a diversidade de plantas nativas e endêmicas dos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Tabela 1). A importância de exploração da biodiversidade fúngica desses ambientes dá-se pela ameaça que sofrem, além disso, por causa da produção metabólica desses microrganismos, o que pode

proporcionar a descoberta de novos compostos bioativos de interesse (ALVES; MORAIS, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2021).

Tabela 1. Fungos endofíticos encontrados nos diferentes biomas brasileiros

Bioma	Espécie vegetal	Fungos endofíticos	Referência
Amazônia	<i>Kalanchoe pinnata</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	(SOUZA <i>et al.</i> , 2018)
Cerrado	<i>Solanum lycocarpum</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	(TORRES <i>et al.</i> , 2022)
Mata Atlântica	<i>Aechmea</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.	(GOMES; FORTUNA, 2020)
Pantanal	<i>Lafoensia pacari</i>	<i>Phyllosticta</i> sp.	(AMORIM, 2018)
Caatinga	<i>Bauhinia forficata</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	(CHAGA; RODRIGUES; SILVA, 2023)
Caatinga	<i>Myracrodruon urundeuva</i>	<i>Rhinocladiella similis</i>	(DE PÁDUA <i>et al.</i> , 2022)
Cerrado	<i>Campomanesia adamantium</i>	<i>Neofusicoccum kwambonambiense</i>	(RICCI <i>et al.</i> , 2024)

Fonte: Autor, 2024.

O uso de plantas para fins terapêuticos é um costume ancestral e eficaz. Existe interesse em estudar os microrganismos endofíticos associados a plantas medicinais, principalmente por esses terem a capacidade de sintetizar compostos que possuem atividade terapêutica. Assim, os fungos podem sintetizar novas drogas com potencial farmacológico. Um exemplo frequente é o taxol, um agente anticancerígeno, também produzido pela planta *Taxus baccata*, e sintetizado por seus endófitos, como a *Alternaria alternata* (ADELEKE; BABALOLA, 2021; SINGH *et al.*, 2024).

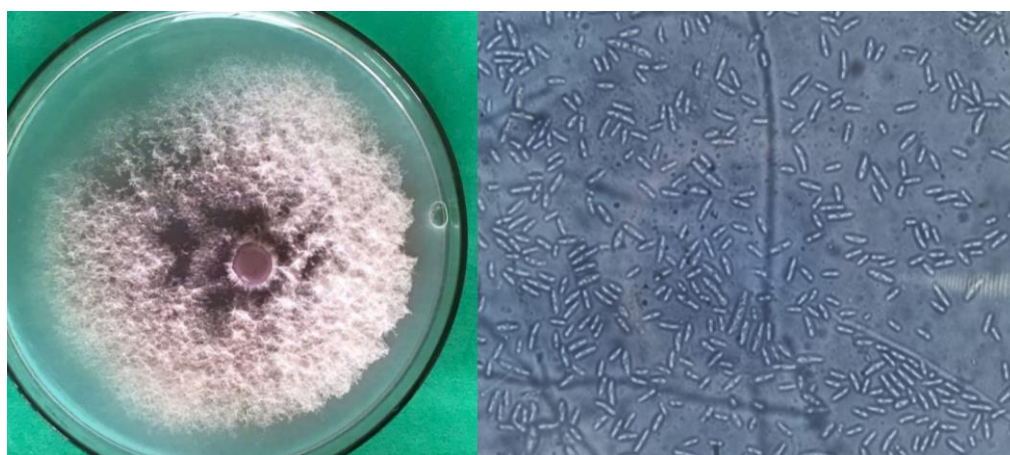
A busca por alternativas que possam substituir produtos químicos sintéticos usados na agroindústria é fomentada pela necessidade de encontrar produtos que sejam sustentáveis e economicamente viáveis, por essa razão, fungos endofíticos possuem potencial para desempenhar alguns papéis na agricultura. Esses são capazes de auxiliar no crescimento das plantas, induzir resistência a estresses externos e agir como agente de controle biológico contra fitopatógenos, insetos e pragas. Além disso, produzem compostos bioativos com

atividades biológicas que podem ser introduzidas no setor agrícola (GRABKA *et al.*, 2022; LATZ *et al.*, 2018; RANA *et al.*, 2019b; RIBEIRO *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2024).

3.1.2 Cepas endofíticas de *Fusarium*

O gênero *Fusarium* (Figura 2) é conhecido por possuir uma variedade de características morfológicas, fisiológicas e ecológicas, sendo um ascomiceto filamentoso e produtor de esporos. É possível encontrar espécies de *Fusarium* como parasitas, endófitos ou saprófitos. Ressalva-se que o gênero, normalmente, é relacionado a espécies responsáveis por causar destruição em diversos tipos de cultivares de importância social e econômica (AHMED *et al.*, 2023; KUMAR *et al.*, 2020; SAMIKSHA; KUMAR, 2021).

Figura 2 – Microestruturas de *Fusarium* sp.



Fonte: Autor, 2024

Fusarium está presente em quase todas as regiões do planeta, sendo definido, como cosmopolita. Em relação às características morfológicas, há formação de colônias que podem apresentar pigmentos variando entre colorações brancas, róseas e marrom, além disso, pode-se notar a formação de conidióforos e conídios. A característica morfológica mais comum entre espécies de *Fusarium* é o formato de seus conídios, muitas vezes comparados com um bote ou banana (SAMIKSHA; KUMAR, 2021).

Entre os fungos endofíticos, o *Fusarium* é um dos gêneros mais descritos, havendo cerca de 70 espécies relatadas. Possuindo capacidade de crescimento em uma variedade de substratos, além de uma divergência genética. O gênero apresenta vários tipos de atividades biológicas e habilidade de produção de compostos quimicamente diversos (AHMED *et al.*, 2023; TOGHUEO, 2020).

Normalmente as espécies de *Fusarium* são associadas a doenças, por isso, sabe-se da capacidade de produção de muitas micotoxinas que impactam as plantações e que podem causar podridões, esmorecimento e perda. Além disso, algumas dessas toxinas ao atingirem alimentos como cereais e grãos podem comprometer a segurança do alimento (SAMIKSHA; KUMAR, 2021). Contudo, os endófitos desse gênero apresentam metabólitos com atividades biológicas vantajosas, como a atividade antimicrobiana, antiviral, anticancerígena, antioxidante e antiparasitária (Tabela 2) (AHMED *et al.*, 2023).

Tabela 2. Compostos produzidos por espécies endofíticas de *Fusarium* e suas aplicações

Composto	Espécie fúngica	Planta hospedeira	Aplicação
Taxol	<i>F. oxysporum</i>	<i>Taxus media</i>	Antitumoral
Rohitukine	<i>F. solani</i> ; <i>F. oxysporum</i>	<i>Dysoxylum</i> <i>binetariferum</i>	Antitumoral
Quinina	<i>F. incarnatum</i>	<i>Cinchona calisaya</i>	Antimalárica e analgésico
Fusarítioamida A	<i>F. chlamydosporium</i>	<i>Anvillea garcinii</i>	Antibacteriano
Fusarítioamida B	<i>F. chlamydosporium</i>	<i>A. garcinii</i>	Antifúngico
Esclerotiamida B	<i>F. sambucinum</i>	<i>Nicoatiana tabacum</i>	Inseticida

Fonte: Adaptado (AHMED *et al.*, 2023; IBRAHIM *et al.*, 2018b; TOGHUEO, 2020).

Técnicas de metagenômica mostram a possibilidade de descoberta de novas espécies de fungos endofíticos do gênero *Fusarium*, e, com isso, a chance de novos metabólitos serem relatados. Os compostos isolados do gênero, em sua maioria, apresentam atividades biológicas multidimensionais, além de que, um único composto pode apresentar mais do que uma aplicação. As classes químicas de metabólitos produzidos por *Fusarium* são, predominantemente, esteróis, policetídeos, alcalóides, terpenos e peptídeos (AHMED *et al.*, 2023).

3.1.3 Cepas endofíticas de *Neopestalotiopsis*

Em 2014, Maharachchikumbura *et al.* examinou o gênero *Pestalotiopsis* a nível morfológico e molecular, assim, descrevendo dois novos gêneros, *Neopestalotiopsis* e *Pseudopestalotiopsis*. O gênero *Neopestalotiopsis* (Figura 3) tem como principal diferença

morfológica do *Pestalotiopsis* células medianas versicoloridas e conidióforos indistintos (MAHARACHCHIKUMBURA *et al.*, 2014; SENANAYAKE, 2020; YANG *et al.*, 2021).

Figura 3 – Microestruturas do fungo *Neopestalotiopsis* sp.



Fonte: Autor, 2024.

Podem ser encontrados na forma de endofíticos, patógenos ou sapróbios, sendo que na forma de fitopatógeno apresentam a capacidade de causar ferrugem no caule da planta, apodrecimento dos frutos e murchar as flores e folhas. *N. rosae* foi descrito como responsável por causar morte e queima do caule de mirtilos no Peru. A maioria das espécies de *Neopestalotiopsis* são encontradas na Ásia (RODRÍGUEZ-GÁLVEZ *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2021).

Como endófitos, normalmente, habitam o interior de folhas das plantas hospedeiras. Nas folhas de *Cinnamomum loureiroi* isolou-se uma espécie de *Neopestalotiopsis* sp. MFLUCC15-1130, as análises realizadas no trabalho apresentaram que o extrato bruto proveniente do fungo teve alta atividade antioxidante, proveniente do elevado teor de eugenol presente no extrato (TANAPICHATSAKUL *et al.*, 2019). Os *Neopestalotiopsis* sp. isolados da planta *Begonia fischeri* possuem a capacidade de produzir compostos com atividade antifúngica frente ao patógeno *Diaporthe phaseolorum*, o composto com esse potencial foi identificado como fumiquinona B (GRIGOLETTO *et al.*, 2019).

A espécie *N. piceana* isolada do abacaxi (*Ananus comosus*) mostrou potencial como produtor de compostos bioativos presentes no extrato bruto de acetato de etila, esse apresentou atividade antimicrobiana frente o crescimento de *Staphylococcus aureus*. O estudo mostrou que o tipo do meio de cultura e o solvente utilizado para extração afetaram os metabólitos produzidos pelos fungos (BHATTACHARYA *et al.*, 2019).

3.2 Produtos naturais de fungos endofíticos

Por causa da relação simbiótica entre fungo endofítico e planta hospedeira, sabe-se que os microrganismos endofíticos são uma fonte vasta de compostos bioativos, existindo cerca de 20 mil substâncias descritas, várias dessas substâncias apresentam atividades biológicas, como antibiótica, antiparasitária, antifúngica, antitumoral e outras. A teoria ecológica explica que a produção de metabólitos está relacionada com o nicho ecológico em que o microrganismo se encontra e as interações biótica e abiótica (ALAM *et al.*, 2021; RANA *et al.*, 2019a; SINGH *et al.*, 2024; TIWARI; BAE, 2022).

A relação de simbiose microrganismo-planta faz com que os endófitos sejam capazes de sintetizar compostos originários da planta hospedeira. O fármaco anticancerígeno paclitaxel (Figura 4 A) é um exemplo clássico, produzido pela planta *Taxus brevifolia* e pelo fungo endofítico isolado da mesma, *Taxomyces andreanae*. Enfatiza-se que a planta produz o paclitaxel em pequenas quantidades, e o uso do microrganismo como produtor do composto pode possibilitar uma produção em larga escala do fármaco (ALAM *et al.*, 2021; NAIK *et al.*, 2019; TIWARI; BAE, 2022).

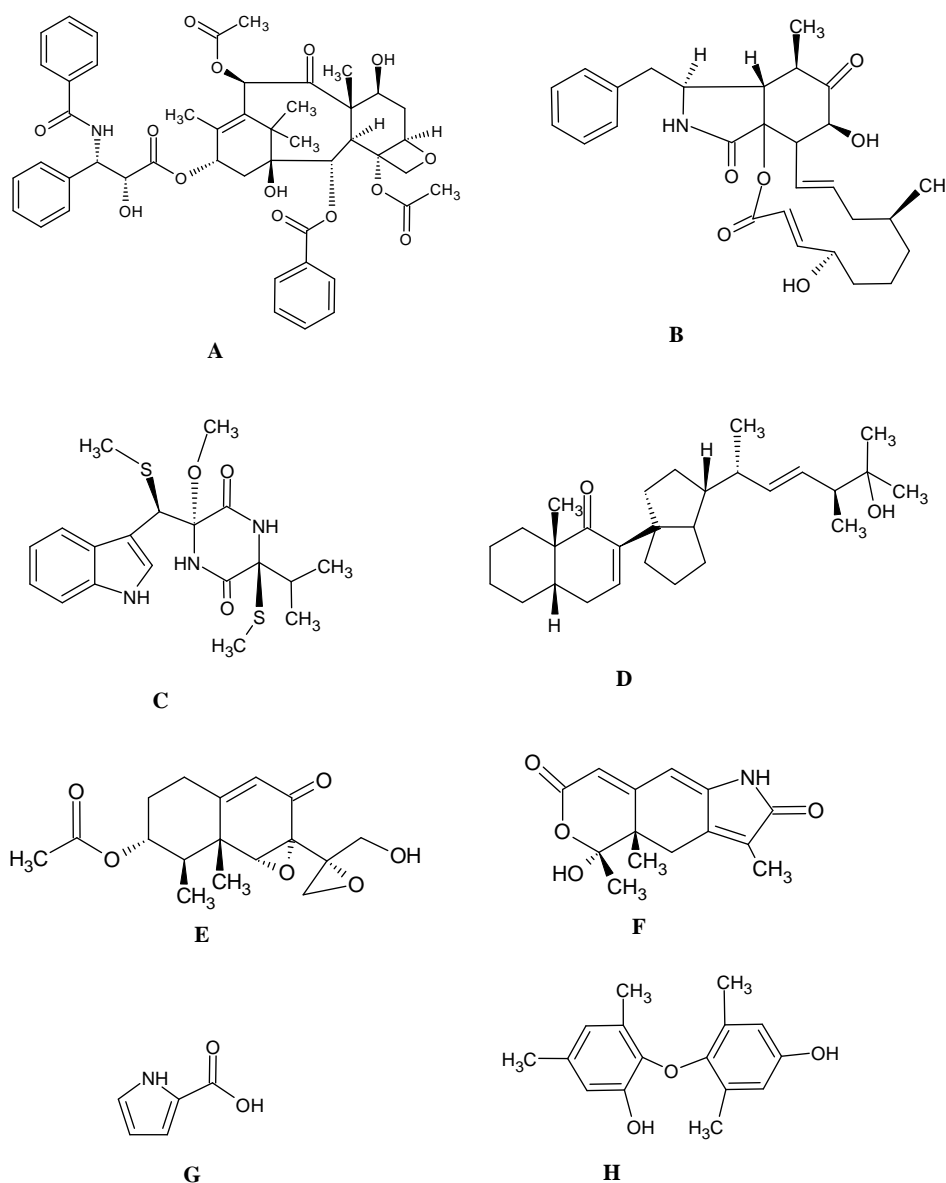
Os fungos endofíticos ocupam um mesmo habitat que diversos organismos, havendo então competição por espaço e nutrientes, por esse motivo, eles desenvolveram estratégias que possibilitam sua sobrevivência. A principal estratégia é a produção de metabólitos, com diversos tipos de atividades, sendo esses, capazes de inibir o crescimento dos competidores, eliminar efeitos tóxicos e auxiliar no desenvolvimento e proteção da planta hospedeira (fortalecendo a relação simbiótica) (Tabela 3, Figura 4). As principais classes de metabólitos produzidos pelos endófitos são os terpenóides, alcaloides e compostos fenólicos (ALAM *et al.*, 2021; NAIK *et al.*, 2019; TIWARI; BAE, 2022).

Tabela 3. Compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos

Fungo endofítico	Planta hospedeira	Composto bioativo	Atividade biológica	Referência
<i>Colletotrichum crassipes</i>	<i>Casearia sylvestris</i>	Citocalasina B (B)	Antioxidante	(CHAPLA <i>et al.</i> , 2018)
<i>Phaeosphaeria fuckelii</i>	<i>Phlomis umbrosa</i>	Feosfaona D (C)	Inibição de tirosinase	(ZHAI <i>et al.</i> , 2020)
<i>Talaromyces</i> sp.	<i>Kandelia</i> sp.	Ciclossecosteroide A (D)	Inibição da enzima AChE	(LI <i>et al.</i> , 2022)
<i>Boeremia exigua</i>	<i>Fritillaria hupehensis</i>	Boemialane D (E)	Inibição de óxido nítrico	(AI <i>et al.</i> , 2022)
<i>Rhizopycnis vagum</i>	<i>N. tabacum</i>	Rizoperemofilano N (F)	Citotoxicidade contra células tumorais	(WANG <i>et al.</i> , 2020a)
<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Artemisia argyi</i>	2-Minalina (G)	Antifúngico	(GU <i>et al.</i> , 2022)
<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Pulicaria crispa</i>	Aspergiléter B (H)	Antifúngico e antibacteriano	(MOHAMED; IBRAHIM; ASFOUR, 2020)

Fonte: Autor, 2024.

Figura 4 – Estrutura química dos produtos naturais bioativos produzidos por fungos endofíticos



Fonte: Autor, 2024.

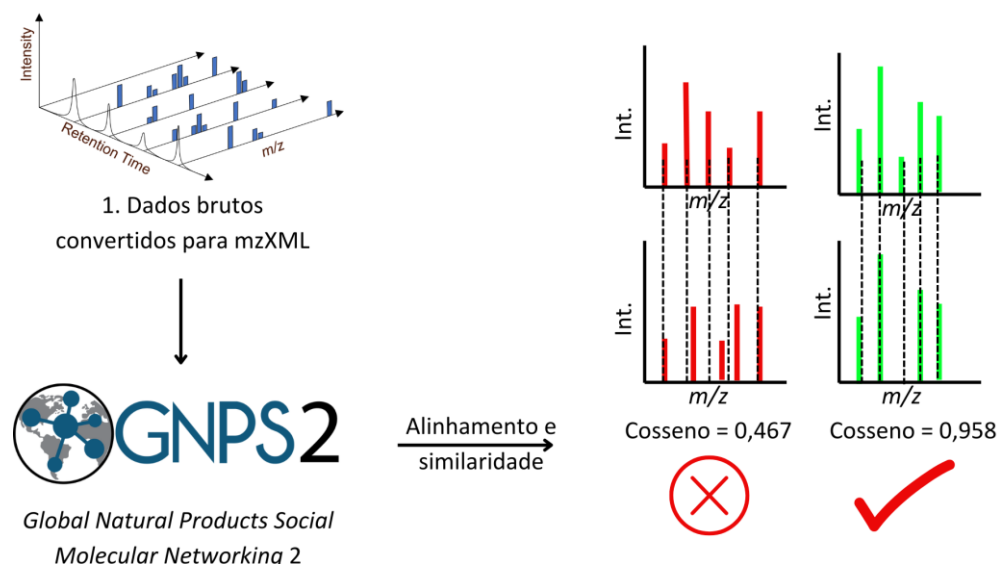
3.2.1 Global Natural Products Social Molecular Networking

A espectrometria de massas é uma técnica utilizada para análise e identificação de produtos naturais. O uso de plataformas e softwares para análise desses dados auxiliam na identificação e descoberta de metabólitos através da espectrometria de massas, construção de redes moleculares e pesquisa em bibliotecas espectrais. Com isso, é apresentada a plataforma online *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), descrita como um ecossistema de espectrometria de massas baseado na web, tendo como objetivo desenvolver

uma plataforma com livre acesso para compartilhamento de informações de espectrometria de massas tandem (MS/MS) brutos (WANG, 2022).

A plataforma online GNPS examina informações de conjuntos de dados de espectrometria de massas por meio de íons fragmentados (figura 5), os espectros gerados nas redes moleculares da plataforma são denominados nós ou *nodos*. Os espectros obtidos são submetidos aos algoritmos do GNPS que realizam a classificação de acordo com a similaridade entre espectros das amostras analisadas e, os espectros existentes nas bibliotecas espectrais, para tal é avaliado o valor de cosseno entre esses dados. Ainda que os espectros analisados não tenham compatibilidade com algum composto, há detecção de espectros estruturalmente similares (PILON *et al.*, 2021; WANG, 2022; WANG *et al.*, 2016).

Figura 5 – Fluxograma de trabalho do GNPS



Fonte: Autor, 2025.

O conceito de redes moleculares abrange o estudo de dados complexos, podendo ser utilizados em âmbito interdisciplinar. Wang (2022) descreve as redes moleculares como visualizações do espaço químico apresentadas por espectros de massas, atuando ao agrupar conjuntos de espectros de moléculas que apresentam alguma similaridade, sendo denominadas famílias moleculares.

3.2.2 Estratégias para aprimorar a produção metabólica microbiana

Cepas de microrganismos, principalmente fúngicas, possuem crescimento favorável em condições simples de cultura, ocasionando o silenciamento de *clusters* de genes biossintéticos, com isso, a produção de metabólitos torna-se limitada quando se utiliza meios de cultivo axênico. Os microrganismos, no geral, tendem a produzir metabólitos de interesse quando estão expostos a fatores de estresse, devido a isso, algumas estratégias de produção metabólica mimetizam condições estressantes para o microrganismo, como mudança de temperatura, pH, meios de cultura enriquecidos e cultivo com outros microrganismos (WANG *et al.*, 2020b; XU *et al.*, 2023b).

A diversidade de metabólitos produzidos por fungos endofíticos pode ser explicada principalmente por causa de fatores genéticos, para isso é preciso verificar a expressão gênica, não apenas do endófito, mas também da planta hospedeira, para conseguir analisar a interação entre os dois organismos simbióticos. Essas expressões de genes são responsáveis por codificar os metabólitos, contudo diversos *clusters* de genes precisam de algum tipo de estímulo para que seja possível a produção de determinadas substâncias (ALAM *et al.*, 2021; FERREIRA; CRUZ; HAMERSKI, 2022; NAIK *et al.*, 2019; TIWARI; BAE, 2022).

A estratégia OSMAC (do inglês, *One Strain Many Compounds* – Uma Cepa Diversos Compostos), é um método simples e viável que possibilita a descoberta de inúmeras substâncias microbianas, levando em consideração o fato de que diversos *clusters* de genes para a biossíntese de metabólitos estão silenciados. A estratégia busca diversificar as formas de cultivos dos microrganismos, cocultivos com outras espécies e adição de compostos diferentes no meio de cultura, para assim, ativar esses *clusters* de genes silenciados e induzir a produção de novos metabólitos (FERREIRA; CRUZ; HAMERSKI, 2022; P. ARIANTARI *et al.*, 2019; XU *et al.*, 2023b).

Na natureza, os microrganismos vivem em ambientes comunitários com outros microrganismos, havendo então formas de interações distintas entre comunidades microbianas, que podem ser caracterizadas como cooperativas ou competitivas. Para simular o consórcio microbiano e, incentivar a produção de metabólitos, aplica-se o método de cocultivos, esses podem ser realizados entre fungo-fungo, fungo-bactéria e bactéria-bactéria (GUO; XI; LU, 2024).

Os consórcios microbianos apresentam efeitos diferentes conforme o tipo de interação. Em sistemas cooperativos, os microrganismos do meio coexistem em harmonia, além de auxiliarem na sobrevivência um do outro, como ao aumentar a capacidade antibiótica

e de aquisição de nutrientes. Essa interação contribui para produção de compostos bioativos, considerando-se que uma cepa pode produzir algum produto necessário para ativar o *cluster* de gene silenciado de outra cepa, conseqüentemente, estimulando a produção metabólica (GUO; XI; LU, 2024; KNOWLES *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2020b).

