



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISA DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE *Deguelia duckeana***

LESLIÊ DE AZEVEDO GOMES

Manaus/AM
Janeiro/2024

LESLIÊ DE AZEVEDO GOMES

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
ISOLADOS DE *Deguelia duckeana***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Química da Universidade Federal
do Amazonas, exigida para o
título de Mestre em Química, com
ênfase na Linha de Pesquisa em
Química de Produtos Naturais.

DRA. CECILIA VERONICA NUNEZ
Orientadora

Manaus/AM
Janeiro/2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

G633e Gomes, Lesliê de Azevedo
Estudo químico e biológico de fungos endofíticos isolados de
Deguelia duckeana / Lesliê de Azevedo Gomes . 2024
99 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cecilia Veronica Nunez
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Deguelia duckeana. 2. Diaporthe oculi. 3. fungos endofíticos. 4.
metabólitos secundários. I. Nunez, Cecilia Veronica. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio Anaqueri Gomes e Elcineide Azevedo Gomes, com todo meu amor e gratidão por todo os esforços que fizeram para me proporcionar uma educação digna e, assim, ter chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus pelo infinito amor e misericórdia para comigo, por me fazer um ser pensante com a capacidade de compreender uma minúscula parte deste vasto universo.

Aos meus queridos pais, Antônio e Elcineide, por todo amor, suporte emocional, constantes orações e sacrifícios que fizeram para que eu pudesse realizar este sonho. Às minhas queridas irmãs e amigas, Kellen, Iandra e Débora Laissa, que sempre estão dispostas a me ouvir, me apoiar, me fortalecer e me proporcionar momentos de descontração. Aos meus irmãos Kalebe e Josué, pelas palavras de conforto e ânimo.

Ao meu amor, meu companheiro de vida, Henrique, a pessoa com quem mais converso sobre ciência. Sou muito grata por tudo que fizeste por mim, por sempre estar disposto a me apoiar, incentivar, ser meu ombro amigo e compreender minha vida acadêmica. À minha sogra Rosiane, que vibrou comigo desde a seleção do mestrado, por ser meu suporte no lar, pelas rezas e por sempre emanar energias positivas.

À minha orientadora, Dra. Cecilia Veronica, por me aceitar em seu laboratório, pelo projeto de pesquisa, orientação, apoio e aprendizados adquiridos durante esses anos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA, em especial a turminha dos endofíticos: Dr. Weison, pelo compartilhamento de conhecimento e pela orientação nos endofíticos e ensaios biológicos. À querida amiga, Me. Kalynne, que, desde o primeiro contato, esteve disposta a me ajudar e auxiliar no que fosse preciso. Ao Dr. Andrei, meu conterrâneo que tive o privilégio de conhecer no LABB, pelas grandes ajudas e dicas. Patrícia, Karyne e Kathiane pelos momentos de descontrações.

Aos colegas de turma, em especial, minha querida amiga Helena que trago desde a graduação e que juntas vencemos todas as dificuldades desta caminhada. Meus queridos colegas Josias e Me. Zilanir que com certeza levarei para a vida.

Aos técnicos da Central Analítica do INPA, pelo profissionalismo com que conduziram cada análise.

À equipe da Central analítica do IFAM-CMC, pela cordialidade, ensinamentos e realização das análises em CG-EM.

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de realizar o mestrado e ao INPA pelo espaço físico de trabalho.

À FAPEAM, pela concessão da bolsa, CNPq e CAPES pelo suporte à pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização dessa pesquisa.