O outro sistema de consórcio microbiano é o competitivo, essa interação pode acontecer de maneira exploratória ou de interferência. Na competição exploratória um dos microrganismos absorve maiores concentrações de nutrientes e espaço do meio, impedindo o acesso da outra cepa a condições semelhantes. Já a competição por interferência atua com o antagonismo, um conhecido método de interação que pode apresentar mecanismos de ação como antibiose, micoparasitismo e competição, prejudicando a sobrevivência do outro organismo (ADELEKE *et al.*, 2022; FONTANA *et al.*, 2021; GUO; XI; LU, 2024).

Um estudo relatou que o cocultivo entre o fungo *Trichoderma atroviride* SG304 e *Bacillus subtilis* 22 aprimorou a produção de compostos com atividade antifúngica frente a *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* e *F. graminearum*. Do cocultivo, obteve-se 22 metabólitos a mais do que os monocultivos, entre eles, mevastatina um agente antifúngico eficaz (LI *et al.*, 2020).

O cocultivo entre os fungos *Aspergillus nidulans* e *A. fumigatus* relatou aumento da produção de éteres difenólicos com atividade antibacteriana, o método proporcionou ativação de genes de biossíntese de sideróforos em *A. fumigatus* e de genes de biossíntese de policetídeos em *A. nidulans*. Os compostos diorcinol e cordiol C, produzidos no cocultivo inibiram o desenvolvimento de *B. subtilis*, enquanto os violaceóis I e II inibiram *Escherichia coli* (NINOMIYA; URAYAMA; HAGIWARA, 2022).

3.3 Cerrado

O Cerrado é um bioma presente em quase todas as regiões do Brasil, considerado o segundo maior bioma da América do Sul e ocupa cerca de 23,3% do território nacional, correspondendo a uma área de 1.983.017 km². Nele há presença de três das maiores bacias hidrográficas do América do Sul, sendo elas, Amazônia/Tocantins, Prata e São Francisco, o bioma é considerado um *hotspot* mundial de biodiversidade (BRASIL, 2024; PMABB, 2022).

É reconhecido como uma das savanas mais ricas do mundo, que abriga inúmeras espécies de plantas nativas, muitas dessas estão ameaçadas de extinção. Existem diversas aplicações para as plantas encontradas no Cerrado, a maioria usada para fins medicinais, recuperação de solos, barreiras contra o vento e criação de habitat. Possui, também, diversas

plantas que produzem frutos comestíveis como o pequi (*Caryocar brasiliense*) e o buriti (*Mauritia flexuosa*) (BRASIL, 2024; PMABB, 2022).

O Cerrado é um dos *hotspots* mundiais que possui a menor quantidade de áreas protegidas integralmente. Por causa da grande quantidade de danos ambientais causados pelo desmatamento do Cerrado, há ocorrência de diversas transformações ambientais de grande impacto, como o caso da fragmentação de habitat, extinção da biodiversidade, degradação de ecossistemas, poluição de aquíferos e outros. Durante a década de 1970, por causa do aumento da produção de grãos, ocorreu uma intensificação da ocupação do bioma, consequentemente, gerando elevação nas taxas de desmatamento no Cerrado, sendo até mesmo, superiores às taxas de desmatamento da floresta Amazônica (BRASIL, 2024; OLIVEIRA *et al.*, 2020; PMABB, 2022).

Por causa da imensa quantidade de espécies de plantas presentes no Cerrado há possibilidade de descoberta de novos fungos endofíticos. Em pesquisa realizada por Noriler *et al.*, (2018) identificou-se duas possíveis novas espécies de fungos endofíticos isoladas das folhas de *Stryphnodendron adstringens*, sendo essas dos gêneros *Diaporthe* sp. e *Phaeophleospora* sp. Os endófitos isolados apresentaram atividades biológicas contra patógenos agrícolas como o *Phyllosticta citricarpa* (BRAGA; DO PRADO, 2020).

3.3.1 *Clitoria guianensis*

A *Clitoria guianensis* Benth (Figura 6) é uma planta originária do Cerrado, pertencendo à família Fabaceae, conhecida popularmente como vergateza. Em relação à sua distribuição geográfica, houve ocorrências confirmadas da *C. guianensis* em todas as cinco regiões brasileiras. Na cultura popular é uma planta usada para fins medicinais, para preparo de garrafadas, tônico do sistema nervoso, possuindo propriedades diuréticas e purgativas (DURIGAN, 2018; NEVES *et al.*, 2024; SIBBR, 2020).

As espécies do gênero *Clitoria* possuem características arbustivas, herbáceas ou trepadores, são encontradas em regiões tropicais ou subtropicais, além disso, apresentam folhas penadas, imparipenadas com um a nove folíolos estipelados, normalmente são trifolioladas. Possuem flores em colorações brancas, róseas, vermelhas ou azuis, que podem ser utilizadas como corantes (DURIGAN, 2018; NEVES *et al.*, 2024; QUEIROZ; BARRETO, 2020).

Figura 6 – *Clitoria guianensis* Benth

Fonte: (SCHMITZ, 2017).

No estudo fitoquímico do extrato da *C. guianensis* feito por Cunha *et al.* (2020), realizou-se testes toxicológicos com *Artemia salina*, resultando em toxicidade elevada. A dose letal média do extrato bruto etanol, hexano e frações de acetato de etila foram de 23,44; 41,16 e 8,53 mg/L, respectivamente, o que indica a presença de compostos bioativos. No estudo foi isolado um novo isoflavonoide nomeado pratensein-7-O- β -rutinosídeo e sete compostos conhecidos. O grupo de pesquisa em química dos microrganismos da Universidade Federal do Tocantins, é o único que realiza estudos relacionados aos fungos endofíticos desta planta.

4 METODOLOGIA

4.1 Material fúngico e identificação de cepas

Adquiriu-se as cepas dos fungos endofíticos isolados de *Clitoria guianensis* do Laboratório de Reatividade dos Compostos Orgânicos da Universidade Federal do Tocantins – Campus Gurupi (FERRAZ *et al.*, 2024). Os endófitos *Fusarium* sp. Cg43, *Fusarium* sp. Cg45 foram identificados por características morfológicas macroscópicas e microscópicas. Realizou-se a identificação da cepa *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 por técnicas de sequenciamento genético (FERRAZ *et al.*, 2024). O fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum* foi cedido pelo professor Dr. Geraldo Humberto Silva da Universidade Federal de Viçosa.

4.2 Monocultivo e cocultivos (fungo-fungo) dos microrganismos

Incubou-se as cepas fúngicas, isoladamente, em meio de cultura BDA (Batata 200 g, Dextrose 20 g, Ágar 20 g e Água destilada 1 L), por um período de 7 a 10 dias, a temperatura ambiente, para realização dos cultivos. Como forma de estimular a produção de novos metabólitos que possuam atividades biológicas de interesse, utilizou-se a técnica de cocultivo em estado de fermentação sólido, com placas de Petri contendo meio de cultura BDA (XU *et al.*, 2023b).

Realizou-se os cocultivos entre os fungos endofíticos, e, entre os endófitos e o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, seguindo a ordem apresentada na tabela 4. Um disco micelial foi disposto em um lado da placa de Petri com meio de cultivo BDA, e outro disco foi colocado no lado oposto, equidistante. Como forma de controle os fungos endofíticos e o fitopatógeno foram cultivados em monoculturas. Os cocultivos e monocultivos foram realizados utilizando 15 placas de Petri com meio BDA, fez-se a incubação dos microrganismos por um período de 15 dias a 28°C.

Tabela 4. Monocultivo e Cocultivos (fungo-fungo) para produção de novos metabólitos secundários

Cultivos	Sigla
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cg13	Cg13
<i>Fusarium</i> sp. Cg43	Cg43
<i>Fusarium</i> sp. Cg45	Cg45
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	SS
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cg13 com <i>Fusarium</i> sp. Cg43	13x43
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cg13 com <i>Fusarium</i> sp. Cg45	13x45
<i>Fusarium</i> sp. Cg45 com <i>Fusarium</i> sp. Cg43	45x43
<i>Fusarium</i> sp. Cg43 com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	43xSS
<i>Fusarium</i> sp. Cg45 com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	45xSS
<i>Neopestalotiopsis</i> sp. Cg13 com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	13xSS

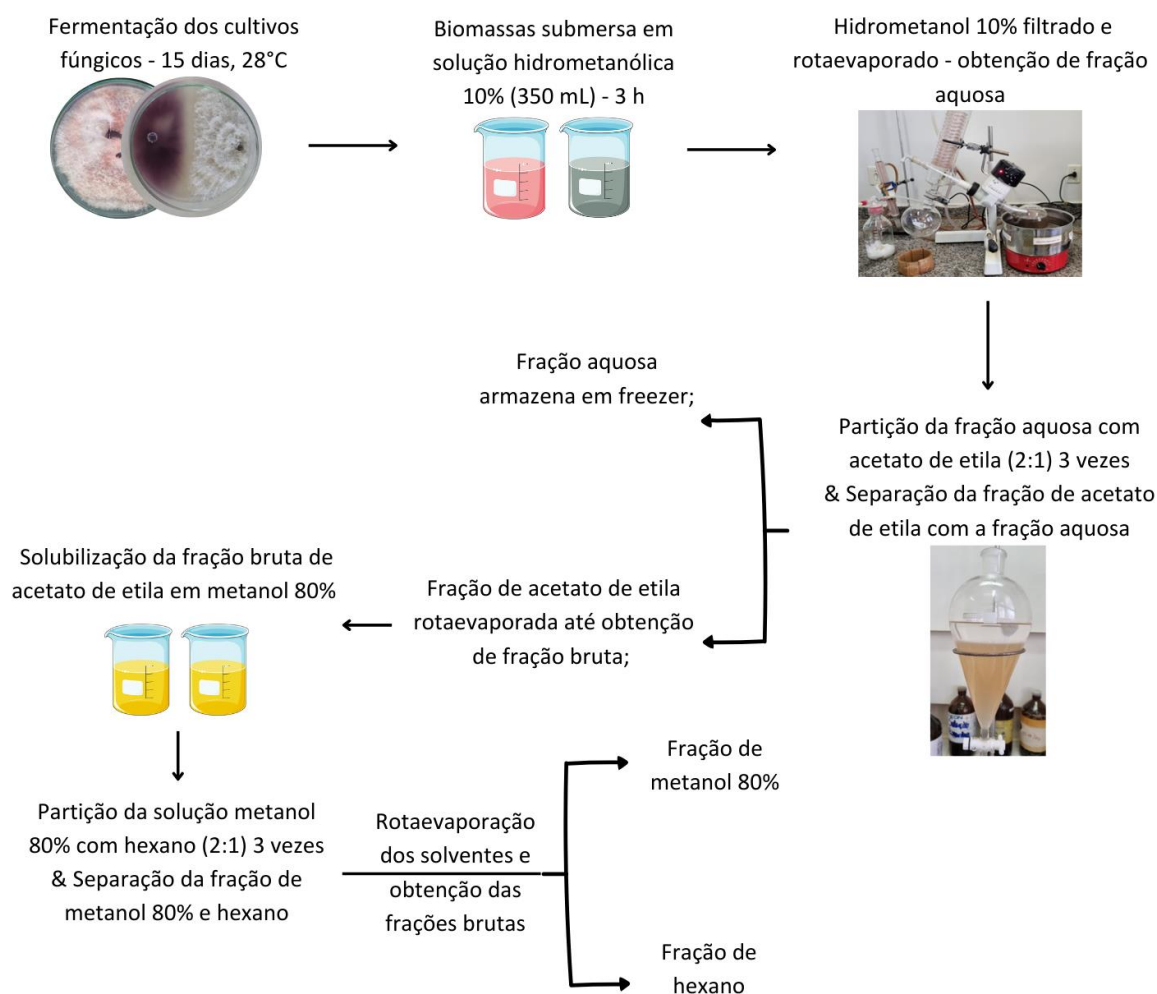
Fonte: Autor, 2024.

4.3 Extração sólido-líquido dos extratos brutos e fracionamento

Os extratos brutos das culturas sólidas foram obtidos após o período de fermentação de 15 dias das monoculturas e dos cocultivos. Passado o período de incubação, transferiu-se a biomassa para um béquer onde foi adicionado solução hidrometanólica 10% até a biomassa ficar submersa (350 mL), onde permaneceu por um período de 3 horas para a extração dos componentes. Posteriormente, a solução obtida foi filtrada e o solvente removido em rotaevaporador para a obtenção do extrato hidrometanólico.

Após, o extrato hidrometanólico foi extraído com acetato de etila (3 x 100 mL) e o solvente removido em rotaevaporador. A fração de acetato de etila resultante foi solubilizada com álcool metílico 80% (10 mL), e após foi realizada a partição líquido/líquido com hexano por 3 vezes (3 x 5 mL). Os solventes foram removidos em rotaevaporador, obtendo-se então as frações de metanol 80% e hexano. Um extrato e fracionamento com apenas a biomassa do meio de cultura BDA, sem adição de microrganismos, foi feita para comparação do perfil químico como controle. O fluxograma de trabalho pode ser observado na figura 7.

Figura 7 – Fluxograma de trabalho para obtenção das frações



Fonte: Autor, 2025.

4.4 Caracterização química das frações de álcool metílico 80%

O Laboratório de Gestão de Compostos (LGC/LNBio-CNPem) recebeu as amostras das frações de álcool metílico 80% e com o auxílio do equipamento Janus Varispan ou Janus G3, realizou a solubilização das amostras. Estas foram centrifugadas a 990 xg por um minuto, em seguida os microtubos foram acondicionados em racks próprios do equipamento, as tampas foram cortadas e reservadas ordeiramente, com o intuito de evitar contaminação cruzada. As racks com os tubos foram acondicionadas em posição especificada no deck do equipamento e foi adicionado volume suficiente de DMSO 100%, obedecendo uma concentração final de 10 mg/mL por amostra. Finalizada a transferência, os tubos foram tampados e levados, um por vez, ao vórtex por 30 segundos, para verificar a presença de precipitado. Em seguida, os tubos foram encaminhados ao banho ultrassônico em potência

mínima, e água em temperatura ambiente por 5 minutos. Finalizado esse processo, as amostras foram deixadas em agitação, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, por 24 horas. Após esse período, seguem para a etapa de transferência para tubos de 1,4 mL codificados (Micronic), para armazenamento, e preparo das placas para análise UPLC-MS/MS (Greiner 784201 – 12 µL). As amostras foram armazenadas em atmosfera de nitrogênio à -20°C até o uso.

Para a análise do perfil cromatográfico das amostras, foi utilizado um sistema UPLC Acquity HClass (Waters). Este foi equipado com coluna C18 BEH Acquity de 1,7 µm (2,1 x 100 mm, Waters), operando a um fluxo de 0,5 mL/min e uma temperatura de coluna de 40 °C. O gradiente de eluição foi programado da seguinte forma: 90% de água, 5% de acetonitrila (CH₃CN) e 5% de solução de ácido fórmico 2% (fase móvel inicial); aos 10 minutos, a concentração de CH₃CN foi aumentada para 95%, mantendo 5% da solução de ácido fórmico a 2% (curva 6); aos 12 minutos, a fase móvel foi alterada para 100% de CH₃CN (curva 1); e 3 minutos de recalibração na fase móvel inicial (totalizando 15 minutos).

Após a separação cromatográfica, os analitos foram submetidos à análise de espectrometria de massas (MS) utilizando um espectrômetro de massas tandem UHR-ESI-QqTOF Impact II (Bruker), operando no modo positivo. Os parâmetros foram configurados com uma taxa de aquisição de 8 Hz do tipo espectro em linha, com um limite absoluto de 25 contagens. Para a ionização, a fonte foi ajustada com os seguintes parâmetros: deslocamento de placa de extremidade de 500 V, voltagem de capilar de 4500 V, pressão de nebulização de 4 Bar para o gás de secagem N₂, com fluxo de 10 L/min e uma temperatura de secagem de 200°C.

O método de MS/MS utilizado, empregou um tempo de ciclo de 1 segundo e um limiar absoluto de 1500 contagens. A cela de colisão estava em 5.0 eV com energia de colisão na faixa de 20-70 V e um *cutoff* absoluto de fragmentação de 1000. A função “*active exclusion*” foi habilitada, de modo que íons abaixo de 200 Da foram excluídos. Para calibração do espectrômetro, uma solução de formiato de sódio 10 mM foi utilizada, garantindo uma calibração precisa e confiável do instrumento para análise em alta resolução. Após a análise, os dados brutos foram convertidos em mzXML no software do equipamento.

4.5 Construção de redes moleculares e anotação de compostos

Utilizou-se a plataforma de análise de espectrometria de massas baseadas na web, GNPS2 (*Global Natural Products Social Molecular Networking 2*) para construção das redes

moleculares, e, análise química. Os dados foram filtrados removendo todos os íons de fragmentos MS/MS dentro de +/- 17 Da do precursor m/z. Os espectros MS/MS foram filtrados em janela escolhendo apenas os 6 principais íons de fragmentos na janela +/- 50Da em todo o espectro. Definiu-se a tolerância à massa do íon precursor como 0,02 Da e uma tolerância ao íon do fragmento MS/MS de 0,02 Da. Dessa forma, criou-se uma rede onde as bordas foram filtradas para haver uma pontuação de cosseno acima de 0,87 e mais de 6 picos correspondentes, e intensidade mínima de picos em 100. Além disso, manteve-se as arestas entre dois nós na rede se e somente se cada um dos nós aparecesse nos 10 nós mais semelhantes um do outro. Finalmente, o tamanho máximo de uma família molecular foi definido como 100, e as bordas de pontuação mais baixa foram removidas das famílias moleculares até que o tamanho da família molecular estivesse abaixo deste limite. Os espectros na rede foram então pesquisados nas bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as correspondências mantidas entre espectros de rede e espectros de biblioteca deveriam ter uma pontuação acima de 0,87 e pelo menos 6 picos correspondentes.

Com o intuito de aprimorar os critérios das anotações utilizou-se as seguintes bases de dados: COCONUT – Collection of Open Natural Products [[Link](#)]; ChEBI – Chemical Entities of Biological Interest [[Link](#)]; FooDB – Resource on food constituents; NPatlas – The Natural Products Atlas [[Link](#)]; CAS – Chemical Abstracts of American Chemical Society [[Link](#)]; MassIVE – Mass Spectrometry Interactive Virtual Environment; microbeMASST [[Link](#)]; EMNPD - Endophyte Microorganism Natural Product Database; MassBank [[Link](#)]; MetaboLights.

4.6 Determinação da atividade antifúngica

Escolheu-se as frações de álcool metílico 80% (por possuir maior quantidade de compostos secundários, além disso, considera-se maior concentração de substâncias presentes no meio de cultivo nas frações aquosas e hexânicas) para avaliar sua capacidade de inibir o crescimento micelial do fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum* por meio do ensaio de poços difusos adaptado (MAGALDI *et al.*, 2004). Solubilizou-se os extratos com dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo uma concentração de 20 mg/mL. Cultivou-se o fitopatógeno em meio BDA por 7 dias à 21°C, após o período de incubação, depositou-se discos miceliais de *S. sclerotiorum* no centro de placas de Petri com meio BDA, as placas foram incubadas por 2 dias nas mesmas condições. Em seguida, fez-se poços com cerca de 1 cm de distância da

borda das placas de Petri, que foram selados com solução de ágar 5%, adicionou-se 35 µL de cada fração nos poços, sendo que em um poço foi colocado DMSO como controle. Como controle negativo, o fitopatógeno cresceu em placas contendo apenas o meio de cultura. Realizou-se o ensaio em triplicata, e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o programa SISVAR 5.6. As placas de Petri foram incubadas por cerca de 4 dias, em seguida calculou-se o percentual de inibição do patógeno através da Equação 1.

$$PI = [(Rc - Re) / Rc] \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que: PI é o percentual de inibição, Rc é o raio do crescimento micelial grupo controle negativo, Re o raio do crescimento micelial do grupo controle DMSO e dos extratos brutos (medido do centro da placa, em que se colocou o disco micelial, até onde houve crescimento).

4.7 Determinação da atividade antibacteriana

Para os ensaios antibacterianos, utilizou a metodologia adaptada de discos difusos para avaliar o potencial de inibição bacteriano das frações de álcool metílico 80% obtidos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Testou-se contra duas cepas de bactérias gram-negativas, *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Fez-se o cultivo das cepas bacterianas em placas de Petri contendo meio de cultivo Ágar BHI (37g de meio BHI – *Brain, Heart Infusion*; 15g de Ágar; 1L de água destilada), e incubou-se por um período de 12 horas (overnight) à temperatura ambiente. Passado o período de incubação de 3 a 4 colônias bacterianas discretas e com morfologias semelhantes, foram inoculadas em 10 mL de caldo BHI (37g de BHI; 1 L de água destilada) e, incubadas por 12 horas nas mesmas condições supracitadas. Em seguida, mediu-se a densidade óptica (DO) da suspensão bacteriana utilizando espectrofotômetro a 600 nm. A suspensão bacteriana foi ajustada para o padrão de McFarland 0,5, referente a uma absorvância de 0,1 e indicando que a concentração de bactérias é de 10^8 Unidade Formadora de Colônia/mL.

Em placas de Petri contendo meio Ágar BHI transferiu-se 100µL da suspensão bacteriana padronizada, espalhada por toda a placa com o auxílio de alça de Drigalski. Disponibilizou-se discos de papel filtro (previamente autoclavados) individualmente na superfície do meio de cultura e 10 µL das frações foram dispostos nos discos, seguindo as mesmas concentrações utilizadas no ensaio antifúngico, e tendo como controle DMSO. Após 12 horas de incubação, a inibição foi analisada qualitativamente, considerando apenas sua ocorrência ou não.

4.8 Avaliação da citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo Laboratório de Gestão de Compostos (LGC/LNBio-CNPEM) de maneira automatizada (metodologia de triagem de alto desempenho; *HTS – High-Throughput Screening*), em células aderentes HaCaT (queratinócitos humanos, não tumoral) e HCT-116 (epitelial humana, câncer de cólon), usando o parâmetro de contagem de núcleos em imagens adquiridas por microscopia (metodologia de *HCA – High-Content Analysis*).