RESUMO

Nos últimos anos, o estudo químico dos fungos endofíticos tem demonstrado que eles produzem uma variedade de novos metabólitos secundários. Além disso, endófitos fúngicos podem desenvolver a capacidade de produzir substâncias similares às suas plantas hospedeiras, tornando-se uma alternativa ecológica na busca por substâncias bioativas. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial químico e biológico dos fungos endofíticos isolados de *Deguelia duckeana* quanto a produção de substâncias bioativas. Para isso, folhas saudáveis de *D. duckeana* foram coletadas e desinfestadas. Após a incubação de fragmentos foliares em meio BDA sólido, os fungos endofíticos foram isolados e purificados. Para obtenção de extratos brutos metanólicos do micélio, os fungos endofíticos (14 cepas) foram cultivados em escala reduzida em meio Czapek acrescido de 0,2% extrato de levedura, a 30 °C, sob modo agitado por 20 dias. Os extratos metanólicos foram submetidos aos métodos de cromatografia em camada delgada, ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H) e avaliação antibacteriana para seleção de um fungo para cultivo em escala ampliada. O fungo selecionado foi cultivado nas mesmas condições iniciais e teve seus micélios extraídos com diclorometano e metanol. O extrato metanólico foi particionado com acetato de etila originando as fases hidrometanólica e acetato de etila. Os extratos e fases foram submetidos a métodos cromatográficos, RMN, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), ensaio antibacteriano e de toxicidade frente à *Artemia salina*. Foram isolados 28 fungos endofíticos das folhas de *D. duckeana*, dos quais 14 fungos foram selecionados para cultivo submerso. As análises por cromatografia em camada delgada dos extratos metanólicos fúngicos revelaram indícios de substâncias aromáticas, alcaloides e terpenos. As análises por RMN de ^1H confirmaram a presença de tais classes químicas. A triagem química direcionou a seleção para os fungos codificados como BDDD14-G3, BDDD23-G5 e BDDD25-G4, que foram identificados como *Diaporthe* sp., *Colletotrichum* sp. e *Diaporthe oculi*, respectivamente. O extrato metanólico de *D. oculi* destacou-se no ensaio antibacteriano e foi o fungo selecionado para cultivo em escala ampliada. O extrato diclorometano de *D. oculi*, foi submetido a fracionamentos cromatográficos e levou ao isolamento do ergosterol e uma mistura de triacilgliceróis. A análise por CG-EM dos triacilgliceróis identificou a presença de 13 ácidos graxos, sendo o ácido palmítico (27,9%) e o ácido esteárico (16,5%) os ácidos graxos metilados predominantes na mistura. O extrato diclorometano e as fases hidrometanólica e acetato de etila do extrato metanólico se mostraram não tóxicos contra *Artemia salina*. O extrato diclorometano inibiu 49,75% do crescimento de *Escherichia coli*. Esses resultados contribuem para a caracterização química e biológica da microbiota endofítica da espécie *D. duckeana*. Além disso, este é o primeiro relato de estudo químico para *D. oculi*. Estudos futuros poderão continuar a explorar o potencial biotecnológico dos demais fungos de *D. duckeana*, bem como identificar outras substâncias presentes nos extratos de *Diaporthe oculi* com possíveis potenciais biológicos.

Palavras-chave: *Deguelia duckeana*, *Diaporthe oculi*, fungos endofíticos, metabólitos secundários.

ABSTRACT

In recent years, the chemical study of endophytic fungi has shown that they produce a variety of new secondary metabolites. Additionally, fungal endophytes can develop the ability to produce substances similar to their host plants, becoming an ecological alternative in the search for bioactive compounds. Therefore, the objective of this study was to assess the chemical and biological potential of endophytic fungi isolated from *Deguelia duckeana* in terms of bioactive substance production. Healthy leaves of *D. duckeana* were collected and disinfested. After incubating leaf fragments on solid PDA medium, endophytic fungi were isolated and purified. For obtaining methanolic mycelium crude extracts, the endophytic fungi (14 strains) were cultivated on a reduced scale in Czapek medium supplemented with 0.2% yeast extract at 30 °C, under shaking conditions for 20 days. Methanolic extracts were subjected to thin-layer chromatography (TLC), ¹H nuclear magnetic resonance (¹H-NMR), and antibacterial evaluation to select a fungus for large-scale cultivation. The selected fungus was cultivated under the same initial conditions, and its mycelia were extracted with dichloromethane and methanol. The methanolic extract was partitioned with ethyl acetate, yielding the hydro-methanolic and ethyl acetate phases. Extracts and phases underwent chromatographic methods, NMR, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), antibacterial assay and toxicity assessment against *Artemia salina*. 28 endophytic fungi were isolated from *D. duckeana* leaves, of which 14 fungi were selected for submerged cultivation. Thin-layer chromatography analyses of fungal methanolic extracts revealed possible aromatic substances, alkaloids, and terpenes. ¹H-NMR analyses confirmed the presence of such chemical classes. Chemical screening directed the selection to the fungi encoded as BDDD14-G3, BDDD23-G5, and BDDD25-G4, identified as *Diaporthe* sp., *Colletotrichum* sp., and *Diaporthe oculi*, respectively. The methanolic extract of *D. oculi* stood out in the antibacterial assay and was the selected fungus for large-scale cultivation. The dichloromethane extract of *D. oculi* underwent chromatographic fractionation, leading to the isolation of ergosterol and a mixture of triglycerides. GC-MS analysis of the triglycerides identified the presence of 13 fatty acids, with palmitic acid (27.9%) and stearic acid (16.5%) being the predominant methylated fatty acids in the mixture. The dichloromethane extract and the hydro-methanolic and ethyl acetate phases of the methanolic extract showed no toxicity against *Artemia salina*. The dichloromethane extract inhibited 49.75% of *Escherichia coli* growth. These results contribute to the chemical and biological characterization of the endophytic microbiota of the species *D. duckeana*. Additionally, this is the first report of a chemical study on *D. oculi*. Future studies may continue to explore the biotechnological potential of other fungi from *D. duckeana*, as well as identify other substances present in the extracts of *Diaporthe oculi* with potential biological activities.

Keywords: *Deguelia duckeana*, *Diaporthe oculi*, endophytic fungi, secondary metabolites.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XII
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
3.1 Microrganismos endofíticos	11
3.2 Fungos endofíticos	12
3.3 Metabólitos secundários de fungos endofíticos	15
3.4 Resistência antibacteriana e a necessidade de novos agentes antimicrobianos	19
3.6 O gênero <i>Diaporthe</i>	23
3.7 A hospedeira <i>Deguelia duckeana</i>	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Coleta do material vegetal	30
4.2 Desinfecção do material vegetal e isolamento de fungos endofíticos	31
4.3 Purificação e conservação dos fungos endofíticos isolados de <i>Deguelia duckeana</i> ..	31
4.4 Avaliação preliminar dos fungos endofíticos isolados de <i>Deguelia duckeana</i> para a produção de metabólitos	32
4.4.1 Cultivo dos fungos endofíticos em pequena escala.....	32
4.4.2 Extração dos micélios dos fungos isolados de <i>Deguelia duckeana</i>	32
4.4.3 Análise cromatográfica dos extratos MeOH dos fungos isolados de <i>Deguelia duckeana</i>	33
4.4.4 Ressonância Magnética Nuclear	33
4.5 Identificação dos fungos isolados de <i>Deguelia duckeana</i>	34
4.6 Obtenção de extratos com metabólitos secundários de interesse.....	35
4.6.1 Cultivo em escala ampliada do fungo endofítico selecionado	35
4.6.2 Extração dos micélios do fungo endofítico selecionado	35
4.6.3 Partição líquido-líquido do extrato metanólico do micélio do fungo selecionado	36
4.6.4 Análises químicas dos extratos do micélio do fungo selecionado	36
4.7 Fracionamento dos extratos do micélio do fungo selecionado	36