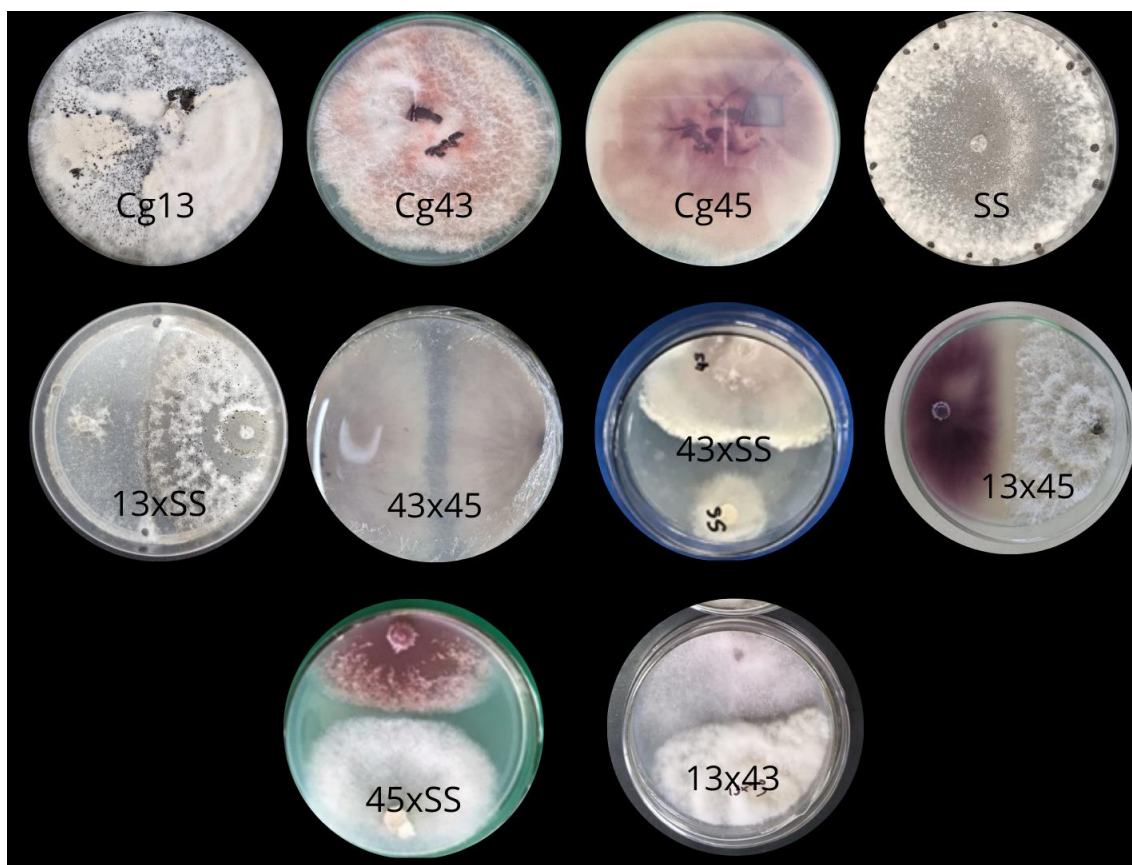
Brevemente, as amostras armazenadas em placas LDV (9 μ L) foram dispostas em *assay ready plates* (384 poços), por meio de transferência acústica precisa com o uso do manipulador de líquidos ECHO 650 (Beckman Coulter). Este procedimento foi realizado para obter concentrações finais de 40 μ g/mL - 0,16 μ g/mL no ensaio celular. DMSO (concentração final = 0,4%) foi utilizado como controle negativo, enquanto Paclitaxel foi usado como controle positivo em concentrações finais de 0,5 μ M a 0,5 nM. As células foram transferidas para as *assay ready plates* e, após a transferência, a placa foi incubada por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂. A citotoxicidade foi avaliada por contagem de núcleos. Deste modo as células foram coradas com Hoechst (coloração dos núcleos), fixadas com PFA 3,7% e analisadas em um microscópio automatizado Operetta (Perkin Elmer), onde foi possível obter as imagens de interesse. As imagens foram quantificadas no software Harmony (Perkin Elmer) transferidas, processadas e armazenadas no CDD Vault.

5 RESULTADOS E ANÁLISE

5.1 Monocultivos e cocultivo dos microrganismos e obtenção das frações de álcool metílico 80%

Durante o ensaio antagonista realizado por Bessa (2022), os fungos endofíticos, isolados de *C. guianensis*, apresentaram atividade positiva frente a *S. sclerotiorum*, sugerindo que os endófitos e o fitopatógeno disputaram recursos, nutrientes e espaço (FERREIRA *et al.*, 2021). Por consequência dessa competição, há uma provável indução de biossíntese de metabólitos com atividade antagonista que afetaram o crescimento micelial do patógeno. Esses metabólitos podem não ser sintetizados caso não haja o fator de estresse necessário (DOS REIS *et al.*, 2024). Dessa forma, utilizou-se a estratégia de cocultivos para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos, e verificar a diversidade química dos extratos obtidos das monoculturas e cocultivos (figura 8). Em síntese, o cocultivo simula o fator de estresse ecológico necessário para a produção de compostos de interesse.

Figura 8 – Monocultivos e cocultivos dos fungos endofíticos e *Sclerotinia sclerotiorum*



Fonte: Autor, 2024.

O cocultivo fungo-fungo é relatado como uma vantajosa fonte de novos metabólitos, sendo responsável por ativar *clusters* de genes silenciados que realizam a biossíntese de diferentes compostos. Escolheu-se a fermentação em estado sólido utilizando meio de cultura BDA para produção dos extratos brutos, sendo esse um dos métodos mais utilizados, juntamente com o cultivo em arroz (XU *et al.*, 2023b).

A escolha da fermentação em estado sólido em meio BDA é conveniente ao considerar a forma que se realizou o ensaio antagonista, utilizando o método de culturas pareadas (BESSA, 2022). Ademais, esse processo fermentativo afeta a competição por recursos entre os fungos, visto que o meio sólido limita a transferência de massa dos microrganismos, influenciando nos produtos naturais formados, tendo como vantagem a produção dos compostos de interesse (ZHUANG; ZHANG, 2021).

Para a obtenção dos extratos brutos, utilizou-se a técnica de extração sólido-líquido, utilizando álcool metílico como a fase líquida, e como fase sólida a biomassa fúngica. A escolha do solvente para extração é relacionada com o fato de o metanol possuir uma faixa de extração capaz de extrair metabólitos intracelulares, e, polares, entre eles aminoácidos, ácidos nucleicos, ácidos orgânicos e outros (DOS REIS *et al.*, 2024; PRIEGO-CAPOTE, 2021; ZHUANG; ZHANG, 2021).

Os extratos foram então submetidos a fracionamento com diversos solventes orgânicos para separar as diferentes classes de compostos, acetato de etila para obter uma gama variada de compostos com diversidade de polaridades, metanol 80% para os compostos mais polares, e, hexano, para compostos mais apolares (DOS REIS *et al.*, 2024; PRIEGO-CAPOTE, 2021). A tabela 5 apresenta as massas dos extratos brutos obtidos dos monocultivos e cocultivos em cada solvente utilizado.

Tabela 5. Massas das frações obtidos dos monocultivos e cocultivos

Cultivos/Frações	AcOEt (g)	Metanol 80% (g)
Controle	0,0476	0,0346
Cg13	0,0580	0,0320
Cg43	0,1256	0,0987
Cg45	0,0550	0,0266
SS	0,0021	0,0059
13xSS	0,0510	0,0320
43xSS	0,0028	0,0018
45xSS	0,0360	0,0374
13x43	0,0601	0,0458
13x45	0,0753	0,0633
43x45	0,2213	0,1607

Fonte: Autor, 2024.

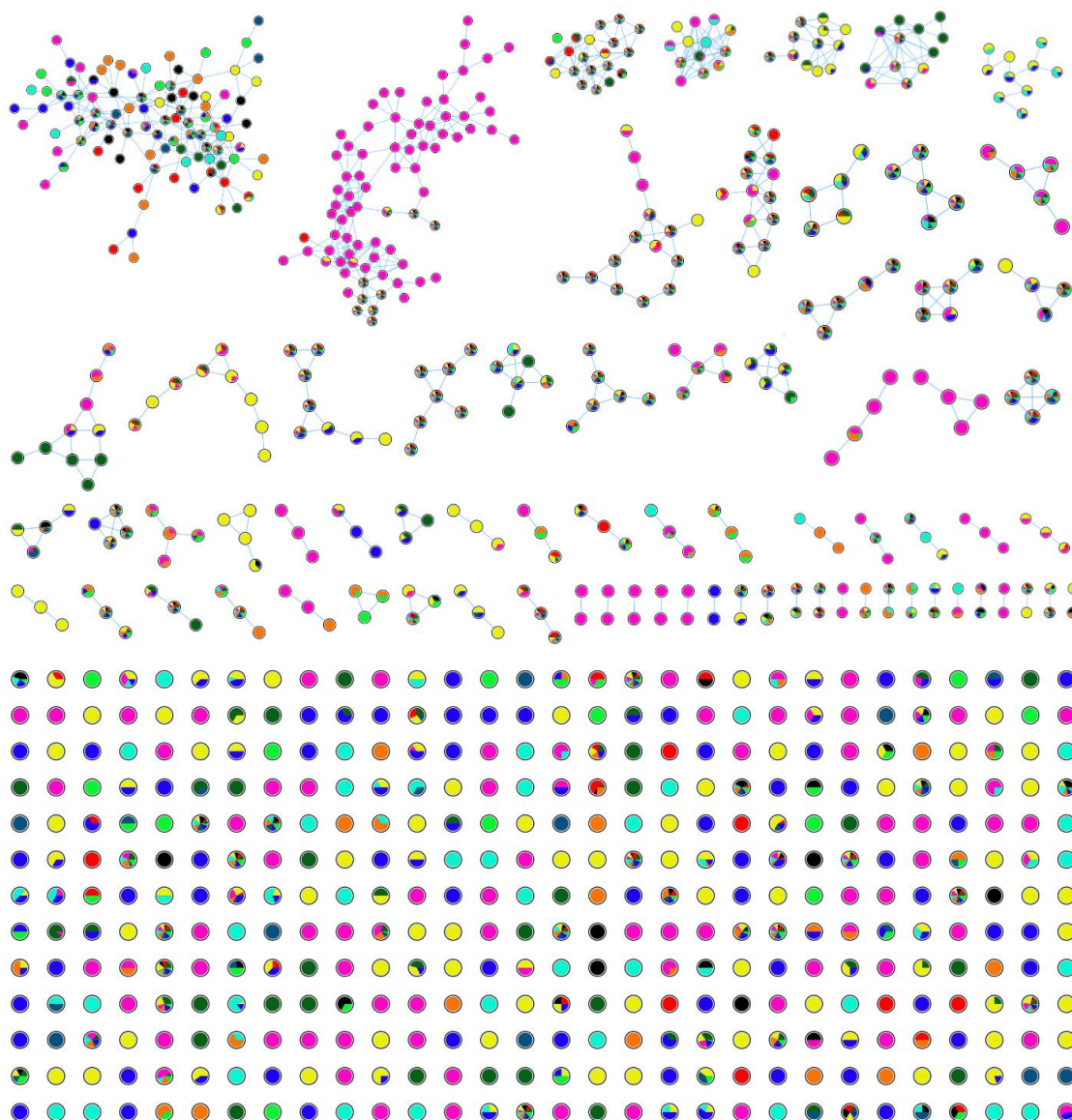
5.2 Construção das redes moleculares e caracterização química das frações de álcool metílico 80%

A ferramenta conhecida como *Classical Networking Workflow* foi selecionada para a criação das redes moleculares por dispensar as etapas de pré-processamento, e possuir interface simples. Dessa forma, com os dados espectrais de MS/MS das frações referentes aos monocultivos, cocultivos e controle, gerou-se a rede molecular, visualizada utilizando o software Cytoscape (Figura 9). A rede molecular apresentou complexidade de dados, havendo um total de 2783 nodos (excluindo nodos com a presença da fração com apenas o meio de cultura) e 821 *edges*. Cada nodo caracterizado pelo seu respectivo espectro de massas, *edges* ou linhas/bordas que representam uma linha que conecta os nodos que são relacionados/similares, mas não idênticos (ARON *et al.*, 2020).

Para anotação de compostos, considerou-se a proposta feita por Sumner *et al.* (2007) e Schymanski *et al.* (2014), em que a identificação dos metabólitos é determinada em níveis. No nível 1, os metabólitos são confirmados ao utilizar os dados de tempo de retenção, espectro de massas e espectro MS/MS, comumente sendo compostos já relatados. Para o nível

2, os compostos são identificados através da compatibilidade entre os dados espectrais obtidos com os presentes em banco de dados e/ou literatura. No nível 3, há tentativa de propor uma estrutura ao composto, contudo, a estrutura correta é apenas sugerida; no nível 4, tem-se a fórmula molecular, não havendo informação suficiente para propor uma estrutura. No nível 5, há os dados referente à massa carga (m/z) e tempo de retenção, não havendo demais informação para sugerir uma fórmula (SCHYMANSKI *et al.*, 2014; SUMNER *et al.*, 2007).

Figura 9 – Rede molecular das frações referentes aos monocultivos e cocultivos*



Legenda:



* Rede molecular incompleta, apenas para ilustração

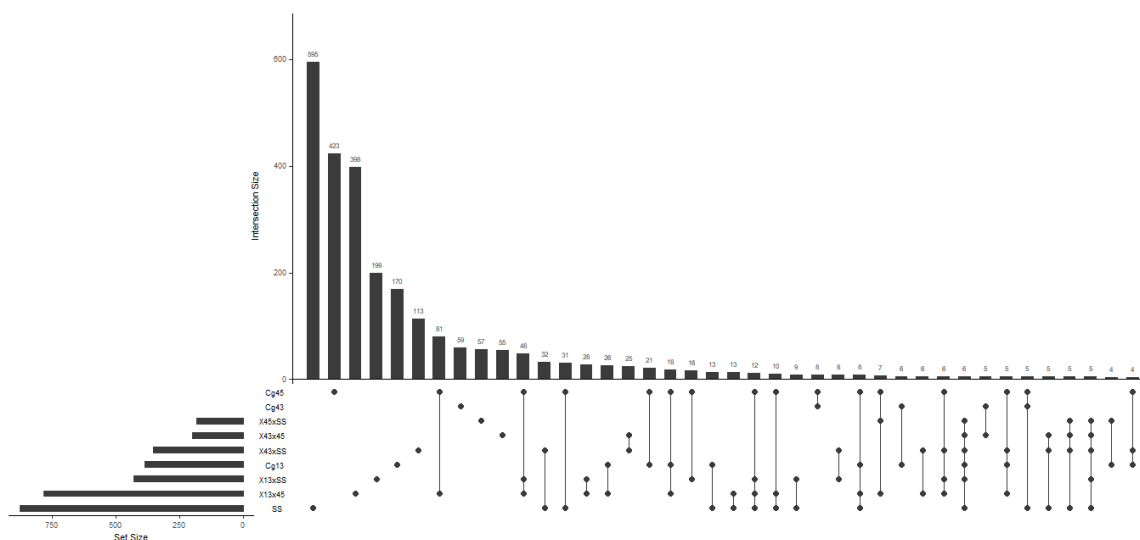
Fonte: Autor, 2024.

A princípio, para a quantificação do perfil metabólico, considerou-se as entidades de massas obtidas como sendo de nível 5, não havendo identificação em bancos de dados e

literatura, apenas os valores de m/z , tempo de retenção e as culturas as quais as entidades de massas foram atribuídas.

Utilizando o diagrama de perturbação ou *upset plot* (figura 10) analisa-se a quantidade de íons m/z acumulados, sendo eles comuns e/ou específicos as monoculturas e os cocultivos. Foram relacionados os diferentes níveis de interação entre os microrganismos, e, como essas interações influenciam a produção metabólica dos fungos. Os sistemas de cocultivo, em metabolômica, atuam com o intuito de estimular a produção de metabólitos, visto que, na natureza os microrganismos existem em consórcios que apresentam interações complexas entre as diversas comunidades microbianas (GUO; XI; LU, 2024).

Figura 10 – Diagrama de perturbação das entidades de massas comuns e/ou específicas acumuladas entre os monocultivos e cocultivos em seus diferentes níveis de interação*

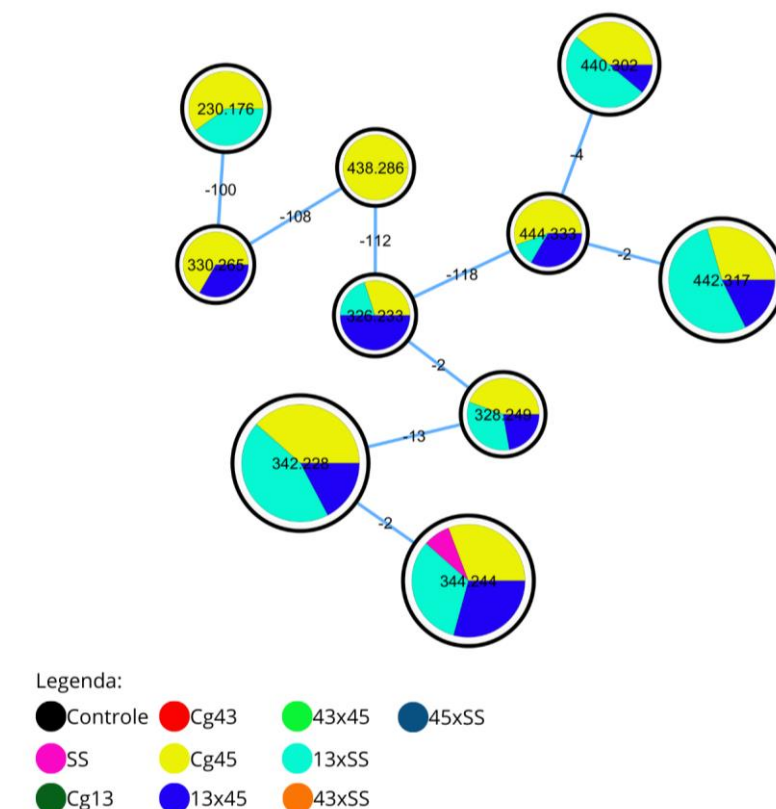


*Imagem ampliada em apêndice A, Figura S6.

Fonte: Autor, 2025.

Com o diagrama de perturbação, pode-se notar que houve maior número de entidades de massas exclusivos, a fração SS com 595 nodos, fração Cg45 com 423 e 13x45 com 398 nodos. Ademais, os cocultivos 13xSS, 43xSS, 45xSS e 43x45, apresentaram, respectivamente 199, 113, 57 e 55 entidades de massas exclusivas. Analisando os níveis de interação entre as frações dos diferentes cultivares, nas frações Cg45 e 13x45 relatou-se maior quantidade de nodos compartilhados, com 81 nodos, sugerindo que o fungo endofítico *Fusarium* sp. Cg45 seja responsável pela produção dos compostos apresentados. A figura 11 mostra os níveis dessa interação, em que é apresentado um *cluster* com predominância das frações 13xSS, 13x45 e Cg45.

Figura 11 – Cluster com predominância de cocultivos das frações obtidas dos cocultivos *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 com *Fusarium* sp. Cg45 (13x45) e *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 com *Sclerotinia sclerotiorum* (13xSS)



Fonte: Autor, 2025.

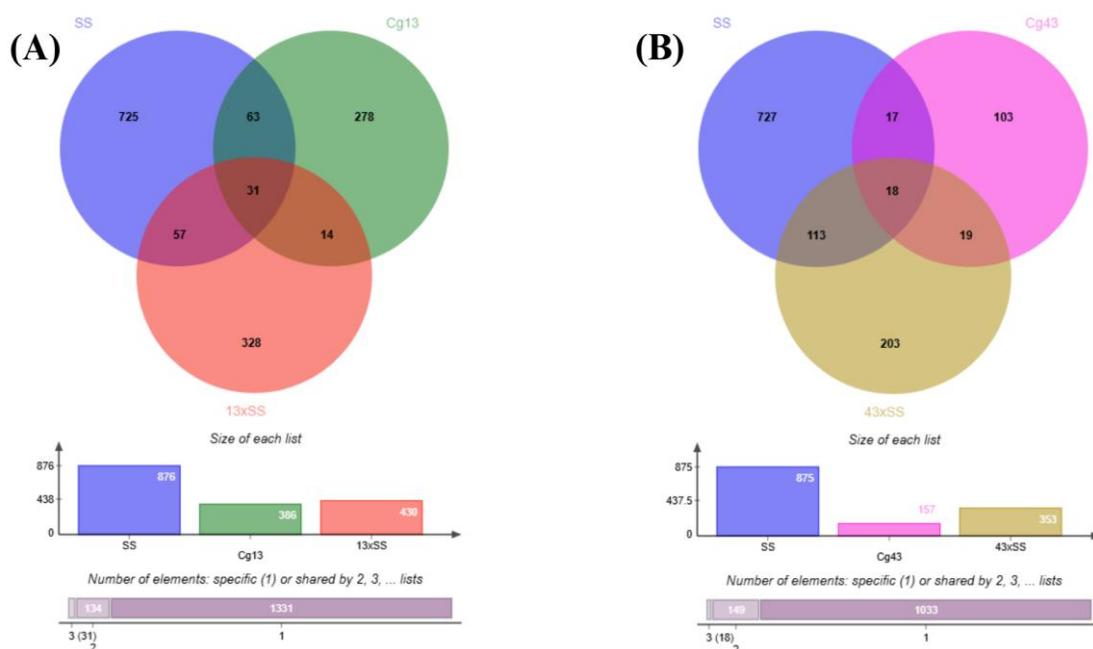
Ao utilizar esse sistema para a obtenção das frações referentes aos cocultivos 13xSS, 43xSS e 45xSS teve-se a intenção de estimular a produção de compostos com potencial antifúngico, visto que, utilizou-se o fitopatógeno *S. sclerotiorum* como microrganismo de interação no cocultivo. Considerando-se que a ativação de genes silenciados, responsáveis pela produção dos metabólitos de interesse, pode ser estimulado com o contato direto entre as culturas microbianas alvo. Ademais, a interação entre microrganismos endofíticos e patogênicos é dada como competitiva, a interação competitiva de interferência é responsável pelo aumento da síntese de metabólitos que impedem o desenvolvimento e sobrevivência de outras espécies, sendo essa interação associada a produção de compostos antimicrobianos (GUO; XI; LU, 2024; SELEGATO; CASTRO-GAMBOA, 2023; SORNAKILI *et al.*, 2020).

Em contraponto, os extratos 13x43, 13x45 e 43x45 foram elaborados pretendendo-se imitar uma comunidade microbiana, a qual houvesse interação cooperativa entre os fungos

endofíticos, dado que esses são endófitos da mesma planta hospedeira. Quando há um consórcio cooperativo entre os microrganismos que habitam o mesmo microambiente, existe um equilíbrio estabelecido entre esses para coexistência, e sobrevivência, que ocorre na produção de compostos de resistência, e antibióticos para inibir demais microrganismos (GUO; XI; LU, 2024; SELEGATO; CASTRO-GAMBOA, 2023; SORNAKILI *et al.*, 2020).

Através da análise do perfil químico dos fungos *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 e *S. sclerotiorum*, e, do cocultivo entre esses, pode-se determinar o impacto da interação microbiana na produção metabólica dos microrganismos. O diagrama de Venn (Figura 12.A) mostra que do cocultivo obteve-se 430 entidades de massas totais, sendo 328 exclusivas dessa fração. Em relação ao perfil químico da fração 43xSS em comparação com seus monocultivos referentes, apresentou-se, na rede molecular, 353 nodos relacionados ao cocultivo, sendo que desses, 203 foram exclusivos (Figura 12.B). Os cromatogramas referentes às frações dos cocultivos e seus respectivos monocultivos podem ser visualizados em Apêndice A (Figura S1-S5).

Figura 12– Diagrama de Venn relacionando as entidades de massas dos monocultivos e cocultivos

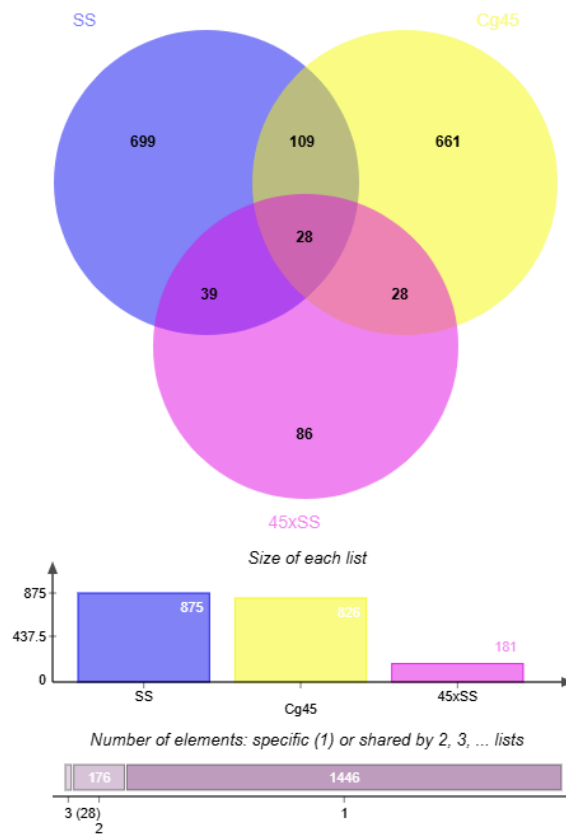


Legenda: A) Diagrama de Venn relacionando as entidades de massas dos monocultivos Cg13 e SS, com as do cocultivo referente, 13xSS. B) Diagrama de Venn relacionando as entidades de massas dos monocultivos Cg43 e SS, com as do cocultivo referente, 43xSS.