4.7.1 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometano (DCM) do micélio ...	36
4.7.1 Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio	39
4.8. Análise do perfil de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.....	43
4.8.1 Derivatização.....	43
4.9 Ensaios Biológicos.....	44
4.9.1 Avaliação da atividade antibacteriana.....	44
4.9.2 Ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	45
5. RESULTADOS	45
5.1 Isolamento de fungos endofíticos	45
5.2 Avaliação prévia para a produção de metabólitos	49
5.3 Análise cromatográfica dos extratos MeOH dos micélios dos fungos isolados de <i>Deguelia duckeana</i>	52
5.4. Análise por RMN de ¹ H dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos isolados de <i>Deguelia duckeana</i>	53
5.5 Identificação fúngica.....	54
5.6 Avaliação da atividade antibacteriana dos fungos selecionados.....	55
5.7 Rendimento dos extratos dos micélios do fungo <i>Diaporthe oculi</i>	57
5.8 Prospecção química dos extratos miceliais do fungo <i>Diaporthe oculi</i>	57
5.8.1 Análise cromatográfica do extrato DCM e da fase AcOEt	57
5.8.2 RMN de ¹ H dos extratos e fase do micélio do fungo <i>D. oculi</i>	58
5.9 Determinação estrutural das substâncias isoladas do extrato diclorometano do micélio de <i>D. oculi</i>	62
5.9.1 Identificação dos constituintes químicos da fração F1215C710	62
5.9.2 Identificação da substância 1 (F19-21C1517).....	67
5.10 Análises de frações obtidas de fracionamentos da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de <i>Diaporthe oculi</i>	73
5.11 Ensaios biológicos de extrato e fases do micélio de <i>Diaporthe oculi</i>	76
5.11.1 Ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	76
5.11.2 Atividade antibacteriana de extrato e fases do micélio de <i>Diaporthe oculi</i>	77
6. CONCLUSÃO.....	80

LISTA DE ABREVIações

AcOEt – Acetato de etila
BDA – Batata dextrose Ágar
BOD - Biochemical Oxygen Demand (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
CC – Cromatografia em coluna
CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
Ø – Diâmetro
d – Duplete
DCM – Diclorometano
DMSO – Dimetilsulfóxido
DMSO-*d*₆ – Dimetilsulfóxido deuterado
h – Altura
Hex – Hexano
Hz - Hertz
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
MHz - Megahertz
MeOH - Metanol
nm – nanômetro
ppm – partes por milhão
RMN de ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s – Simpleto
sp. – Espécie não determinada
UV – Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do taxol.	14
Figura 2. Estruturas químicas isoladas de espécies do gênero <i>Diaporthe</i>	25
Figura 3. Espécie hospedeira <i>Deguelia duckeana</i> mantida no viveiro do LABB-INPA. ..	27
Figura 4. Substâncias isoladas de <i>Deguelia duckeana</i>	27
Figura 5. Folhas de <i>Deguelia duckeana</i> utilizadas nesse trabalho.	30
Figura 6. Fluxograma da preparação dos extratos metanólicos dos fungos endofíticos de <i>Deguelia duckeana</i>	33
Figura 7. Fluxograma para obtenção dos extratos brutos do fungo endofítico selecionado.	35
Figura 8. Partição líquido-líquido do extrato metanólico do micélio do fungo selecionado.	36
Figura 9. Fluxograma do fracionamento do extrato diclorometano do micélio.	37
Figura 10. Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de <i>D. oculi</i>	39
Figura 11. Fungos endofíticos isolados de <i>Deguelia duckeana</i>	46
Figura 12. Exemplificação das características macroscópicas dos fungos endofíticos do grupo 6.....	48
Figura 13. Características macroscópicas dos fungos endofíticos isolados de <i>Deguelia duckeana</i>	49
Figura 14. Placas de CCDC dos extratos metanólicos dos micélios de 14 fungos endofíticos de <i>Deguelia duckeana</i>	52
Figura 15. Comparação de espectros de RMN de ^1H (300 MHz) dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos endofíticos de <i>Deguelia duckeana</i> (DMSO- d_6).	53
Figura 16. Continuação da comparação de espectros de RMN de ^1H (300 MHz) dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos endofíticos de <i>Deguelia duckeana</i> (DMSO- d_6).	54
Figura 17. Características macroscópicas do fungo endofítico <i>Diaporthe oculi</i> , isolado de <i>D. duckeana</i>	55