Fonte: Autor, 2025.

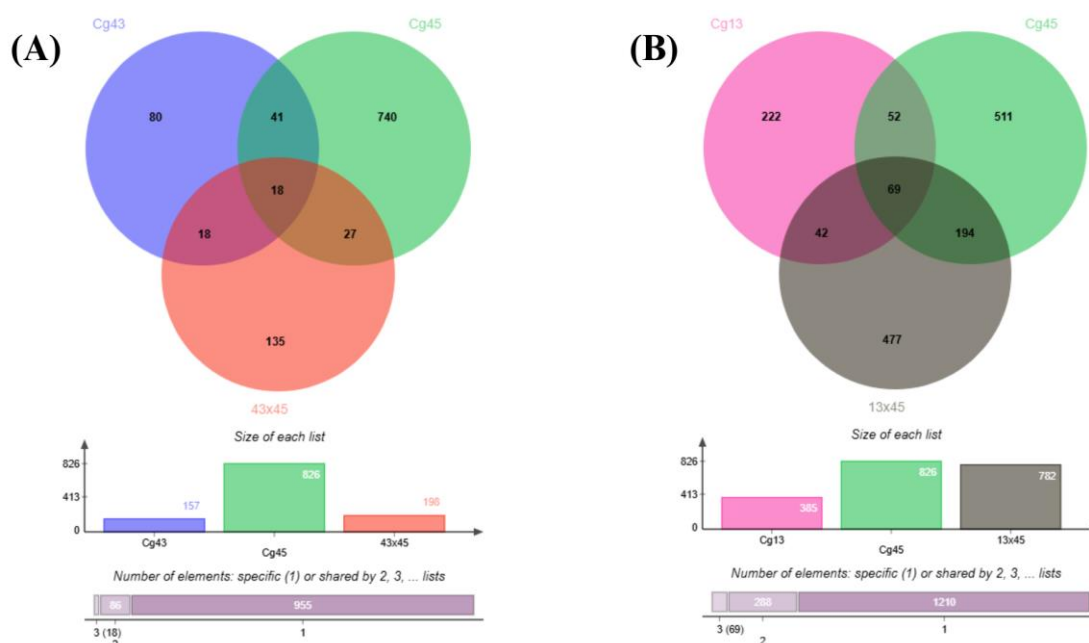
Além disso, da fração 45xSS em comparação com seus monocultivos, houve menor quantidade de entidades de massas (figura 13), em que, o monocultivo Cg45 produziu 826 entidades de massas, sendo 661 exclusivas. Enquanto, o cocultivo produziu 86 entidades exclusivas e 181 acumuladas. Em relação aos cocultivos produzidos entre os endófitos, o diagrama de Venn (figura 14) apresenta que nos extratos 13x45 e 43x45 houve menor quantidade de entidades de massas exclusivas, quando comparados com os monocultivos referentes.

Figura 13 – Diagrama de Venn relacionando as entidades de massas dos monocultivos Cg45 e SS, com as do cocultivo referente, 45xSS



Fonte: Autor, 2024.

Figura 14 - Diagrama de Venn relacionando as entidades de massas dos monocultivos com os cocultivos referente



Legenda: A) Entidades de massas referentes aos extratos Cg43, Cg45 e 43x45. B) Entidades de massas referentes aos extratos Cg13, Cg45 e 13x45.

Fonte: Autor, 2024.

Informações adicionais sobre as entidades exclusivas dos cocultivos podem ser visualizadas na tabela completa gerado pelo software Cytoscape com o [link](#).

Através de redes moleculares do cocultivo do fungo *Cosmospora* sp. e de seu fitopatógeno *Magnaporthe oryzae* e de seus respectivos monocultivos pode-se observar as principais classes de compostos produzidos pelos extratos, e, possibilitar a investigação de novos compostos. Do cocultivo, fez a identificação e isolamento dos compostos sudanona A, D, E, H e I, que não foram identificadas nos monocultivos, esses metabólitos foram relatados como tendo atividades antipatogênicas (OPPONG-DANQUAH *et al.*, 2022).

A rede molecular do cocultivo entre *Streptomyces* sp. 2-85 e *Cladosporium* sp. 3-22 detectou 19 metabólitos antimicrobianos exclusivos da cocultura, além de aumentar significativamente a produção de borrelidina, composto com atividade antibacteriana. A borrelidina foi testada quanto a sua atividade antifúngica frente à *Saprolegnia parasítica*, mostrando-se eficaz na inibição do crescimento micelial do patógeno (LIU *et al.*, 2024).

5.3 Anotação de Compostos

Seguindo a proposta de anotação de compostos estabelecida por Sumner *et al.* (2007) e Schymanski *et al.* (2014), os seguintes compostos foram anotados conforme as recomendações para os níveis de anotação. Obteve-se 60 compostos correspondentes a espectros presentes na base de dados do GNPS2. Para a anotação dos compostos adotou-se as seguintes formas de exclusão e inclusão: os metabólitos relacionados com o espectro referente ao grupo controle foram desprezados; comparou-se os espelhos dos espectros de massas, os picos compartilhados entre espectros e a similaridade dos valores dos cossenos, sendo que valores próximos de 1 são ideias; com o Painel *microbeMASST* pode-se determinar se os compostos correspondentes haviam sido previamente relatados como sendo produzidos por microrganismos (ARON *et al.*, 2020; ARRIEL-ELIAS *et al.*, 2023).

A tabela 6 apresenta a relação entre os compostos anotados, havendo 34 entidades de massas com espectros semelhantes com os pertencentes às bibliotecas utilizadas. A maioria dos compostos anotados no nível 4, apresentaram semelhanças espectrais com compostos pertencentes a classe dos lipídios, moléculas conhecidas por apresentarem menor polaridade (REIS *et al.*, 2024). As bibliotecas utilizadas para esse nível de anotação sugeriram até duas possíveis fórmulas moleculares. A figura 15 apresenta as estruturas químicas dos compostos anotados nos níveis 2 e 3:

Tabela 6. Metabólitos anotados nas frações dos monocultivos e cocultivos

<i>m/z</i>	RT (min)	Fórmula molecular	Anotação*	Nível de anotação	Fração(s) atribuída(s)
(1) 829,473 [M+NH ₄] ⁺	9,6	C ₄₁ H ₆₅ NO ₁₅	Midecamicina A3 (1)	Nível 3	Cg45
(2) 520,341 [M+H] ⁺	7,95	C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	[2-hidroxi-3- [(9Z, 12Z)-octadeca-9, 12- dienoil]oxipropil] 2- (trimetilazaniumil) etil fosfato (2)	Nível 3	Cg45
(3) 522,357 [M+H] ⁺	8,65	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	(2-hidroxi-3-octadec-9- enoiloxipropil) 2- (trimetilazaniumil) etil	Nível 3	SS, Cg13, Cg43, Cg45,

			fosfato (3)		45xSS, 43xSS, 43x45, 13xSS
(4) 207,066 [M+H] ⁺	14,8	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	Escoparona (4)	Nível 2	SS, 13x45
(5) 258,111 [M+H] ⁺	0,5	C ₈ H ₂₀ NO ₆ P	Glicerofosfato de colina (5)	Nível 2	SS, Cg45
(6) 801,443 [M+NH ₄] ⁺	9,63	C ₄₅ H ₅₇ N ₃ O ₉	Beauvericina (6)	Nível 2	Cg45, Cg43, Cg13, 45xSS, 43x45, 13x45
(7) 330,134 [M+H] ⁺	3,23	C ₁₈ H ₁₉ NO ₅	(E)-N-[(2S)-2-hidroxi- 2-(4-hidroxifenil)etil]- 3-(4-hidroxi-3- metoxifenil)prop-2- enamida (7)	Nível 2	Cg45
(8) 784,417 [M+H] ⁺	9,59	C ₄₅ H ₅₇ N ₃ O ₉	Beauvericina (8)	Nível 2	Cg45
(9) 454,293 [M+H] ⁺	8,38	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	Lyso PE (16:0) (9)	Nível 2	SS, Cg45, Cg43
(10) 411,326 [M-H ₂ O+H] ⁺	10,96	C ₂₈ H ₄₄ O ₃	Peróxido de ergosterol (10)	Nível 2	Cg45, 45xSS, 13x45
(11) 235,097 [M+H] ⁺	3,32	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	7-hidroxi-3-[(2R)-2- hidroxipropil]-5-metil- isocromen-1-ona (11)	Nível 2	45xSS, 13x45
(12) 357,300 [M+H] ⁺	10,49	C ₂₁ H ₄₀ O ₄	Monoelaidina (12)	Nível 2	Cg45, Cg13, 43xSS,

					13x45
(13) 478,294 [M+NH ₄] ⁺	7,94	C ₂₀ H ₃₆ N ₄ O ₈	Desferrioxamina H (13)	Nível 2	Cg45, Cg43, SS
(14) 522,357 [M+H] ⁺	8,65	C ₂₆ H ₅₂ NO ₇ P	LPC (18:1) (14)	Nível 2	SS, Cg45, Cg43, Cg13, 45xSS, 43xSS, 43x45, 13xSS
(15) 520,340 [M+H] ⁺	7,78	C ₂₁ H ₄₆ N ₉ O ₄ P/ C ₂₆ H ₄₉ NO ₉	Lipídio	Nível 4	43x45
(16) 548,372 [M+H] ⁺	8,89	C ₂₈ H ₅₄ NO ₇ P/ C ₃₀ H ₄₉ N ₃ O ₆	Lipídio	Nível 4	SS
(17) 496,340 [M+H] ⁺	8,42	C ₃₀ H ₄₅ N ₃ O ₃	Lipídio	Nível 4	SS, Cg13, Cg43, Cg45, 13xSS, 43xSS, 45xSS, 43x45;
(18) 552.330 [M+H] ⁺	5,42	C ₂₂ H ₄₅ N ₇ O ₉ / C ₂₆ H ₅₀ NO ₉ P	Lipídio	Nível 4	13xSS
(19) 536,334 [M+H] ⁺	6,22	C ₂₁ H ₄₇ N ₂ O ₁₀ P/ C ₂₄ H ₄₁ N ₉ O ₅	Lipídio	Nível 4	SS, Cg13
(20) 524,372 [M+H] ⁺	9,5	C ₂₈ H ₄₉ N ₃ O ₆	Lipídio	Nível 4	SS
(21) 412,210 [M+H] ⁺	2,97	C ₁₇ H ₃₄ NO ₈ P/ C ₁₉ H ₂₉ N ₃ O ₇	Lipídio	Nível 4	SS, 13xSS
(22) 542,323 [M+Na] ⁺	7,96	C ₂₉ H ₄₁ N ₇ O ₂ / C ₂₆ H ₅₀ NO ₇ P	Lipídio	Nível 4	SS, Cg45, Cg13, 45xSS,

					43xSS, 43x45
(23) 545,170 [2M+Na] ⁺	0,5	-	Monossacarídeo	Nível 5	Cg45
(24) 668,421 [M+H] ⁺	8,42	C ₃₂ H ₆₁ NO ₁₃ / C ₃₉ H ₅₇ NO ₈	Lipídio	Nível 4	43x45
(25) 684,202 [M+NH ₄] ⁺	11,31	C ₃₃ H ₃₄ N ₂ O ₉ S ₂	Policetídeo	Nível 4	Cg13
(26) 670,469 [M+C ₂ H ₃ N+H] ⁺	12,14	C ₃₈ H ₆₀ O ₇	Terpenoide	Nível 4	43xSS
(27) 432,239 [M-H ₂ O+H] ⁺	6,82	C ₂₄ H ₃₅ NO ₇	Terpenoide	Nível 4	13x45
(28) 276,108 [M-2H ₂ O+H] ⁺	1,24	C ₁₁ H ₂₁ NO ₉	Açúcar aminado	Nível 4	43x45
(29) 346,332 [M+H] ⁺	7,5	C ₂₀ H ₄₃ NO ₃	Lipídio	Nível 4	43x45, 43xSS
(30) 313,322 [M+H] ⁺	7,45	C ₁₉ H ₄₀ N ₂ O	Lipídio	Nível 4	SS, Cg13, Cg45, 43xSS, 13x45
(31) 420,261 [M+H] ⁺	9,25	C ₂₀ H ₃₇ NO ₈	Ácido carboxílico	Nível 4	Cg43, 43xSS
(32) 399,359	8,29	C ₂₀ H ₄₂ N ₆ O ₂	Aminoácido	Nível 4	Cg13, Cg45
(33) 573,304 [M-H ₂ O+H] ⁺	7,91	C ₃₂ H ₄₆ O ₁₀	Lipídio	Nível 4	Cg45, 45xSS, 43xSS, 43x45, 13xSS
(34) 372,312 [M+H] ⁺	9,77	C ₂₂ H ₄₄ O ₂ P/ C ₂₂ H ₃₇ N ₅	Lipídio	Nível 4	SS, Cg45, Cg13, 43xSS, 13x45
(35) 702,265	0,49	-	Carboidrato	Nível 5	13x45

[2M+H] ⁺					
---------------------	--	--	--	--	--

*Identificação: os compostos foram identificados conforme a classificação indicada pelo banco de dados do GNPS2 e outras bibliotecas; **Identificação feita através do espectro relacionado.

Fonte: Autor, 2025.

O composto Midecamicina A3 (**1**) foi anotado a nível 3, não havendo um espectro correspondente em bases de dados que pudessem definir o composto. No entanto, bibliotecas adicionadas ao GNPS2 sugeriram que o metabólito possui relação espectral com o espectro de massas de beauvericina, em acréscimo, houve sugestão da fórmula molecular pela plataforma, auxiliando na identificação e sugestão da possível estrutura, sendo ambos classificados como ácidos orgânicos e/ou derivados. Midecamicina A3 é um macrolídeo, conhecido por ser sintetizado por microrganismos como *Streptomyces mycarofaciens*, atuando como antibacteriano por inibir a produção de proteínas das bactérias (YU *et al.*, 2022).

Anotou-se em nível 3 o composto [2-hidroxi-3- [(9Z, 12Z) -octadeca-9, 12-dienoil] oxipropil] 2-(trimetilazaniumil) etil fosfato (**2**), que apresentou relação espectral com o composto 18:0 Lyso PC, ambos classificados como glicerofosfolipídios. A biblioteca sugeriu duas possíveis fórmulas moleculares C₂₆H₅₀NO₇P ou C₃₃H₄₅NO₄, ao analisar dados da literatura e informações espectrais fornecidas pela *National Library of Medicine*, a primeira fórmula foi utilizada para propor a estrutura química.

Para o composto (2-hidroxi-3-octadec-9-enoiloxipropil) 2-(trimetilazaniumil) etil fosfato (**3**), houve semelhança espectral com Lyso PC (16:0), ambos classificados como lipídios. Esses metabólitos são considerados lisofosfatidilcolina, podendo ser produzidos por fungos e bactérias, como *E. coli*, nos microrganismos a função não é bem definida, sabendo-se que esses compostos desempenham função estrutural na membrana (ZHENG *et al.*, 2017).

Anotou-se escoparona (**4**) como nível 2, pertencente a classe de cumarinas, é encontrado em plantas como *Artemisia capillaris*, tendo uso na medicina tradicional chinesa para tratamento de disfunções hepáticas, colestase e icterícia, além disso, apresenta atividade anti-inflamatória, antioxidante e antiapoptótica. Esse composto é associado, principalmente, a plantas, não havendo dados indicando a produção de escoparona por microrganismos, Contudo, diversas espécies fúngicas são conhecidas por sintetizarem cumarinas e seus derivados, indicando a possibilidade de produção de escoparona (HUI *et al.*, 2020; TSIVILEVA; KOFTIN; EVSEEVA, 2022).

Glicerofosfato de colina (**5**) é um glicerofosfolipídio, conhecido como uma substância nootrópica, que estimula a capacidade cognitiva, auxiliando na prevenção e

tratamento de doenças como Alzheimer e demência. Pode ser utilizado como surfactante, emulsificante e aditivo alimentício (suplemento nutricional). O composto é obtido pela fermentação de vegetais, frutas, grãos, tubérculos feita por microrganismos como *Saccharomyces cerevisiae* (OYENEYE *et al.*, 2020; TSE *et al.*, 2024).

A beauvericina (**6**) pertence a classe dos oligopeptídeos, diversas espécies do gênero *Fusarium* são conhecidas por produzirem esta micotoxina. O composto apresenta diversas atividades biológicas relatadas, como antiparasitária, antibacteriana, antifúngica e antitumoral, no entanto, também apresenta elevada citotoxicidade, podendo inviabilizar atividades celulares (HASUDA; BRACARENSE, 2024; VÁSQUEZ-BONILLA *et al.*, 2022).

(*E*)-*N*-[(2*S*)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)etil]-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enamida (**7**) é um policetídeo comumente isolado de plantas como *Physochlaina infundibularis*, apresenta atividade citotóxica, anti-inflamatória e antibacteriana. Relatos sobre microrganismos produtores do composto não foram encontradas, todavia, utilizando a plataforma MicrobeMASST, observou-se que o espectro possui semelhanças com dados espectrais de culturas fúngicas, das espécies *Aureobasidium pullulans*, *Chrysosporium merdarium*, *Trichosporiella cerebriformis* e outras (LI *et al.*, 2024).

Lyso PE (16:0) (**8**) ou 2-azaniumiletil [(2*R*)-3-hexadecanoiloxi-2-hidroxiopropil] é um glicerofosfolipídio, está presente na membrana lipídica de organismos vivos, como na bactéria Gram-negativa *Vibrio* sp. DMS14379. Por ser um lipídio de membrana celular desempenha importante papel em processos bioquímicos e fisiológicos dos organismos, além de auxiliar na defesa contra outros microrganismos pela capacidade de formação de biofilme (DANEVČIČ *et al.*, 2005; ZHANG; ROCK, 2008).

Peróxido de ergosterol (**9**) foi anotado com auxílio de bases de dados externas, pertencente à classe dos esteroides. Geralmente, é presente nas membranas celulares de fungos e bactérias, auxiliando na funcionalidade, fluidez e permeabilidade da membrana. O ergosterol possui atividades biológicas como antioxidante; anti-inflamatória (por ser capaz de suprimir mediadores de inflamação); possui atividade citotóxica, mostrando potencial para atuar contra linhagens cancerígenas; atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum* e *F. vericilloides* (RANGSINTH *et al.*, 2023; RODRIGUES, 2018).

7-hidroxi-3-[(2*R*)-2-hidroxiopropil]-5-metil-isocromen-1-ona (**10**) pertencente à classe das isocumarinas e derivados e, superclasse de policetídeos. Esta classe de substâncias é relatada por apresentar diversas atividades biológicas, como antimicrobiana, citotóxica e antioxidante. O composto foi relatado pela primeira vez sendo produzido pelo fungo

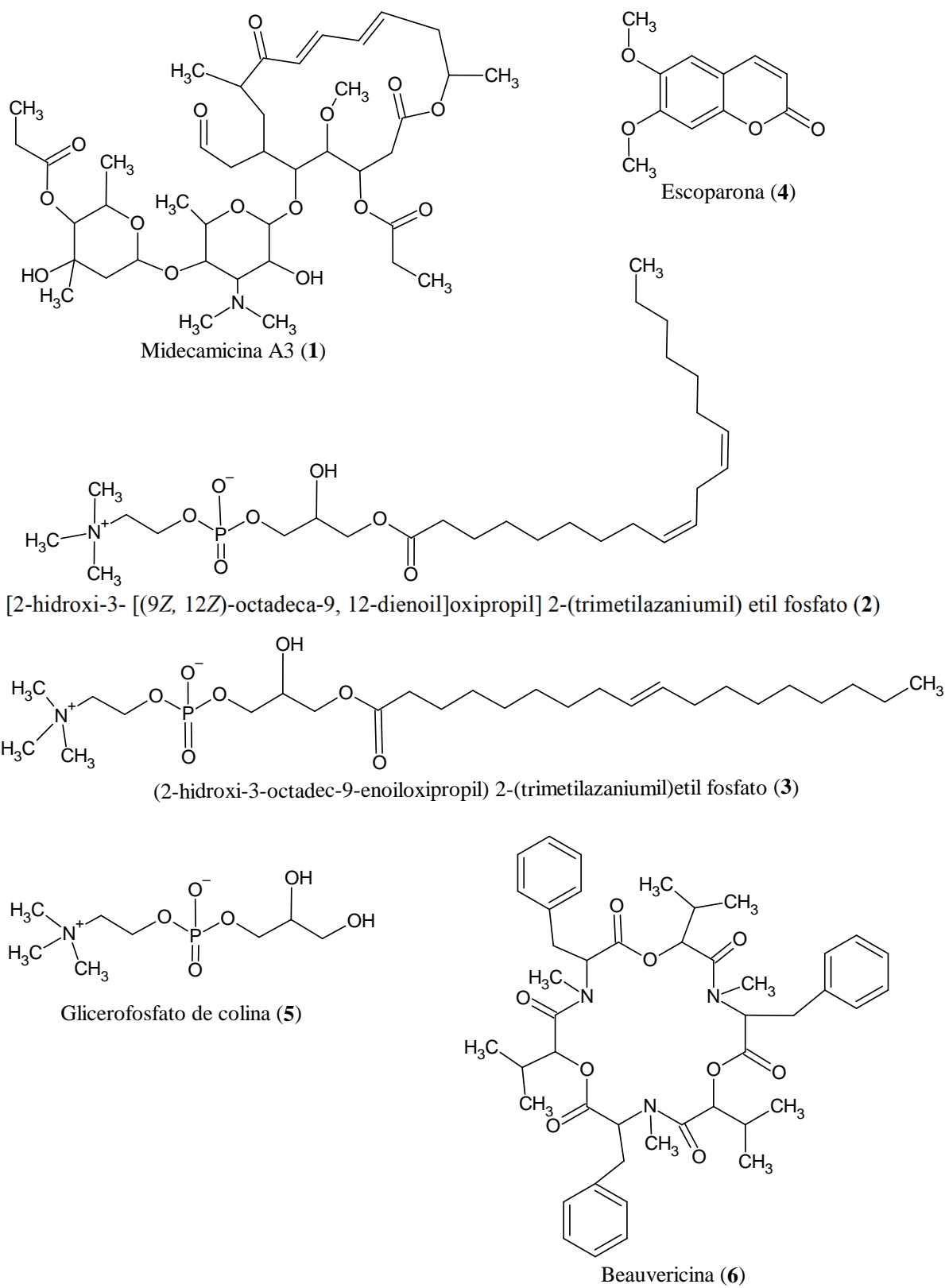
Ulocladium sp., apresentando atividade antifúngica moderada frente *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus* (HAN; CHOI; KIM, 2018; NOOR *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2012).

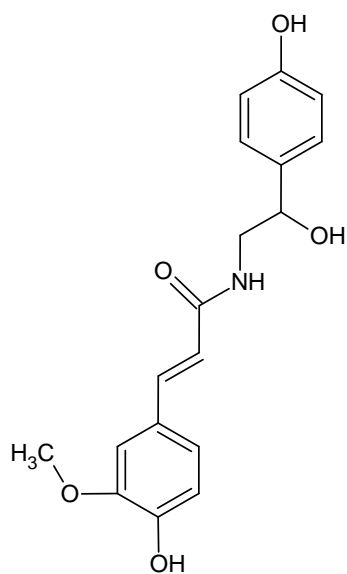
Anotou-se Monoelaidina (**11**) um monoacilglicerol lipídio, sabe-se que os ácidos graxos possuem potencial para atuarem como antibacterianos, isso se dá ao fato de evitarem que bactérias patogênicas ativem seu sistema de detecção de quórum (GOPALAKRISHNAN *et al.*, 2024; YAGHMUR; SARTORI; RAPPOLT, 2012). Encontrou-se monoelaidina em comunidades microbianas, conhecidas como tapetes microbianos, em um lago na Bacia de Cuatro Cieegas em Coahuila no México (BUENROSTRO-MUÑOZ *et al.*, 2024).

Desferrioxamina H (**12**), é classificado como um ácido graxo, da subclasse dos lipídios, apresenta semelhança com o metabólito Desferrioxamina B, isolado pela primeira vez da bactéria *Streptomyces pilosus*. Utilizado como fármaco por fazer a quelação de ferro, tratamento de excesso de metais no corpo e possui atividade anticancerígena. O metabólito também foi descrito em espécies de *Bathymodiolus* (CODD *et al.*, 2018; GEIER *et al.*, 2020). Os ácidos graxos ácido linolênico e ácido linoleico apresentam potencial para inibir o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pyrenophora avenae* e *Crinipellis pernicioso*. É comum que esses compostos atuem prejudicando a membrana celular de fungos, o que ocasiona a lise celular (WALTERS *et al.*, 2004). Esse composto é pertencente à classe dos glicerofosfolipídios, normalmente relacionado a atividade antibacteriana, principalmente em relação a bactérias Gram-positivas (VILLACORTA *et al.*, 2022).

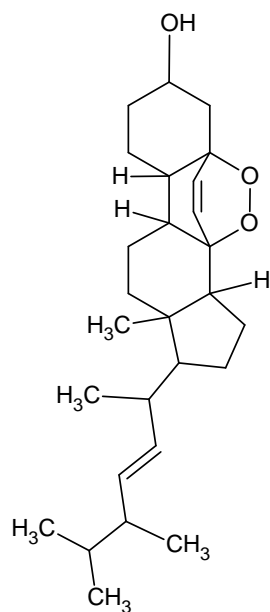
Anotou-se o composto LPC (18:1) (**13**), sendo classificado como um glicerofosfolipídio. A substância está presente na membrana celular de certas bactérias como *Rhizobium*, fazendo parte da estrutura e auxiliando na interação dos microrganismos com seus hospedeiros (GEIGER; LÓPEZ-LARA; SOHLENKAMP, 2013).

Figura 15 – Estrutura química dos compostos anotados

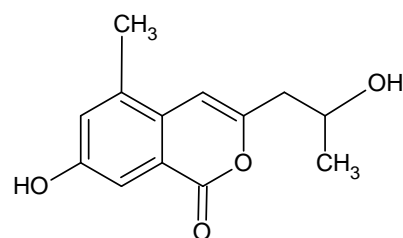




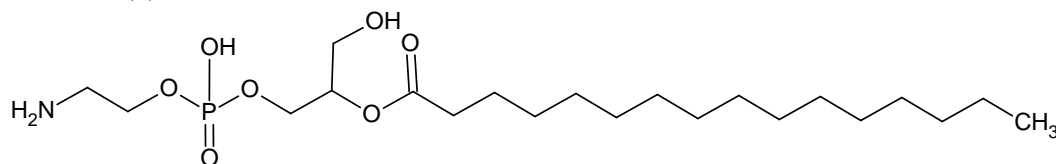
(*E*)-*N*-[(*2S*)-2-hidroxi-2-(4-hidroxiifenil)etil]-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enamida
(7)



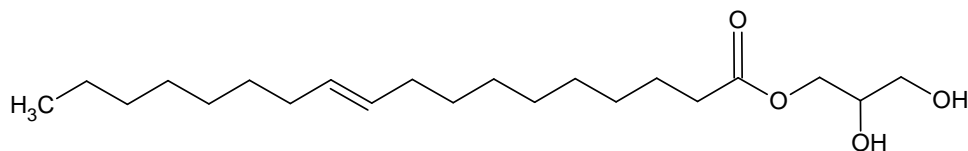
Peróxido de ergosterol (9)



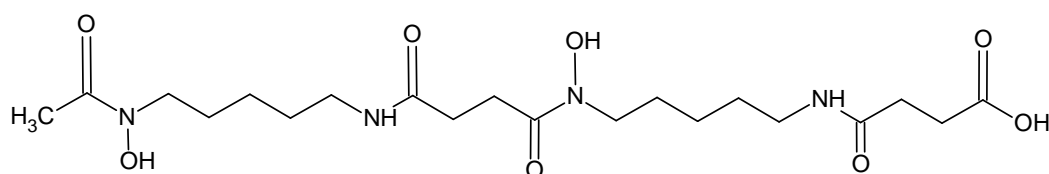
7-hidroxi-3-[(*2R*)-2-hidroxiopropil]-5-metil-isocromen-1-ona (10)



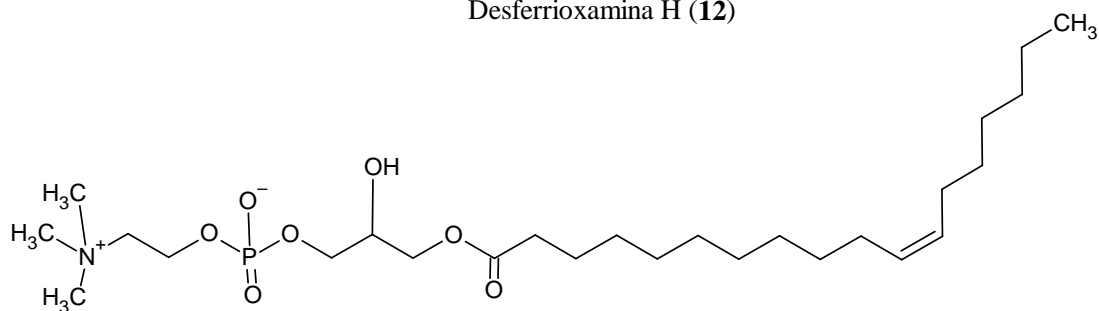
Lyso PE (16:0) (8)



Monoelaidina (11)



Desferrioxamina H (12)



LPC (18:1) (13)

Fonte: Autor, 2025.

Com o uso de novas bibliotecas espectrais na plataforma GNPS2, pode-se relacionar algumas entidades de massas presentes nas frações com espectros de massas de compostos conhecidos, assim, houve possibilidade de prever uma possível fórmula molecular e classe química dessas entidades. O íon precursor 520,34 [M+H]⁺ (**15**) possui relação espectral com Lyso PC (16:0), uma lisofosfatidilcolina presente em camadas da membrana celular de determinados organismos. Desempenha funções em processos biológicos como inflamação e aterosclerose, além disso, possui atividade bactericida. A biblioteca do GNPS2 relatou que o íon precursor 548,372 [M+H]⁺ (**16**) tem relação espectral com Lyso PC (18:0), que pode ser encontrado em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (DING *et al.*, 2021; EJSING *et al.*, 2009; RIEKHOF *et al.*, 2007; SONG; MALHI, 2019; YI *et al.*, 2017).

Os íons precursores 496,340 [M+H]⁺ (**17**), 552,330 [M+H]⁺ (**18**) e 536,334 [M+H]⁺ (**19**) apresentaram semelhança com uma lisofosfatidilcolina, Lyso PC (14:0), conhecido por apresentar efeito antiespasmódico, sendo isolado de leveduras e animais. Com os dados espectrais relacionou-se o espectro do íon precursor 524,372 [M+H]⁺ (**20**) com o espectro de Lyso PC (15:0). A entidade 412,210 [M+H]⁺ (**21**) tem vínculo espectral com Lyso PC (18:1). Ademais, o íon precursor 542,323 [M+Na]⁺ (**22**) possui relação com o composto Lyso PC (22:0) (DING *et al.*, 2021; EJSING *et al.*, 2009; RIEKHOF *et al.*, 2007; SONG; MALHI, 2019; YI *et al.*, 2017), todos compostos pertencentes a classes dos lipídeos.

A entidade de massa referente ao íon precursor m/z 545,170 [2M+Na]⁺ (**23**) obteve similaridade com o espectro de beta-D-glicose, composto da classe dos dissacarídeos, encontrado em espécies animais, bacterianas, fúngicas e plantas. É utilizado na indústria farmacêutica por possuir efeito anti-hipoglicêmico, e servir como aditivo nutricional, também é usado como estabilizante de cosméticos (MISUDA *et al.*, 2024; REYES-PÉREZ *et al.*, 2024; TIGGA *et al.*, 2024).

O íon precursor 668,421 [M+H]⁺ (**24**) apresentou relação espectral com ramnolipídio 1, um glicolipídio, normalmente, produzido por microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa*. É utilizado como biosurfactante e demonstra atividade antimicrobiana contra variedade de microrganismos (espécies de *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Phytophthora*, *Campylobacter*, *Fusarium*) e atividade anticancerígena (NEJATIAN; ABBASI, 2022; THAKUR *et al.*, 2021). Ao espectro referente ao íon 684,202 [M+NH₄]⁺ (**25**) a biblioteca forneceu o composto 2-[3, 4-bis[[[(2S, 3R, 4S, 5S, 6R)-3, 4, 5-tri-hidroxi-6-(hidroximetil)-oxan-2-il]-oxi]-fenil]-5, 7-di-hidroxicromen-4-ona, um flavonoide, com poucos relatos na literatura, sendo apresentado nas bases de dados GNPS, COCONUT e Pubchem.

O composto 7b, 9-di-hidroxi-3-(hidroximetil)-1, 1, 6, 8-tetrametil-5-oxo-1, 1a, 1b, 4, 4a, 5, 7a, 8, 9-deca-hidro-9ah-ciclopropa-[3, 4]-benzo-[1, 2-e]-azulen-9a-il acetato foi determinado pela base de dados do GNPS2 como tendo semelhança espectral a entidade 670,469 $[M+C_2H_3N+H]^+$ (**26**). Trata-se de um diterpeno encontrado em plantas como *Duguetia lanceolata*, *Xylopiá emarginata* e *X. sericea*, possui atividade antimicrobiana e atividade anticancerígena (determinada pelo *National Center for Advancing Translational Sciences* – NCATS) (“National Center for Biotechnology Information”, 2025; PARES *et al.*, 2021).

Para o espectro referente ao íon 432,239 $[M-H_2O+H]^+$ (**27**) tem-se gelomulida N como espectro relacionado, da classe dos diterpenoides, obtido de plantas, os análogos de gelomulida apresentam atividade citotóxica frente a células cancerígenas de pulmão, seio e fígado (LEE *et al.*, 2008). O íon precursor 276,108 $[M-2H_2O+H]^+$ (**28**) apresenta semelhança espectral com N-acetil-D-glucosamina, um açúcar aminado, presente na parede celular de fungos e bactérias. Pode ser encontrado na forma polimérica como quitina, relatado como imunomodulador e tendo capacidade de controlar doenças inflamatórias (HOSEINI *et al.*, 2020; YANG; YU, 2014).

O íon precursor 346,332 $[M+H]^+$ (**29**) apresentou semelhança espectral com tetradecildietanolamina, um ácido graxo, isolado de insetos (*Aspongopus chinensis*), e bactérias (*Pantoea* sp.), apresenta atividade citotóxica (DOS SANTOS OLIVEIRA *et al.*, 2024; ZHANG *et al.*, 2022). O composto lauramidopropil dimetilamina foi relacionado, através dos bancos de dados, com a entidade 313,322 $[M+H]^+$ (**30**), uma amida, utilizada como ingrediente em cosméticos por possuir propriedades surfactantes (SHAKIL HUSSAIN; KAMAL; SULTAN, 2017).

O íon precursor 420,261 $[M+H]^+$ (**31**), possui semelhança espectral com citrato de acetil tributil, um ácido graxo, utilizado como saborizante e aromatizante, além disso, é usado como plastificante. Do íon precursor 399,359 (sem aduto) (**32**) obteve-se semelhança espectral com miristamidopropil betaina, é um surfactante usado na indústria cosmética (CHOI *et al.*, 2024; FERREIRA *et al.*, 2024).

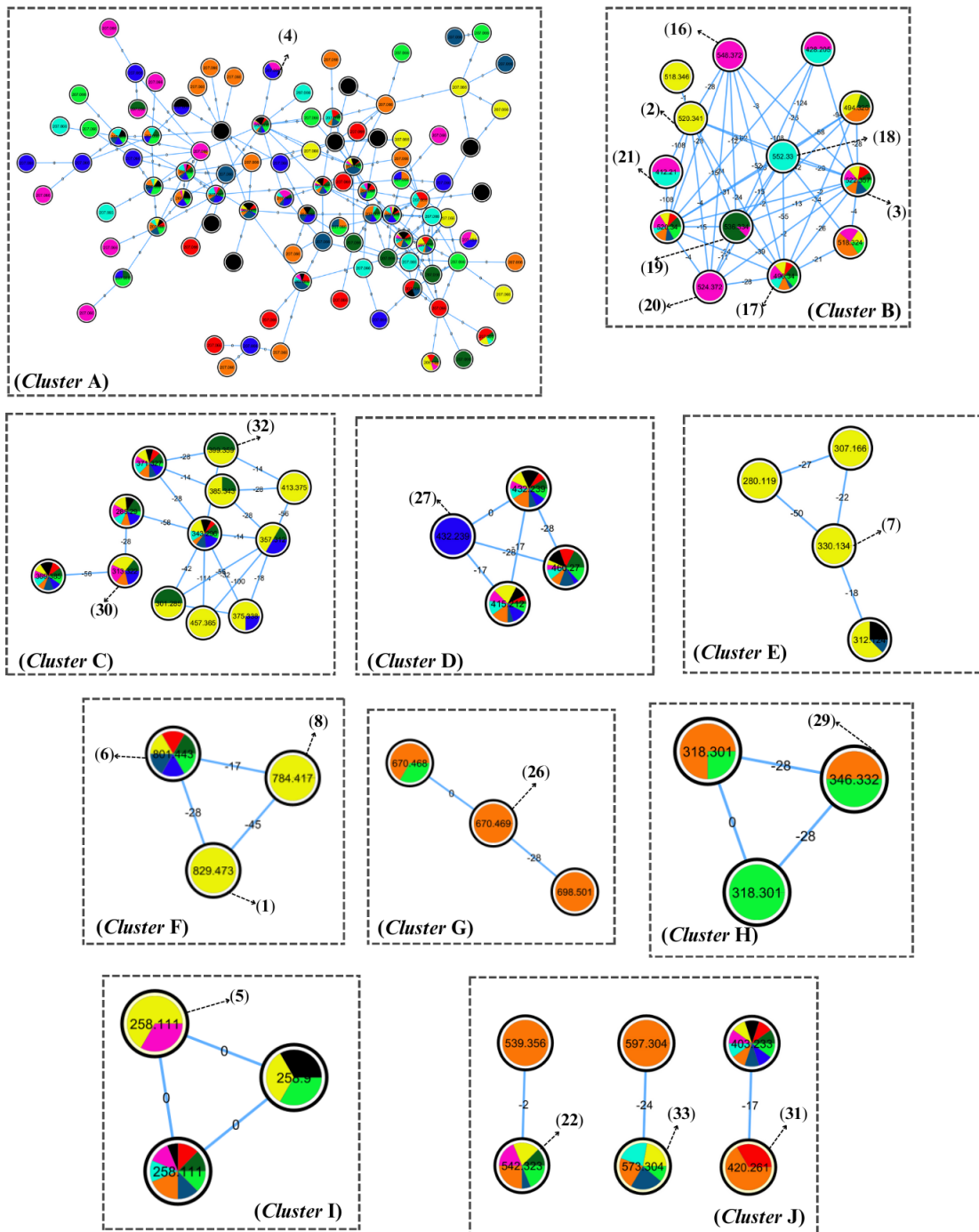
O composto palmitato de 2-(2-hidroxi-3-(2-hidroxietoxi)-propoxi)-etil apresentou semelhança espectral com o íon precursor 573,304 $[M-H_2O+H]^+$ (**33**), há poucas informações sobre a substância, estando registrada em *Food and Drug Administration* (FDA) *Global Substance Registration System* (GSRS). A entidade 372,312 $[M+H]^+$ (**34**), possui semelhança espectral com monooleína-d5, não foram encontrados relatos significativos sobre esse composto. O composto beta-gentiobiose apresentou relação com a entidade 702,265 $[2M+H]^+$

(35), é um dissacarídeo isolado de plantas (*Crocus sativus*) (WOLFENDER; URBAIN; HOSTETTMANN, 2015).

A figura 16 mostra os *clusters* em que foi possível fazer a anotação de compostos, ou determinação da classe presente nos nodos. O *cluster* A apresenta maior quantidade de nodos entre os *clusters* obtidos na rede molecular, com 97 nodos e 178 *edges*, há variedade entre as frações atribuídas às entidades de massas, o composto escoparona (4) está presente na entidade de massa com valor de m/z de 207,066. Diversos compostos anotados encontram-se em nodos isolados.

O *cluster* B apresenta 12 nodos e 43 *edges*, a partir das bibliotecas espectrais determinou-se que a maioria das entidades de massas presentes nesse *cluster* possuem relação espectrais com compostos da classe das lisofosfatidilcolina, como Lyso PC (15:0), Lyso PC (14:0), Lyso PC (16:0), Lyso PC (18:0) e Lyso PC (18:1). Os lisofosfatidilcolina potencializam a atividade antibacteriana de polimixina B contra bactérias gram-negativas (YADAV; ISMAEEL; QADRI, 2020). No *cluster* C obteve-se 11 nodos e 19 *edges*, a entidade de massa 312,322 $[M+H]^+$ (30) está presente nesse *cluster*, com os dados espectrais do conjunto determinou-se semelhança com algumas aminoproil betaínas, como miristamidopropil betaína e cocamidopropil betaína, utilizados na indústria cosmética como surfactantes (MARASCHIN; DE PAULA; CARISSIMI, 2024; BURNETT *et al.*, 2012).

Figura 16 – Clusters da rede molecular com compostos anotados



Legenda:

- Cg45
- 13x45
- Controle
- 43x45
- SS
- 13xSS
- Cg13
- 43xSS
- 45xSS
- Cg43

Fonte: Autor, 2025

5.4 Ensaios antimicrobianos

O fitopatógeno *S. sclerotiorum* é considerado um problema por infectar uma grande quantidade de espécies de interesse econômico, como soja, feijão, girassol e outros, sendo

responsável por perdas consideráveis em produções agrícolas. Trata-se de um fungo de difícil controle, podendo ser transmitido pelo ar e pelo solo, e por produzir estruturas de resistência, os escleródios (XIA *et al.*, 2019). A produção de extratos brutos dos fungos em cocultivos foi proposta para analisar se o estresse causado pela interação entre os endófitos e o patógeno gerou a produção de compostos antifúngicos (GONZÁLEZ *et al.*, 2024; GUO; XI; LU, 2024; KNOWLES *et al.*, 2022).

Na tabela 7, nota-se que as frações obtidas dos cocultivos 45xSS e 13x43 apresentaram percentuais de inibição consideráveis frente ao fitopatógeno (figura 17). O cocultivo *Fusarium* sp. Cg45 e *S. sclerotiorum* (45xSS), apresentou resultado estatístico diferente dos monocultivos de *S. sclerotiorum* e do extrato de *Fusarium* sp. Cg45, indicando que o cocultivo produziu compostos com atividade antifúngica. Além disso, houve diferença estatística em relação aos demais extratos que possuíam algum microrganismo em comum, podendo estes serem relacionados a monocultivos ou cocultivos, indicando que a interação entre *Fusarium* sp. Cg45 e *S. sclerotiorum* e *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 e *Fusarium* sp. Cg43 induziu a produção de compostos antifúngicos.

O potencial de aplicação de coculturas fúngicas para controle de fungos patogênicos é relatada em diversos artigos, como por exemplo, o cocultivo entre *Trichoderma atroviride* SG3403 e *Bacillus subtilis* 22, possibilitou a produção de metabólitos com atividade antifúngica, como coningina A e mevastatina. No estudo, o produto fermentado do cocultivo apresentou inibição de fungos como *Rhizoctonia solani* (71,4%), *Botrytis cinerea* (57,1%) e *F. graminearum* (54,2%) (LI *et al.*, 2020).

Tabela 7. Percentual de inibição do ensaio antifúngico contra *Sclerotinia sclerotiorum*

Frações	*Médias (mm)	***Resultado do teste	Percentual de inibição (%)
Controle (-)	41,08	g	-
DMSO	33,21	e	18,99
Cg43	26,61	b	35,22
Cg45	29,01	c	29,38
13xSS	31,35	d	23,69
43xSS	27,72	b	32,53
45xSS	22,32	a	45,67
13x43	22,88	b	44,30
13x45	27,84	b	32,23
43x45	27,78	b	32,37
SS	23,41	b	42,91
**DV =	9,48%		

*Médias (mm): médias de crescimento do fitopatógeno *S. sclerotiorum*. **Desvio padrão. ***Grupos estatísticos referentes às médias de crescimento da colônia do fitopatógeno.

Fonte: Autor, 2024.

Figura 17 – Ensaio antifúngico de poços difusos contra *Sclerotinia sclerotiorum*

(DMSO) Dimetilsulfóxido; (13x45) extrato bruto referente ao cocultivo entre Cg13 e Cg45; (13x43) extrato bruto referente ao cocultivo entre Cg13 e Cg43; (43xSS) extrato bruto referente ao cocultivo entre Cg43 e SS; (45xSS) extrato bruto referente ao cocultivo entre Cg45 e SS; (Cg43) extrato bruto referente ao monocultivo Cg43; (Cg45) extrato bruto referente ao monocultivo Cg45; (SS) extrato bruto referente ao monocultivo *S. sclerotiorum*.

Fonte: Autor, 2024.

A fração 45xSS é o cocultivo entre o endófito *Fusarium* sp. Cg45 e o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, este apresentou 45,67% de inibição do fungo fitopatogênico alvo. Em seguida, tem-se o cocultivo 13x43 (entre os endófitos *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 e *Fusarium* sp. Cg43), que inibiu o crescimento micelial do patógeno em 44,30%.

O gênero *Fusarium* é conhecido por produzir metabólitos bioativos como fusaripeptídeo A, um potente antifúngico contra diversas espécies. Os compostos acuminados A, B, C e D isolados de *F. lateritium* apresentaram potencial antifúngico contra *P. digitatum* (AHMED *et al.*, 2023). Do fungo não patogênico *Fusarium oxysporum* foi isolado o composto ciclosporina A, o qual causa inibição do crescimento e supressão da formação de escleródios de *S. sclerotiorum*, mostrando a capacidade do gênero em produzir metabólitos antifúngicos (RODRÍGUEZ; CABRERA; GODEAS, 2006).

Algumas espécies do gênero *Neopestalotiopsis* são descobertas como tendo capacidade de produção de metabólitos antifúngicos, Tanapichatsakul *et al.* (2019) isolou de folhas de *Cinnamomum loureiroi* um *Neopestalotiopsis* sp. com elevada capacidade de produção de eugenol, composto utilizada na agricultura por possuir atividade antimicrobiana. Da cepa de *N. clavispora* AL01 (TANAPICHATSAKUL *et al.*, 2019). Duas cepas do gênero *Neopestalotiopsis* codificadas como AS-857 e AS-860, mostraram-se promissoras como agentes antagonistas de *Cryphonectria parasitica* (GONZÁLEZ; ESTEFANÍA, 2020).

A dinâmica química que ocorreu durante o cocultivo promoveu a produção de uma nova gama de compostos, tendo em vista que compostos com atividade antimicrobiana é o principal interesse do uso desta técnica neste projeto. Por meio das redes moleculares e análises cromatográficas, pode-se determinar que a fração do cocultivo 45xSS apresentou 57 entidades de massas exclusivas.

O peróxido de ergosterol (**9**) foi anotado nas frações ativas 45xSS e 13x45, sabe-se que a espécie fúngica *Paecilomyces cicadae* é relatada como produtora de peróxido de ergosterol (**9**), que apresentou capacidade inibitória na proliferação de células cancerígenas. Esse metabólito é descrito como um inibidor antiviral, sendo um provável inibidor da proteína do receptor Mpro (HE *et al.*, 2018; ROY *et al.*, 2024). O ergosterol faz parte da membrana fúngica, sendo importante para o desenvolvimento do microrganismo, sendo assim, as drogas antifúngicas visam atingir a biossíntese do ergosterol para tratar infecções fúngicas. Algumas drogas antifúngicas têm como alvo o ergosterol, por esse possibilitar resistência antifúngica do microrganismo (ALCAZAR-FUOLI; MELLADO, 2013). Determinados tipos de ergosteróis apresentam atividade antifúngica, como é o caso de fusaisterol A, isolado do

endófito *Fusarium* sp. obtido da planta *Mentha longifolia*, o composto apresentou atividade inibitória contra *Candida albicans* (IBRAHIM *et al.*, 2018a).

A beauvericina (6), anotada nas frações ativas 45xSS, 43x45 e 13x45, é uma micotoxina que apresenta potencial antifúngico, havendo relatos de atividade contra *Candida parapsilosis* e *C. albicans*. Há também análogos de beauvericina que apresentam atividade antifúngica, como a beauvericina K, isolada de espécie de *Fusarium* (CALONI *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2016). Não houve anotação de composto exclusivo a fração 45xSS. Dessa forma, sugere-se que os nodos produzidos pelo cocultivo representam algum metabólito de interesse capaz de inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

Há poucos relatos do gênero *Fusarium* produzindo compostos com atividade frente *S. sclerotiorum*. O endófito *Fusarium* sp. Cg45 é capaz de biossintetizar metabólitos antagonistas, contudo, observa-se que o estresse proporcionado pelo cocultivo ativa os *clusters* de genes silenciados responsáveis pela síntese desses metabólitos antifúngicos, visto que o monocultivo Cg45 não apresenta atividade antifúngica considerável (BESSA, 2022).

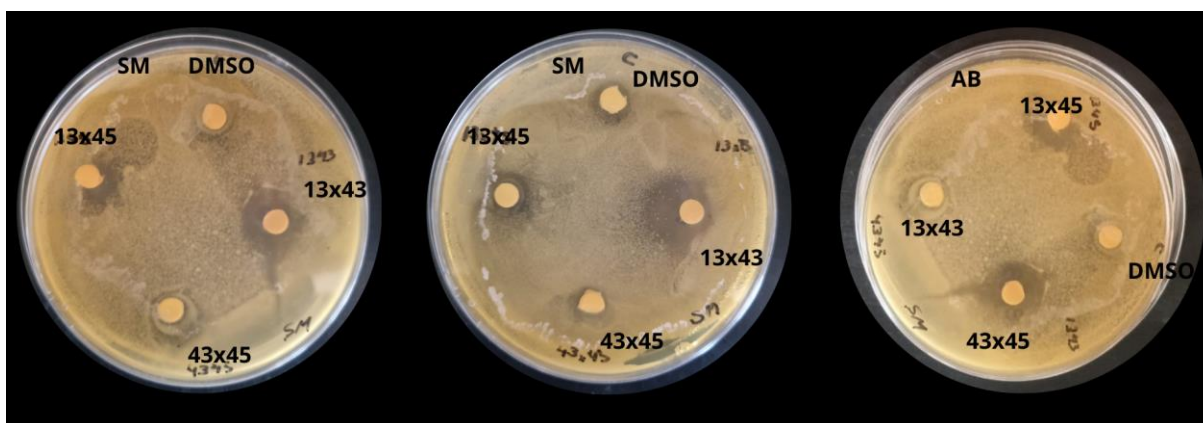
Em relação à atividade antibacteriana, testou-se as frações frente às bactérias gram-negativas *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia*. A bactéria *Acinetobacter baumannii* é um patógeno listado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como prioritário no desenvolvimento de novos antibióticos, por possuir resistência a carbapenêmicos e diversos medicamentos, sendo considerado de nível crítico. Afeta, principalmente, pacientes que apresentam algum grau de enfermidade, é um microrganismo de disseminação global e altamente adaptativo (MEA; YONG; WONG, 2021). *A. baumannii* é resistente a penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactamas, aminoglicosídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas e outros antibióticos. Contudo, estudos relatam o composto polimixina B, da classe de polipeptídios cíclicos, como possível tratamento terapêutico (KUMAR; ANWER; AZZI, 2021; KYRIAKIDIS *et al.*, 2021).

A bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* é conhecida por ser um bacilo, não fermentador, e, atuar como um patógeno oportunista, resistente a diversos fármacos, além de ser pouco conhecida. A OMS lista como um patógeno emergente considerado preocupante. O agente ativo recomendado para o tratamento da infecção é trimetoprima-sulfametoxazol (pertencendo a classe de éteres fenólicos e sulfonamida), no entanto, já há indícios de cepas que possuem resistência ao agente (MOJICA *et al.*, 2022; SAID; TIRTHANI; LESHU, 2024).

Testou-se as frações de álcool metílico 80% dos monocultivos e cocultivos para avaliar a atividade antibacteriana destes (figura 18), realizando a avaliação de forma qualitativa (Tabela 8). Notou-se que as frações referentes aos cocultivos 13x45 e 13x43

obtiveram atividade antimicrobiana frente *Stenotrophomonas maltophilia* e as frações 13x45 e 43x45 apresentaram atividade frente *A. baumannii*. Enquanto os monocultivos de todos os fungos foram inativos e os cocultivos com *S. sclerotiorum*.

Figura 18 – Ensaio antibacteriano contra *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter baumannii*



(**SM**) *Stenotrophomonas maltophilia*; (**AB**) *Acinetobacter baumannii*; (**DMSO**) Dimetilsulfóxido; (**13x45**) extrato bruto referente ao cocultivo entre Cg13 e Cg45; (**13x43**) extrato bruto referente ao cocultivo entre Cg13 e Cg43; (**43x45**) extrato bruto referente ao cocultivo entre Cg43 e Cg45.

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 8. Atividade antibacteriana qualitativa das frações obtidas dos cultivos dos fungos

Frações	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
DMSO	-	-
Cg13	-	-
Cg43	-	-
Cg45	-	-
SS	-	-
13xSS	-	-
43xSS	-	-
45xSS	-	-
13x43	-	++
13x45	++	++
43x45	++	-

(-) não houve inibição; (+) pouca inibição; (++) houve inibição; (+++) inibição considerável.

Fonte: Autor, 2024.

Todos os cocultivos realizados entre as cepas de fungos endofíticos apresentaram potencial de inibir ao menos uma das bactérias, sendo que o cocultivo referente aos endófitos *Neopestalotiopsis* sp. Cg13 e *Fusarium* sp. Cg45 (13x45) inibiu ambas as cepas patogênicas. Ao analisar o perfil cromatográfico entre as frações Cg13, Cg45 e 13x45 existe considerável divergência entre os picos apresentados nos monocultivos com o cocultivo, que apresentou 199 entidades de massas exclusivas. Entre os metabólitos exclusivos dessa fração, têm-se escoparona (4), que apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *E. coli* e *S. aureus* (YANG *et al.*, 2010).

À fração 43x45 foi atribuído 55 nodos exclusivos em relação a análise total entre as frações. Como a interação entre os endófitos é descrita como sendo um consórcio cooperativo, pode-se presumir que houve aumento de produção de substâncias antibióticas, fundamental para sobrevivência dos microrganismos na natureza (GUO; XI; LU, 2024).

As frações 13x45 e 13x43 tiveram em seus cocultivos a presença do fungo endofítico *Neopestalotiopsis* sp. Cg13, esse gênero possui relatos apontando seu potencial como produtor de compostos antibacterianos. Utilizando nanopartículas de prata e um filtrado de células livres de *N. clavispora* investigaram a capacidade do material em atuar como antibacteriano, antibiofilme e contra efeitos genotóxicos, o material inibiu o crescimento de *Bacillus subtilis*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (KAHRAMAN *et al.*, 2021). A cepa de *Neopestalotiopsis* sp. SKE15 foi identificada como produtora de exopolissacarídeo, o qual apresenta atividade frente *B. subtilis* e *S. aureus* (FOOLADI *et al.*, 2019).

O gênero *Fusarium*, presente nos cocultivos como fungos Cg45 e Cg43, também é conhecido pelo potencial de produção de metabólitos que inibem bactérias Gram-negativas. A micotoxina ácido fusárico, comum em quase todas as espécies do gênero, é descrita como um agente em potencial para inibição de *A. baumannii* (XU *et al.*, 2023a). Além desse, o metabólito beauvericina (6), produzido pelo gênero *Fusarium*, é relatado como um composto com diversidade de aplicações, sendo eficaz em inibir bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O cocultivo entre *F. oxysporum* AB2 e *Epicoccum nigrum* TORT mostrou-se eficiente como um método para aumentar a produção de beauvericina (VÁSQUEZ-BONILLA *et al.*, 2022).

5.5 Ensaio citotóxico

Para o ensaio de citotoxicidade utilizou-se as células aderentes HaCaT (queratinócitos humanos, não tumoral) e HCT-116 (epitelial humana, câncer de cólon). A

tabela 9 apresenta que nenhuma amostra apresentou citotoxicidade. Para ser considerado citotóxico a fração precisaria apresentar 20% de morte celular em relação ao controle negativo empregado (DMSO). Como controle positivo, utilizou-se paclitaxel, que apresentou 95% de morte celular em relação ao DMSO.

As frações dos monocultivos e cocultivos não apresentaram citotoxicidade para as duas linhagens celulares testadas, indicando que as frações e os microrganismos são seguros para uso em áreas de interesse, como farmacêutico e agrícola.

Tabela 9. Ensaio de citotoxicidade das frações

	Fração	Morte celular (%) a 4,5 µg/mL ou 4,5 µM*		Linhagem EC ₅₀ (g/mL)		
		HaCaT %	HCT-116 %	HaCaT	HCT-116	(IS)
1	Branco	1	0	> 39.8E-06	> 39.8E-06	N.D.
2	13xSS	3	1	> 39.8E-06	> 39.8E-06	N.D.
3	45xSS	4	2	> 39.8E-06	> 39.8E-06	N.D.
4	43xSS	1	2	> 39.8E-06	> 39.8E-06	N.D.
5	43x45	1	0	> 39.8E-06	> 39.8E-06	N.D.
6	13x45	0	1	> 39.8E-06	> 39.8E-06	N.D.
7	SS	0	0	> 39.8E-06	> 39.8E-06	N.D.
8	Cg 45	0	0	> 39.8E-06	> 39.8E-06	N.D.
9	Cg 43	0	0	> 39.8E-06	> 39.8E-06	N.D.
10	Cg 13	2	0	> 39.8E-06	> 39.8E-06	N.D.
11	Paclitaxel	97	95	2,7E-09	2,5E-09	1,1

(EC₅₀) concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo; (IS) índice de seletividade inicial; (ND) não determinado.

Fonte: Autor, 2024.

Apesar de não apresentarem atividade citotóxica, algumas espécies de fungos são conhecidas como produtores de compostos que possuem atividade citotóxica, como o paclitaxel, bioativo utilizado como uma droga anticancerígena, produzido por diversas cepas do gênero *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* e outras (ISMAIEL *et al.*, 2017; VU *et al.*, 2023). Do fungo *Neopestalotiopsis* sp. SKE15 identificou-se a produção de exopolissacarídeo, composto por glicose, galactose e sorbitol, a atividade citotóxica do produto obtido do fungo foi avaliada, e, determinou-se que o exopolissacarídeo inibe consideravelmente a proliferação

de células HeLa e de células de câncer de mama, com inibição de 61% e 56% respectivamente (FOOLADI *et al.*, 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A estratégia de cocultivos tem como intuito aprimorar a produção metabólica dos fungos, além de possibilitar a produção de compostos que apresentam atividades biológicas específicas. O perfil químico dos monocultivos e cocultivos mostrou que, o crescimento dos fungos endofíticos em sistemas de interação com outros microrganismos possibilitou a formação de compostos não produzidos nos cultivos axênicos. Por meio das redes moleculares construídas com a plataforma GNPS2, anotou-se 35 compostos em diferentes níveis de anotação, desses, sugeriu-se a classe de 21 compostos, definidos como níveis 4 ou 5. Houve possibilidade de determinar a estrutura química e o composto correspondente de 14 entidades de massas, sendo esses, midecamicina A3, [2-hidroxi-3- [(9Z, 12Z)-octadeca-9, 12-dienoil]oxipropil] 2-(trimetilazaniumil) etil fosfato, (2-hidroxi-3-octadec-9-enoiloxipropil) 2-(trimetilazaniumil) etil fosfato, Escoparona, Glicerofosfato de colina, Beauvericina, (*E*)-*N*-[(2*S*)-2-hidroxi-2-(4-hidroxifenil)etil]-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)prop-2-enamida, Lyso PE (16:0), Peróxido de ergosterol, 7-hidroxi-3-[(2*R*)-2-hidroxi-3-propil]-5-metil-isocromen-1-ona, Monoelaidina, Desferrioxamina H, LPC (18:1)

Em relação à atividade antimicrobiana, os cocultivos estimularam a produção de metabólitos com atividade antifúngica e antibacteriana, demonstrando uma possível ativação de *clusters* de genes silenciados responsáveis pela produção de compostos bioativos. No ensaio antifúngico, a fração 45xSS apresentou maior potencial de inibição de *S. sclerotiorum*, indicando a necessidade da interação fungo-fungo para a produção de substâncias de caráter antagonista. Para o ensaio antibacteriano, os cocultivos entre os endófitos foram os únicos capazes de inibir o desenvolvimento das bactérias patogênicas *S. maltophilia* e *A. baumannii*, com ênfase para os extratos 13x45 e 13x43. Os extratos brutos dos monocultivos e cocultivos não demonstraram potencial citotóxico frente às células HaCaT e HCT-116, indicando que não houve produção de compostos considerados citotóxicos.

Por fim, observa-se que, a produção metabólica dos cocultivos, mesmo que possuindo menor diversidade química, apresentou maior eficácia na produção de compostos bioativos com potencial antifúngico e antibacteriano. Além disso, por não apresentar atividade citotóxica contra as linhagens de células humanas, os microrganismos e as frações obtidas mostram-se como promissores agentes de biocontrole, podendo haver atuação nos setores agrícola e farmacêutico.

REFERÊNCIAS

- ADELEKE, B. S. *et al.* Biocontrol mechanisms of endophytic fungi. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 1, p. 46, 24 abr. 2022.
- ADELEKE, B. S.; BABALOLA, O. O. Pharmacological Potential of Fungal Endophytes Associated with Medicinal Plants: A Review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 147, fev. 2021.
- AHMED, A. M. *et al.* The endophytic *Fusarium* strains: a treasure trove of natural products. **RSC Advances**, v. 13, n. 2, p. 1339–1369, 3 jan. 2023.
- AI, H.-L. *et al.* Four New Highly Oxygenated Eremophilane Sesquiterpenes from an Endophytic Fungus *Boeremia exigua* Isolated from *Fritillaria hupehensis*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 5, p. 492, maio 2022.
- ALAM, B. *et al.* Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa? **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 17 dez. 2021.
- ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Ergosterol biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*: its relevance as an antifungal target and role in antifungal drug resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 10 jan. 2013.
- ALVES, J. M.; MORAIS, G. A. Biomass Brasileiros, Conhecer para proteger. **Anais do semex**, n. 12, 2019.
- AMORIM, S. S. Taxonomia, diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados à planta medicinal *Lafoensia pacari* A. St. Hil. (mangava-brava) presente no Pantanal Matogrossense. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 20 ago. 2018.
- ARIANTARI, N. P. *et al.* Expanding the chemical diversity of an endophytic fungus *Bulgaria inquinans*, an ascomycete associated with mistletoe, through an OSMAC approach. **RSC Advances**, v. 9, n. 43, p. 25119–25132, 2019.
- ARON, A. T. *et al.* Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, v. 15, n. 6, p. 1954–1991, jun. 2020.
- ARRIEL-ELIAS, M. T. *et al.* Molecular networking as a tool to annotate the metabolites of *Bacillus* sp. and *Serratia marcescens* isolates and evaluate their fungicidal effects against *Magnapothe oryzae* and *Bipolaris oryzae*. **3 Biotech**, v. 13, n. 5, p. 148, 28 abr. 2023.
- AZEVEDO, E.; BARATA, M. Diversidade no reino Fungi e aplicações à Indústria. **Revista de Ciência Elementar**, v. 6, n. 4, 2018.
- BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 1 abr. 2016.
- BESSA, D. M. O. **Atividade antagonista de fungos endofíticos associados a *Clitoria guianensis* Benth.** 2022. Monografia (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2022.

- BHATTACHARYA, S. *et al.* Diversity of fungal endophyte of *Ananus comosus* L. var. kew from *Unokoti district*, Tripura with bioactive potential of *Neopestalotiopsis piceana*. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 2, p. 353–360, jan. 2019.
- BRAGA, H. F.; DO PRADO, H. F. A. Micodiversidade no Cerrado: relatos nos últimos anos. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 8, n. 4, p. 339–348, 12 out. 2020.
- BRASIL, M. DO M. AMBIENTE E M. DO C. **Cerrado**. Brasil: Governo Federal, 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade-e-biomas/ecossistemas/biomas/cerrado>>. Acesso em: 10 ago. 2024.
- BRASIL, Ministério do Meio Ambiente e Mudanças Climáticas. **Cerrado**. Brasil: Governo Federal, 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade-e-biomas/ecossistemas/biomas/cerrado>>. Acesso em: 10 ago. 2024.
- BUENROSTRO-MUÑOZ, J. *et al.* Metabolomic Diversity in Microbial Mats Under Different Environmental Conditions: A Tool to Test Microbial Ecosystem Chemical Change. **Chemistry & Biodiversity**, v. 21, n. 6, p. e202300829, jun. 2024.
- BURNETT, C. L. *et al.* Final Report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel on the Safety Assessment of Cocamidopropyl betaine (CAPB). **International Journal of Toxicology**, v. 31, n. 4_suppl, p. 77S-111S, ago. 2012.
- CALONI, F. *et al.* Beauvericin: The beauty and the beast. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 75, p. 103349, 1 abr. 2020.
- CHAGA, L. M.; RODRIGUES, T. T. M. S.; SILVA, G. G. Metabólitos de fungos endofíticos da mata seca com potencial de biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Natural Resources**, v. 13, n. 1, p. 71–82, 21 mar. 2023.
- CHAPLA, V. M. *et al.* Griseofulvin, Diketopiperazines and Cytochalasins from Endophytic Fungi *Colletotrichum crassipes* and *Xylaria* sp., and Their Antifungal, Antioxidant and Anticholinesterase Activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 1707–1713, ago. 2018.
- CHOI, H. *et al.* Identification of candidate exposure biomarkers for acetyl tributyl citrate and acetyl triethyl citrate using suspect screening in human liver microsomes. **Environment International**, v. 192, p. 108980, 1 out. 2024.
- CODD, R. *et al.* Advances in the Chemical Biology of Desferrioxamine B. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 1, p. 11–25, 19 jan. 2018.
- CUNHA, C. *et al.* A New Isoflavone and Other Constituents from Roots of *Clitoria guianensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.
- DANEVČIČ, T. *et al.* Effects of lipid composition on the membrane activity and lipid phase behaviour of *Vibrio* sp. DSM14379 cells grown at various NaCl concentrations. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1712, n. 1, p. 1–8, 15 jun. 2005.
- DE MELO, A. C. A.; MARTINS, P. T. D. A. Contribuição das áreas de proteção ambiental na conservação do cerrado. **Revista de Geografia**, v. 37, n. 2, p. 53, 9 ago. 2020.

- DE PÁDUA, A. P. S. L. *et al.* Antifungal susceptibility of the endophytic fungus *Rhinochrysiella similis* (URM 7800) isolated from the Caatinga dry forest in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 2093–2100, 1 dez. 2022.
- DING, J. *et al.* A metabolome atlas of the aging mouse brain. **Nature Communications**, v. 12, p. 6021, 15 out. 2021.
- DOS REIS, J. B. A. *et al.* The hidden treasures in endophytic fungi: a comprehensive review on the diversity of fungal bioactive metabolites, usual analytical methodologies, and applications. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 4, p. 185, 20 mar. 2024.
- DOS REIS, J. B. A.; DO VALE, H. M. M.; LORENZI, A. S. Insights into taxonomic diversity and bioprospecting potential of Cerrado endophytic fungi: a review exploring an unique Brazilian biome and methodological limitations. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 11, p. 202, 24 ago. 2022.
- DOS SANTOS OLIVEIRA, J. A. *et al.* Radiotolerant endophytic bacteria and analysis of the effects of ¹³⁷Cesium on the metabolome of *Pantoea* sp. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 31 jul. 2024.
- DURAND, G. A.; RAOULT, D.; DUBOURG, G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, n. 4, p. 371–382, 1 abr. 2019.
- DURIGAN, G. Plantas pequenas do cerrado: biodiversidade negligenciada. 2018.
- EJSING, C. S. *et al.* Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 7, p. 2136–2141, 17 fev. 2009.
- ELLIS, J. L. *et al.* Effects of lactic acid bacteria silage inoculation on methane emission and productivity of Holstein Friesian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 9, p. 7159–7174, 1 set. 2016.
- FERRAZ, L. F. *et al.* Biotechnological potential of the endophytic fungi isolated from *Clitoria guianensis*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 12, n. 2, p. 82–91, 3 jun. 2024.
- FERREIRA, A.P.; MATEUS, N.J.; OLIVEIRA, J.A.S.; PAMPHILE, J.A.; AZEVEDO, J.L. Bioprospecting endophytic *Diaporthe* species associated with *Pachystachys lutea* (Acanthaceae) with antagonistic effect against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Luminária**, União da Vitória, v.23, n.02, p. 13 – 21, 2021
- FERREIRA, P. S. *et al.* Production methods and applications of bioactive polylactic acid: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 22, n. 4, p. 1831–1859, 1 ago. 2024.
- FERREIRA, R. R.; CRUZ, J. S.; HAMERSKI, L. Estratégia OSMAC: Um Método Acessível para a Descoberta de Novas Substâncias Microbianas. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 5, 31 out. 2022.
- FONTANA, D. C. *et al.* Endophytic Fungi: Biological Control and Induced Resistance to Phytopathogens and Abiotic Stresses. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 570, maio 2021.

FOOLADI, T. *et al.* Bioactive exopolysaccharide from *Neopestalotiopsis* sp. strain SKE15: Production, characterization and optimization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 129, p. 127–139, 15 maio 2019.

GEIER, B. *et al.* Spatial metabolomics of in situ host–microbe interactions at the micrometre scale. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 498–510, mar. 2020.

GEIGER, O.; LÓPEZ-LARA, I. M.; SOHLENKAMP, C. Phosphatidylcholine biosynthesis and function in bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Phospholipids and phospholipid metabolism. v. 1831, n. 3, p. 503–513, 1 mar. 2013.

GOMES, C. V.; FORTUNA, J. L. Microfungos endofíticos e epifíticos em folhas de bromélias em um fragmento de Mata Atlântica no Extremo Sul da Bahia. **Unisanta BioScience**, v. 9, n. 4, p. 356–370, 22 out. 2020.

GONZÁLEZ, A. J.; ESTEFANÍA, T. Strains of *Neopestalotiopsis* sp. are *in vitro* antagonists of *Cryphonectria parasitica*. **Biological Control**, v. 143, p. 104187, 1 abr. 2020.

GONZÁLEZ, Y. *et al.* Potential application of a fungal co-culture crude extract for the conservation of post-harvest fruits. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 1679–1691, 1 jun. 2024.

GOPALAKRISHNAN, A. V. *et al.* Role of fatty acids in modulating quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* and *Chromobacterium violaceum*: an integrated experimental and computational analysis. **International Microbiology**, 18 set. 2024.

GRABKA, R. *et al.* Fungal Endophytes and Their Role in Agricultural Plant Protection against Pests and Pathogens. **Plants**, v. 11, n. 3, p. 384, jan. 2022.

GRIGOLETTO, D. F. *et al.* Secondary metabolites produced by endophytic fungi: novel antifungal activity of fumiquinone B. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 41, p. e48785, 18 dez. 2019.

GU, H. *et al.* Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi From *Artemisia argyi* and Bioactive Metabolites From *Diaporthe* sp. AC1. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 23 jun. 2022.

GUO, L.; XI, B.; LU, L. Strategies to enhance production of metabolites in microbial co-culture systems. **Bioresource Technology**, v. 406, p. 131049, 1 ago. 2024.

HAN, J. W.; CHOI, G. J.; KIM, B. S. Antimicrobial aromatic polyketides: a review of their antimicrobial properties and potential use in plant disease control. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 163, 28 out. 2018.

HASUDA, A. L.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Toxicity of the emerging mycotoxins beauvericin and enniatins: A mini-review. **Toxicon**, v. 239, p. 107534, 23 fev. 2024.

HE, L. *et al.* Anticancer Action and Mechanism of Ergosterol Peroxide from *Paecilomyces cicadae* Fermentation Broth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 3935, dez. 2018.

HESHAM, Abd El-Latif; UPADHYAY, Ram Sanmukh; SHARMA, Gauri Dutt; MANOHARACHARY, Chakravarthula; GUPTA, Vijai Kumar (ed.). **Fungal biotechnology and bioengineering**. Cham: Springer, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-41870-0>.

HOSEINI, M. H. M. *et al.* Chapter 19 - Immunomodulatory activities of chitin and chitosan microparticles. Em: GOPI, S.; THOMAS, S.; PIUS, A. (Eds.). **Handbook of Chitin and Chitosan**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 609–639.

HUI, Y. *et al.* Scoparone as a therapeutic drug in liver diseases: Pharmacology, pharmacokinetics and molecular mechanisms of action. **Pharmacological Research**, v. 160, p. 105170, 1 out. 2020.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Biomás | IBGE**. IBGE, 2024. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/geociencias/informacoes-ambientais/vegetacao/15842-biomas.html>>. Acesso em: 7 ago. 2024.

IBRAHIM, S. *et al.* Fusaristerol A: A new cytotoxic and antifungal ergosterol fatty acid ester from the endophytic fungus *Fusarium* sp. associated with *Mentha longifolia* roots. **Pharmacognosy Magazine**, v. 14, n. 56, p. 308–311, 2018a.

IBRAHIM, S. R. M. *et al.* Fusarithioamide B, a new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 786–790, 1 fev. 2018b.

ISMAIEL, A. A. *et al.* Production of paclitaxel with anticancer activity by two local fungal endophytes, *Aspergillus fumigatus* and *Alternaria tenuissima*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 14, p. 5831–5846, 1 jul. 2017.

KAHRAMAN, T. *et al.* Synthesis, Characterization, and Optimization of Green Silver Nanoparticles Using *Neopestalotiopsis clavispora* and Evaluation of Its Antibacterial, Antibiofilm, and Genotoxic Effects. **Eurobiotech Journal**, v. 5, n. 3, 2021.

KNOWLES, S. L. *et al.* Fungal–fungal co-culture: a primer for generating chemical diversity. **Natural Product Reports**, v. 39, n. 8, p. 1557–1573, 2022.

KOUR, D. *et al.* Beneficial fungal communities for sustainable development: Present scenario and future challenges. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, 2023.

KUMAR, A. *et al.* 1 - Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants. Em: KUMAR, A.; E.K, R. (Eds.). **Microbial Endophytes**. [s.l.] Woodhead Publishing, 2020. p. 1–33.

KUMAR, S.; ANWER, R.; AZZI, A. Virulence Potential and Treatment Options of Multidrug-Resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii*. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2104, out. 2021.

KYRIAKIDIS, I. *et al.* *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. **Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 373, mar. 2021.

LATZ, M. A. C. *et al.* Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. **Plant Ecology & Diversity**, v. 11, n. 5–6, p. 555–567, 2 nov. 2018.

LEE, C.-L. *et al.* Cytotoxic *ent*-abietane diterpenes from *Gelonium aequoreum*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 276–287, 1 jan. 2008.

LI, T. *et al.* Co-culture of *Trichoderma atroviride* SG3403 and *Bacillus subtilis* 22 improves the production of antifungal secondary metabolites. **Biological Control**, v. 140, p. 104122, 1 jan. 2020.

LI, Y. *et al.* A genome-scale phylogeny of the kingdom Fungi. **Current Biology**, v. 31, n. 8, p. 1653–1665.e5, 26 abr. 2021.

LI, Y. *et al.* Two new bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Talaromyces assiutensis* JTY2. **Natural Product Research**, v. 36, n. 14, p. 3695–3700, 15 jul. 2022.

LI, Y.-X. *et al.* The Amide Compounds Isolated from *Physochlaina infundibularis*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 60, n. 2, p. 287–290, 1 mar. 2024.

LIU, T. *et al.* *Streptomyces*-Fungus Co-Culture Enhances the Production of Borrelidin and Analogs: A Genomic and Metabolomic Approach. **Marine Drugs**, v. 22, n. 7, p. 302, jul. 2024.

MAGALDI, S. *et al.* Well diffusion for antifungal susceptibility testing. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 39–45, 1 jan. 2004.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. *et al.* *Pestalotiopsis* revisited. **Studies in Mycology**, v. 79, n. 1, p. 121–186, 1 set. 2014.

MARASCHIN, M.; DE PAULA, N.; CARISSIMI, E. Enhancing sludge thickening in continuous treatment using polymeric bubbles with cationic polymer P2900 and cocamidopropyl betaine. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 31, n. 48, p. 58609–58623, out. 2024.

MEA, H. J.; YONG, P. V. C.; WONG, E. H. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. **Microbiological Research**, v. 247, p. 126722, 1 jun. 2021.

MISUDA, N. *et al.* Eleven new glycosidic acid methyl esters from the crude resin glycoside fraction of *Ipomoea alba* seeds. **Journal of Natural Medicines**, v. 78, n. 4, p. 1057–1070, 1 set. 2024.

MOHAMED, G. A.; IBRAHIM, S. R. M.; ASFOUR, H. Z. Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor*. **Phytochemistry Letters**, v. 35, p. 152–155, 1 fev. 2020.

MOJICA, M. F. *et al.* Clinical challenges treating *Stenotrophomonas maltophilia* infections: an update. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 4, n. 3, p. dlac040, 1 jun. 2022.

MUELLER, G. M. *et al.* What Do the First 597 Global Fungal Red List Assessments Tell Us about the Threat Status of Fungi? **Diversity**, v. 14, n. 9, p. 736, set. 2022.

NAIK, S. *et al.* How and why do endophytes produce plant secondary metabolites? **Symbiosis**, v. 78, n. 3, p. 193–201, 1 jul. 2019.

NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. **Biological Reviews**, v. 94, n. 6, p. 2101–2137, 2019.

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/1345084>>. Acesso em: 6 jan. 2025.

NEJATIAN, M.; ABBASI, S. Chapter 19 - Application of bio-based emulsifiers in the formulation of food-grade nanoemulsions. Em: ABD-ELSALAM, K. A.; MURUGAN, K. (Eds.). **Bio-Based Nanoemulsions for Agri-Food Applications**. Nanobiotechnology for Plant Protection. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 311–327.

NEVES, F. O. *et al.* Unveiling the Therapeutic Potential of *Clitoria Guianensis* (Aubl.) Benth Var. *Guianensis*: A Comprehensive Review of its AntiInflammatory and Wound Healing Properties. **Global Journal of Human-Social Science**, p. 29–49, 2 maio 2024.

NEVES, F. O. *et al.* Unveiling the Therapeutic Potential of *Clitoria Guianensis* (Aubl.) Benth Var. *Guianensis*: A Comprehensive Review of its AntiInflammatory and Wound Healing Properties. **Global Journal of Human-Social Science**, p. 29–49, 2 maio 2024.

NIC LUGHADHA, E. *et al.* Extinction risk and threats to plants and fungi. **PLANTS, PEOPLE, PLANET**, v. 2, n. 5, p. 389–408, 2020.

NINOMIYA, A.; URAYAMA, S.; HAGIWARA, D. Antibacterial diphenyl ether production induced by co-culture of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 11, p. 4169–4185, 1 jun. 2022.

NOOR, A. O. *et al.* Naturally Occurring Isocoumarins Derivatives from Endophytic Fungi: Sources, Isolation, Structural Characterization, Biosynthesis, and Biological Activities. **Molecules**, v. 25, n. 2, p. 395, 17 jan. 2020.

OLIVEIRA, M. T. D. *et al.* Mapeamento da Vegetação do Cerrado – Uma Revisão das Iniciativas de Sensoriamento Remoto. **Revista Brasileira de Cartografia**, v. 72, p. 1250–1274, 30 dez. 2020.

OPPONG-DANQUAH, E. *et al.* Design of Fungal Co-Cultivation Based on Comparative Metabolomics and Bioactivity for Discovery of Marine Fungal Agrochemicals. **Marine Drugs**, v. 18, n. 2, p. 73, 23 jan. 2020.

OPPONG-DANQUAH, E. *et al.* Induction of Isochromanones by Co-Cultivation of the Marine Fungus *Cosmospora* sp. and the Phytopathogen *Magnaporthe oryzae*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 2, p. 782, jan. 2022.

OYENEYE, A. *et al.* Production of α -Glycerolphosphorylcholine and Other Compounds from Wheat Fermentation. **ACS Omega**, v. 5, n. 21, p. 12486–12494, 2 jun. 2020.

PARES, R. B. *et al.* Acaricidal Activity of Annonaceae Plants for *Dermanyssus gallinae* (Acari: *Dermanyssidae*) and Metabolomic Profile by HPLC-MS/MS. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 4, p. 662–672, 1 ago. 2021.

PILON, A. C. *et al.* Redes moleculares: uma análise sobre anotações e descoberta de novos ativos. **Química Nova**, v. 44, p. 1168–1179, 8 nov. 2021.

PMABB, P. DE M. A. DOS B. B. **Terra Class**. [s.l.] Governo Federal, 2022. Disponível em: <<https://www.terraclass.gov.br/>>. Acesso em: 10 ago. 2024.

PRIEGO-CAPOTE, F. 6 - Solid–liquid extraction techniques. Em: LUCENA, R.; CÁRDENAS, S. (Eds.). **Analytical Sample Preparation With Nano- and Other High-Performance Materials**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 111–130.

QUEIROZ, L. P.; BARRETO, K. L. *Clitoria L.* Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22883>>.

RANA, K. L. *et al.* Biodiversity of Endophytic Fungi from Diverse Niches and Their Biotechnological Applications. Em: SINGH, B. P. (Ed.). **Advances in Endophytic Fungal Research: Present Status and Future Challenges**. Cham: Springer International Publishing, 2019b. p. 105–144.

RANA, K. L. *et al.* Endophytic Fungi: Biodiversity, Ecological Significance, and Potential Industrial Applications. Em: YADAV, A. N. *et al.* (Eds.). **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives**. Fungal Biology. Cham: Springer International Publishing, 2019a. p. 1–62.

RANGSINTH, P. *et al.* Potential Beneficial Effects and Pharmacological Properties of Ergosterol, a Common Bioactive Compound in Edible Mushrooms. **Foods**, v. 12, n. 13, p. 2529, jan. 2023.

REYES-PÉREZ, R. *et al.* Production and anti-inflammatory and analgesic effects of sphaeralgin from transformed and non-transformed cells in suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 158, n. 3, p. 51, 27 ago. 2024.

RIBEIRO, B. A. *et al.* Chemical Diversity of Secondary Metabolites Produced by Brazilian Endophytic Fungi. **Current Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 33–54, 1 jan. 2021.

RICCI, A. P. *et al.* Isolation and molecular identification of endophytic fungi associated with *Campomanesia adamantium*, a Brazilian Cerrado plant. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, p. e281308, 22 jul. 2024.

RIEKHOF, W. R. *et al.* Lysophosphatidylcholine Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: THE ROLE OF P-TYPE ATPases IN TRANSPORT AND A BROAD SPECIFICITY ACYLTRANSFERASE IN ACYLATION *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 51, p. 36853–36861, 21 dez. 2007.

RODRIGUES, M. L. The Multifunctional Fungal Ergosterol. **mBio**, v. 9, n. 5, p. 10.1128/mbio.01755-18, 18 set. 2018.

RODRÍGUEZ, M. A.; CABRERA, G.; GODEAS, A. Cyclosporine A from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 575–586, 1 mar. 2006.

RODRÍGUEZ-GÁLVEZ, E. *et al.* Diversity and pathogenicity of *Lasiodiplodia* and *Neopestalotiopsis* species associated with stem blight and dieback of blueberry plants in Peru. **European Journal of Plant Pathology**, v. 157, n. 1, p. 89–102, 1 maio 2020.

ROY, A. *et al.* In-silico analysis of antiviral fungal inhibitors against Mpro receptor protein. **Vegetos**, 7 jun. 2024.

SAID, M. S.; TIRTHANI, E.; LESHU, E. *Stenotrophomonas Maltophilia*. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024.

SAMIKSHA; KUMAR, S. Molecular Taxonomy, Diversity, and Potential Applications of Genus *Fusarium*. Em: ABDEL-AZEEM, A. M. *et al.* (Eds.). **Industrially Important Fungi for Sustainable Development: Volume 1: Biodiversity and Ecological Perspectives**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 277–293.

SCHMITZ, P. *Clitoria guianensis* (Aubl.) Benth. (Flora mundial). Disponível em: <[https://identify.plantnet.org/pt-br/k-world-flora/species/Clitoria%20guianensis%20\(Aubl.\)%20Benth./data](https://identify.plantnet.org/pt-br/k-world-flora/species/Clitoria%20guianensis%20(Aubl.)%20Benth./data)>. Acesso em: 10 ago. 2024.

SCHOLZ, S. A. *et al.* Production of cellulosic organic acids via synthetic fungal consortia. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 4, p. 1096–1100, 2018.

SCHYMANSKI, E. L. *et al.* Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 4, p. 2097–2098, 18 fev. 2014.

SELEGATO, D. M.; CASTRO-GAMBOA, I. Enhancing chemical and biological diversity by co-cultivation. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 1 fev. 2023.

SENANAYAKE, I. New geographical records of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* species in Guangdong Province, China. **Asian Journal of Mycology**, v. 3, n. 1, p. 512–533, 2020.

SHAKIL HUSSAIN, S. M.; KAMAL, M. S.; SULTAN, A. S. Amido-Amine-Based Cationic Gemini Surfactants: Thermal and Interfacial Properties and Interactions with Cationic Polyacrylamide. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 20, n. 1, p. 47–55, 2017.

SIBBR - SISTEMA DE INFORMAÇÕES SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA *Clitoria guianensis* (Aubl.) Benth. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/318887>>. Acesso em: 10 ago. 2024.

SIBBR, S. DE I. SOBRE A. B. B. *Clitoria guianensis* (Aubl.) Benth. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/318887>>. Acesso em: 10 ago. 2024.

SILVA, S. S. DA *et al.* Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Passovia stelis* (Loranthaceae) / Isolation and identification of endophytic fungi of *Passovia stelis* (Loranthaceae). **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 3, p. 1262–1270, 18 maio 2020.

SINGH, B. P. *et al.* (EDS.). **Endophytic Fungi: The Hidden Sustainable Jewels for the Pharmaceutical and Agricultural Industries**. Cham: Springer International Publishing, 2024.

SONG, M. J.; MALHI, H. The unfolded protein response and hepatic lipid metabolism in non alcoholic fatty liver disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 203, p. 107401, 1 nov. 2019.

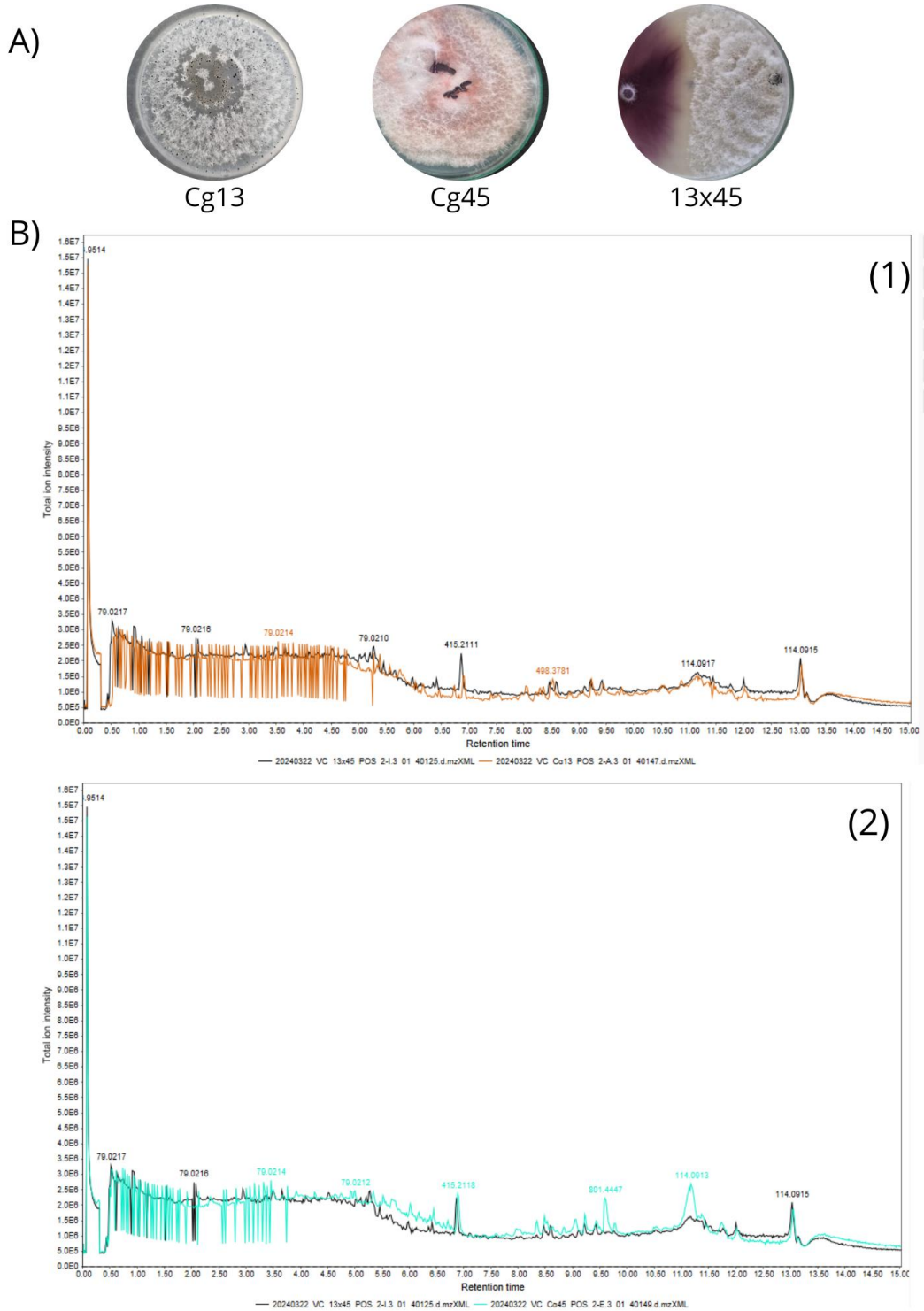
- SORNAKILI, A. *et al.* Antagonistic fungal endophytes and their metabolite-mediated interactions against phytopathogens in rice. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 112, p. 101525, 1 dez. 2020.
- SOUZA, B. DOS S. *et al.* Fungos endofíticos associados à planta medicinal Corama (*Kalanchoe pinnata* [LAM.] PERS.). **DESAFIOS - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 5, n. 3, p. 30–45, 30 set. 2018.
- SPORMANN, A. M. **Principles of Microbial Metabolism and Metabolic Ecology**. Cham: Springer International Publishing, 2023.
- SUMNER, L. W. *et al.* Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 211–221, 19 set. 2007.
- TANAPICHATSAKUL, C. *et al.* Production of eugenol from fungal endophytes *Neopestalotiopsis* sp. and *Diaporthe* sp. isolated from *Cinnamomum loureiroi* leaves. **PeerJ**, v. 7, p. e6427, 12 fev. 2019.
- TATA, A. *et al.* Imprint Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging for Monitoring Secondary Metabolites Production during Antagonistic Interaction of Fungi. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 24, p. 12298–12305, 15 dez. 2015.
- THAKUR, P. *et al.* Rhamnolipid the Glycolipid Biosurfactant: Emerging trends and promising strategies in the field of biotechnology and biomedicine. **Microbial Cell Factories**, v. 20, p. 1, 4 jan. 2021.
- TIGGA, A. *et al.* 16S metagenomics and metabolomics unveil the microbial compositions and metabolite profiles in Dahi, a traditional Indian fermented milk product prepared by the backslopping method. **Journal of Food Science and Technology**, 22 ago. 2024.
- TIWARI, P.; BAE, H. Endophytic Fungi: Key Insights, Emerging Prospects, and Challenges in Natural Product Drug Discovery. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 360, fev. 2022.
- TOGHUEO, R. M. K. Bioprospecting endophytic fungi from *Fusarium* genus as sources of bioactive metabolites. p. 1–21, 2 jan. 2020.
- TORRES, F. L. *et al.* Bioprospecção e potencial biotecnológico de fungos endofíticos associados a plantas do Cerrado. **Concilium**, v. 22, n. 2, p. 256–272, 12 fev. 2022.
- TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia - 12ª Edição**. 12. ed. Porto Alegre. Artmed Editora, 2016. 964 p.
- TSE, T. J. *et al.* Production of α -Glycerolphosphorylcholine in Fermented Roots, Tubers, and Fruits. **Foods**, v. 13, n. 19, p. 3085, jan. 2024.
- TSIVILEVA, O. M.; KOFTIN, O. V.; EVSEEVA, N. V. Coumarins as Fungal Metabolites with Potential Medicinal Properties. **Antibiotics**, v. 11, n. 9, p. 1156, set. 2022.
- VÁSQUEZ-BONILLA, J. N. *et al.* Improvement of beauvericin production by *Fusarium oxysporum* AB2 under solid-state fermentation using an optimised liquid medium and co-cultures. **Mycotoxin Research**, v. 38, n. 3, p. 175–183, ago. 2022.

- VÁSQUEZ-BONILLA, J. N. *et al.* Improvement of beauvericin production by *Fusarium oxysporum* AB2 under solid-state fermentation using an optimised liquid medium and co-cultures. **Mycotoxin Research**, v. 38, n. 3, p. 175–183, ago. 2022.
- VILLACORTA, J. B. *et al.* Mining Small Molecules from *Teredinibacter turnerae* Strains Isolated from *Philippine Teredinidae*. **Metabolites**, v. 12, n. 11, p. 1152, nov. 2022.
- VU, T. H. N. *et al.* *Fusarium solani* PQF9 Isolated from *Podocarpus pilgeri* Growing in Vietnam as a New Producer of Paclitaxel. **Indian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 596–603, 1 dez. 2023.
- WALTERS, D. *et al.* Antifungal Activities of Four Fatty Acids against Plant Pathogenic Fungi. **Mycopathologia**, v. 157, n. 1, p. 87–90, 1 jan. 2004.
- WANG, A. *et al.* Eremophilane-Type Sesquiterpenoids From the Endophytic Fungus *Rhizopycnis vagum* and Their Antibacterial, Cytotoxic, and Phytotoxic Activities. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 26 out. 2020a.
- WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, ago. 2016.
- WANG, M. GNPS Documentation. **GNPS**, 2022. Disponível em: <<https://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/gnpsanalysisoverview/>>. Acesso em: 27 set. 2024.
- WANG, Q.-X. *et al.* Polyketides with antimicrobial activity from the solid culture of an endolichenic fungus *Ulocladium* sp. **Fitoterapia**, v. 83, n. 1, p. 209–214, 1 jan. 2012.
- WANG, R. *et al.* Recent advances in modular co-culture engineering for synthesis of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 62, p. 65–71, 1 abr. 2020b.
- WOLFENDER, J.-L.; URBAIN, A.; HOSTETTMANN, K. Profiling, Isolation, Chemical Characterisation and Distribution of Gentianaceae Constituents. Em: RYBCZYŃSKI, J. J.; DAVEY, M. R.; MIKUŁA, A. (Eds.). **The Gentianaceae - Volume 2: Biotechnology and Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2015. p. 349–381.
- WÖSTEN, H. A. B. Filamentous fungi for the production of enzymes, chemicals and materials. **Current Opinion in Biotechnology**, Tissue, Cell and Pathway Engineering. v. 59, p. 65–70, 1 out. 2019.
- WU, B. *et al.* Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**, v. 10, n. 3, p. 127–140, 3 jul. 2019.
- XIA, S. *et al.* The Notorious Soilborne Pathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum*: An Update on Genes Studied with Mutant Analysis. **Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 27, 27 dez. 2019.
- XU, M. *et al.* *Fusarium*-Derived Secondary Metabolites with Antimicrobial Effects. **Molecules**, v. 28, n. 8, p. 3424, jan. 2023a.
- XU, S. *et al.* The Potential Use of Fungal Co-Culture Strategy for Discovery of New Secondary Metabolites. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 464, fev. 2023b.

- XU, X. *et al.* Beauvericin K, a New Antifungal Beauvericin Analogue from a Marine-derived *Fusarium* sp. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 12, p. 1934578X1601101213, dez. 2016.
- YADAV, J.; ISMAEEL, S.; QADRI, A. Lysophosphatidylcholine Potentiates Antibacterial Activity of Polymyxin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 12, p. e01337-20, 17 nov. 2020.
- YAGHMUR, A.; SARTORI, B.; RAPPOLT, M. Self-Assembled Nanostructures of Fully Hydrated Monoelaidin–Elaidic Acid and Monoelaidin–Oleic Acid Systems. **Langmuir**, v. 28, n. 26, p. 10105–10119, 3 jul. 2012.
- YANG, B. *et al.* Chemical Constituents and Antimicrobial Activities of *Canthium horridum*. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 6, p. 1934578X1000500620, jun. 2010.
- YANG, Q. *et al.* Two new species of *Neopestalotiopsis* from southern China. **Biodiversity Data Journal**, v. 9, p. e70446, 25 ago. 2021.
- YANG, Y.; YU, B. Recent advances in the synthesis of chitooligosaccharides and congeners. **Tetrahedron**, v. 70, n. 5, p. 1023–1046, 4 fev. 2014.
- YI, L. *et al.* Characterizing Alzheimer’s disease through metabolomics and investigating anti-Alzheimer’s disease effects of natural products. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1398, n. 1, p. 130–141, 2017.
- YU, M. *et al.* The Quality Control of Midecamycin and the Predictive Demarcation between Its Impurities and Components. **Separations**, v. 9, n. 8, p. 225, 17 ago. 2022.
- ZHAI, Y.-J. *et al.* Phaeosphaones: Tyrosinase Inhibitory Thiodiketopiperazines from an Endophytic *Phaeosphaeria fuckelii*. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 5, p. 1592–1597, 22 maio 2020.
- ZHANG, F. *et al.* An integrated strategy for the comprehensive profiling of the chemical constituents of *Aspongopus chinensis* using UPLC-QTOF-MS combined with molecular networking. **Pharmaceutical Biology**, v. 60, n. 1, p. 1349–1364, 31 dez. 2022.
- ZHANG, Y.-M.; ROCK, C. O. Membrane lipid homeostasis in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 222–233, mar. 2008.
- ZHENG, L. *et al.* Biogenesis, Transport and Remodeling of Lysophospholipids in Gram-negative Bacteria. **Biochimica et biophysica acta. Molecular and cell biology of lipids**, v. 1862, n. 11, p. 1404–1413, nov. 2017.
- ZHOU, L.-W.; MAY, T. W. Fungal taxonomy: current status and research agendas for the interdisciplinary and globalisation era. **Mycology**, v. 14, n. 1, p. 52–59, 2 jan. 2023.
- ZHUANG, L.; ZHANG, H. Utilizing cross-species co-cultures for discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 252–262, 1 jun. 2021.

APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR

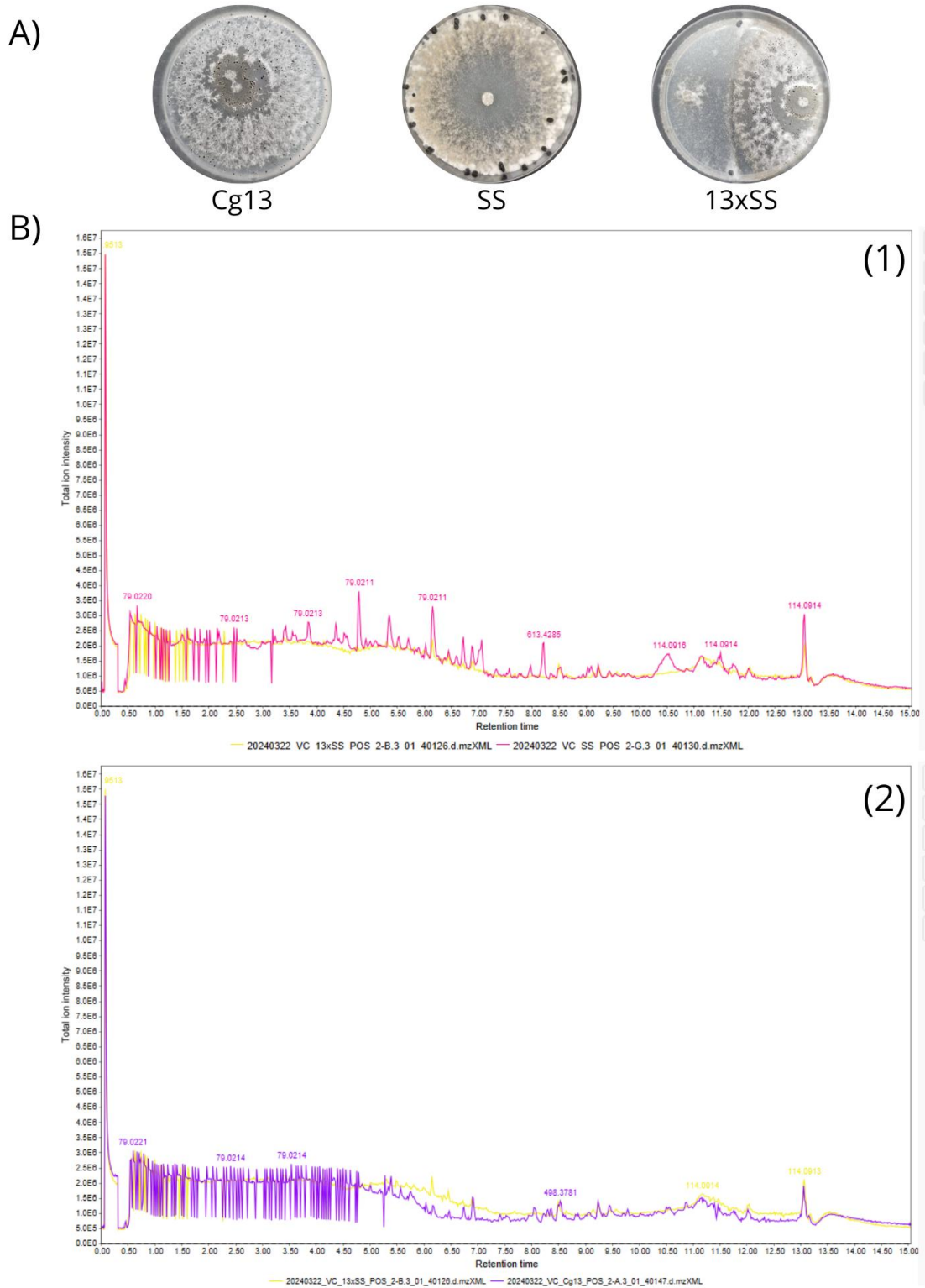
Figura S1 – Comparação entre os cromatogramas do cocultivo 13x45 e os respectivos monocultivos



Legenda: Cg13 (alaranjado), Cg45 (verde) e 13x45 (preto).

Fonte: Autor, 2025.

Figura S2 – Comparação entre os cromatogramas do cocultivo 13xSS e os respectivos monocultivos



Legenda: Cg13 (roxo), SS (rosa) e 13xSS (amarelo).

Fonte: Autor, 2025

Figura S3 – Comparação entre os cromatogramas do cocultivo 43xSS e os respectivos monocultivos

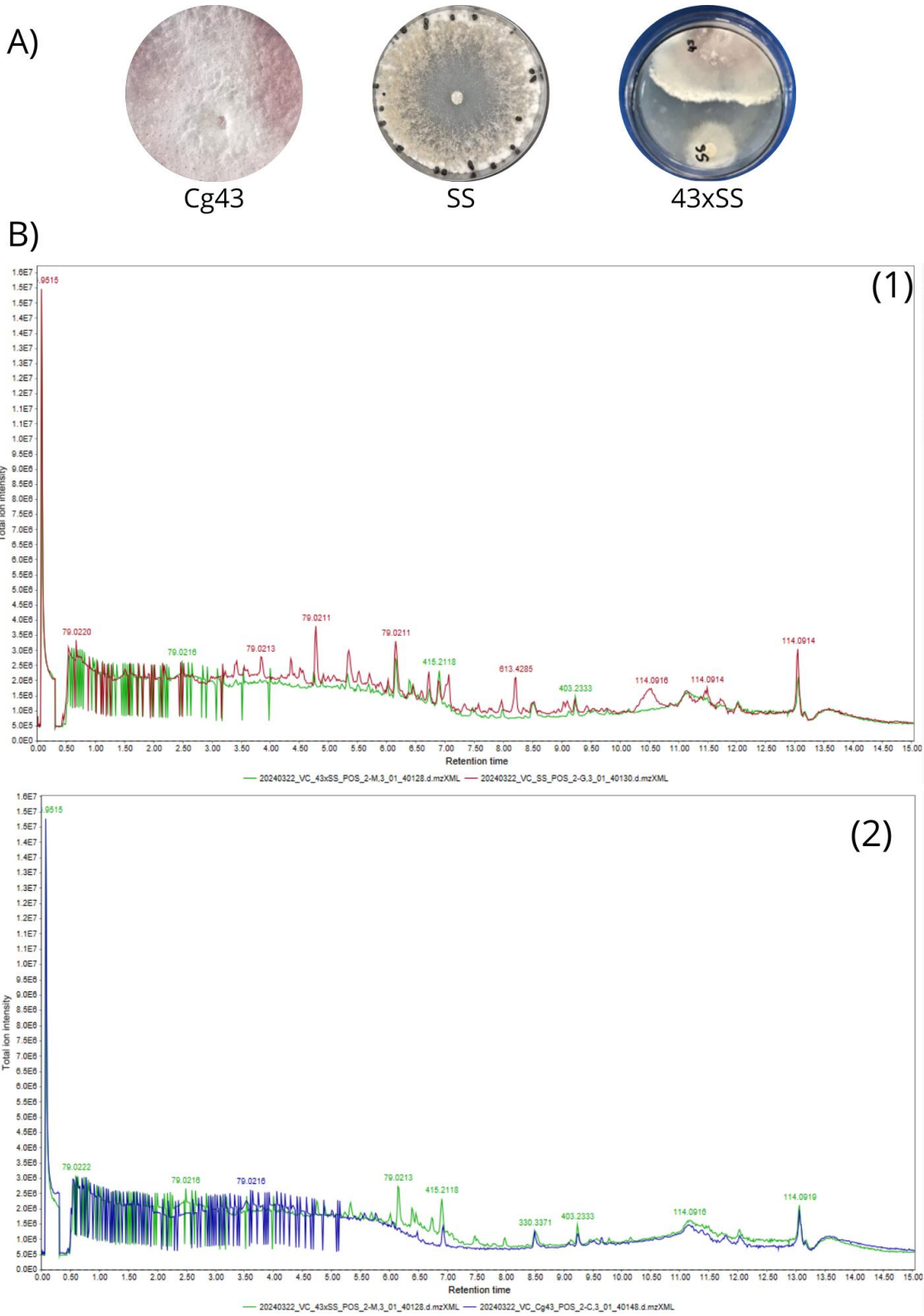
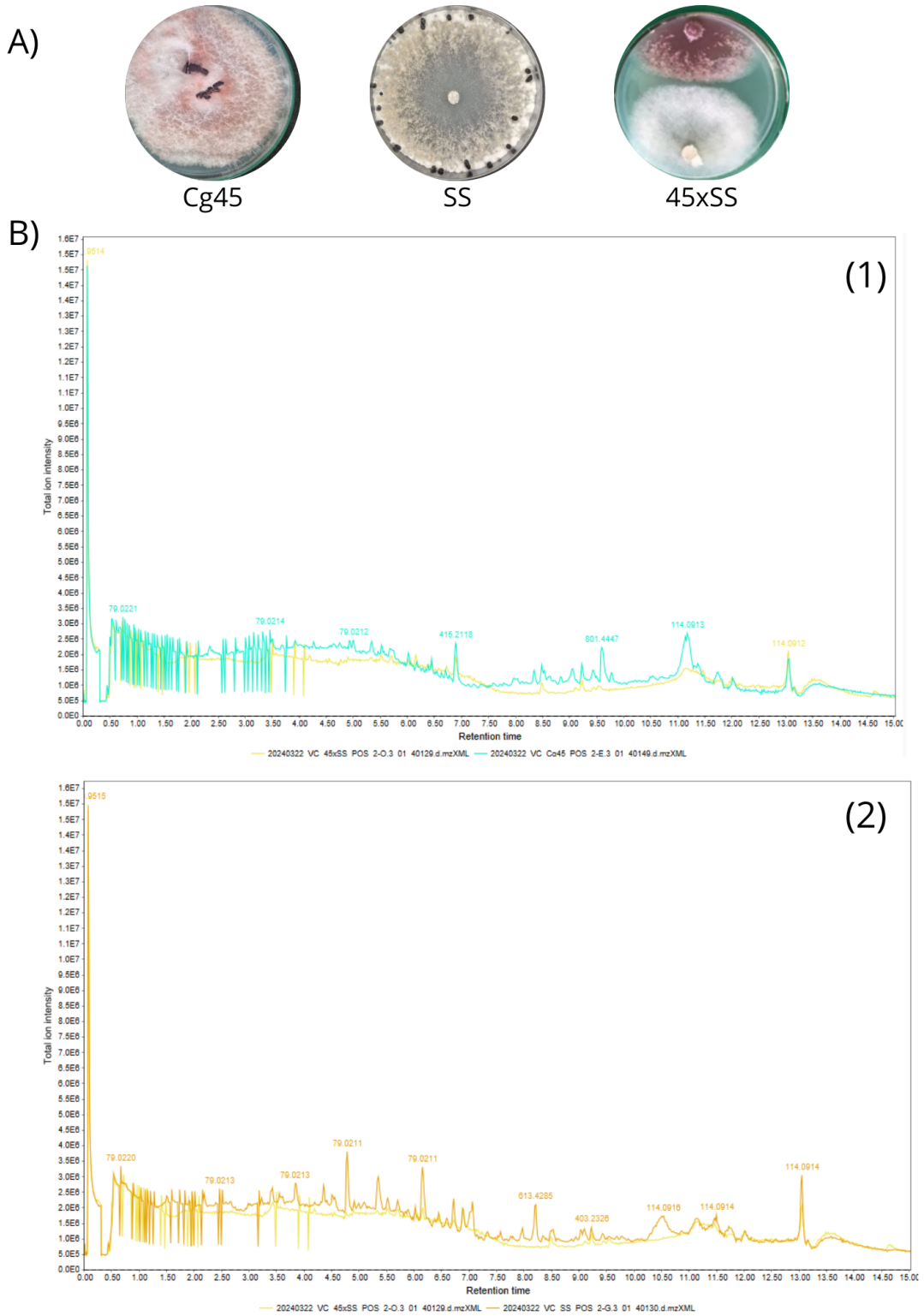


Figura S4 – Comparação entre os cromatogramas do cocultivo 45xSS e os respectivos monocultivos



Legenda: Cg45 (azul), SS (alaranjado) e 45xSS (amarelo).

Fonte: Autor, 2025.

Figura S5 – Comparação entre os cromatogramas do cocultivo 43x45 e os respectivos monocultivos

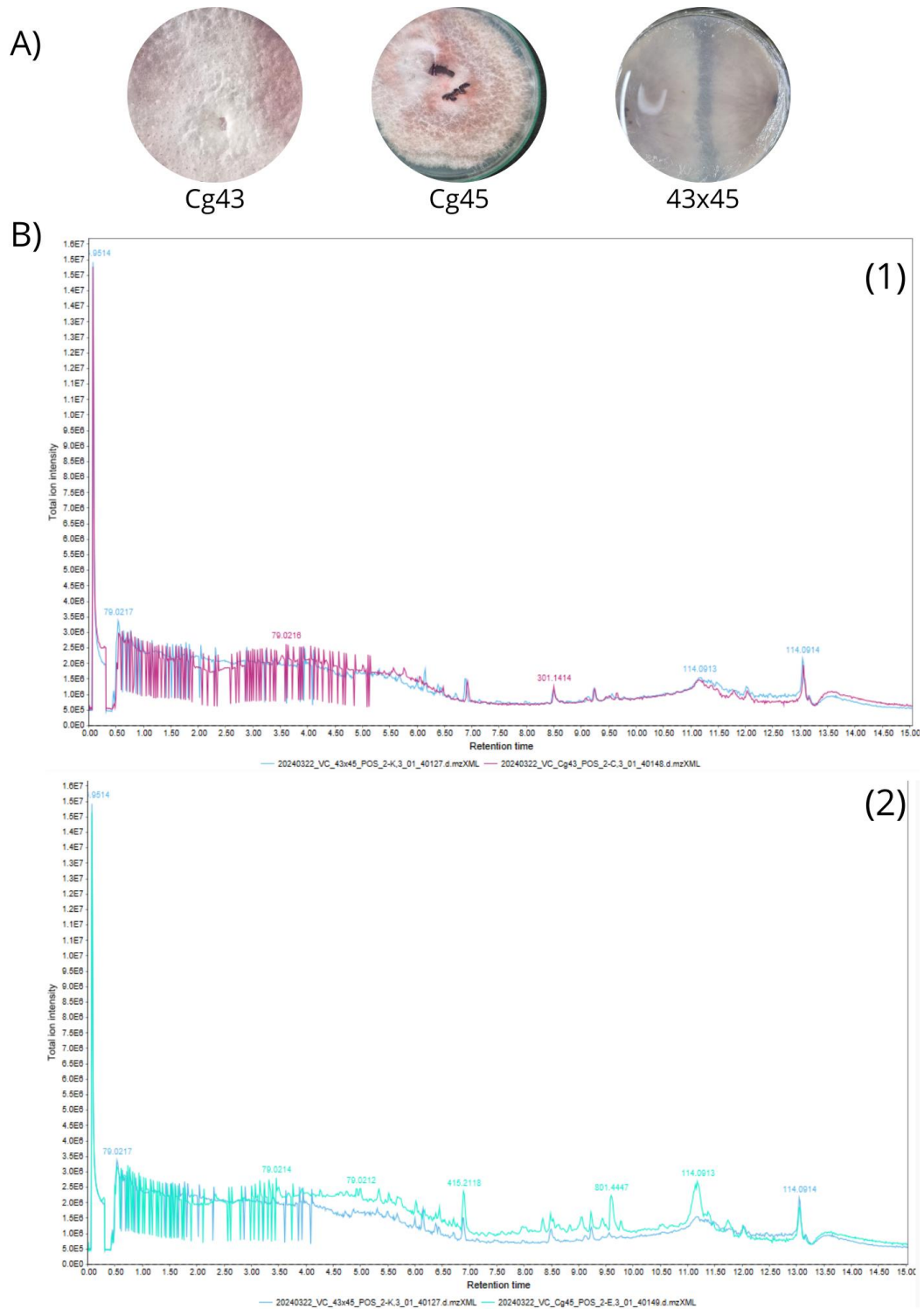
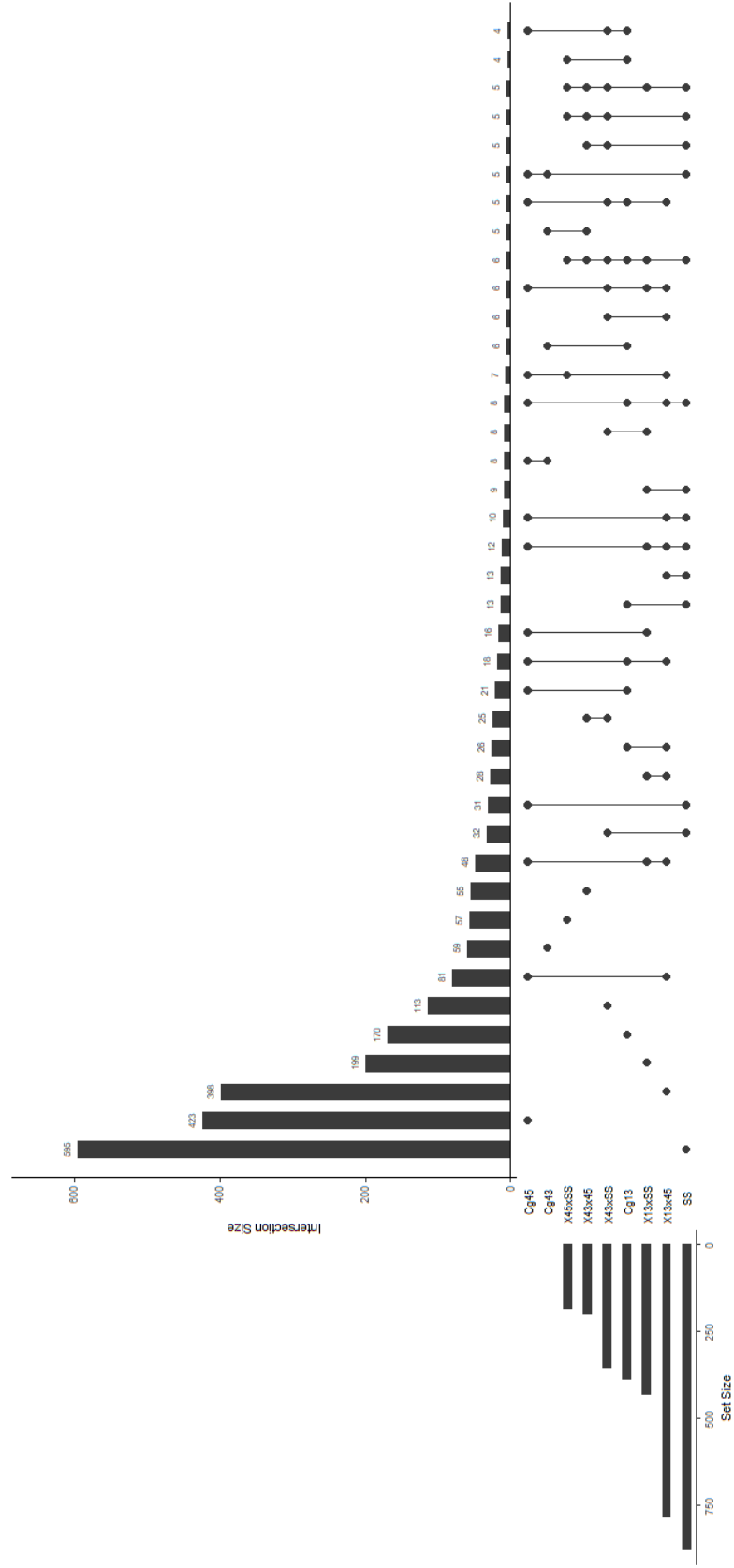


Figura S6 – Ampliação do diagrama de perturbação das entidades de massas



Fonte: Autor, 2024.