Figura 18. Placas de CCDC dos extratos brutos dos micélios do fungo <i>D. oculi</i> : (1) ext DCM, (2) fase AcOEt. Sistema de eluição: ext. DCM - DCM/acetona (9:1), fase AcOEt – DCM/MeOH (9:1).	58
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do extrato DCM dos micélios do fungo <i>D. oculi</i> em CDCl_3 (300 MHz).	59
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico em DMSO-d_6 dos micélios do fungo <i>D. oculi</i> (300 MHz).	60
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H do Fase AcOEt em DMSO-d_6 dos micélios do fungo <i>D. oculi</i> (300 MHz).	61
Figura 22. Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos DCM, MeOH e a fase AcOEt dos micélios do fungo <i>D. oculi</i>	62
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H da fração 12-15 obtida do ext. DCM do micélio do fungo <i>D. oculi</i> em CDCl_3 (300 MHz).	63
Figura 24. Estrutura típica de triacilgliceróis.	63
Figura 25. Cromatogramas de íons totais em duplicata da fração F1215C710.	64
Figura 26. Estruturas químicas dos ésteres metílicos de ácidos graxos identificados por CG-EM.	65
Figura 27. Placas de CCDC da fração 19-21 isolada do ext. DCM. Sistema de eluição: DCM 100%.	67
Figura 28. Estrutura do Ergosterol	68
Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do ergosterol, obtido do ext. DCM dos micélios do fungo <i>D. oculi</i> (CDCl_3 , 300 MHz).	69
Figura 30. Expansão do espectro de RMN de ^1H dos sinais metílicos do ergosterol, obtido do ext. DCM dos micélios do fungo <i>D. oculi</i> (CDCl_3 , 300 MHz).	70
Figura 31. Expansão dos sinais de RMN de ^1H das duplas olefínicas do ergosterol, obtido do ext. DCM dos micélios do fungo <i>D. oculi</i> (CDCl_3 , 300 MHz).	70
Figura 32 Espectro de RMN de ^{13}C do ergosterol obtido do ext. DCM do micélio do fungo <i>D. oculi</i> (CDCl_3 , 300 MHz).	71
Figura 33. Placas de CCDC de frações obtidas do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH. Sistema de eluição: (A) : Hex/DCM 9:1; (B) : DCM 100%; (C) : AcOEt/acetona 9:1; (D) : AcOEt/acetona 8:2, (E) : AcOEt/acetona 1:1.	73

Figura 34. Placas de CCDC de frações obtidas do refractionamento de Dofa.25-28 da fase AcOEt do extrato MeOH. Sistema de eluição: (A) e (B) : Hex/DCM 3:7; (C) : Hex/DCM 2:8 e (D) : DCM/Acetona 9:1	74
Figura 35. Placas de CCDC de frações obtidas do refractionamento de Dofa.33-36 da fase AcOEt do extrato MeOH. Sistema de eluição: (A) AcOEt/Acetona; 8:2 e (B) e (C) AcOEt/Acetona 7:3.....	75
Figura 36. Placas de CCDC de frações obtidas do refractionamento de Dofa.39-41 da fase AcOEt do extrato MeOH. Sistema de eluição:AcOEt/Acetona; 8:2.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de metabólitos secundários bioativos de fungos endofíticos.....	16
Tabela 2. Exemplos de metabólitos de fungos endofíticos com propriedades antibacterianas.	21
Tabela 3. Sistemas de eluição e frações obtidas do fracionamento do extrato DCM do fungo <i>Diaporthe oculi</i>	37
Tabela 4. Reunião das frações obtidas do extrato diclorometano do fungo <i>D. oculi</i>	38
Tabela 5. Sistemas de eluição e frações obtidas do refractionamento das frações 7-10 coletadas do extrato DCM do fungo <i>Diaporthe oculi</i>	38
Tabela 6. Sistemas de eluição e frações obtidas do refractionamento das frações 15-17 coletadas do extrato DCM do fungo <i>Diaporthe oculi</i>	39
Tabela 7. Reunião das frações obtidas da fase AcOEt do extrato MeOH do fungo <i>D. oculi</i>	40
Tabela 8. Sistemas de eluição e frações obtidas do fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de <i>D. oculi</i>	40
Tabela 9. Sistemas de eluição e frações obtidas do refractionamento das frações 25-28 coletadas da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de <i>D. oculi</i>	41
Tabela 10. Sistemas de eluição e frações obtidas do refractionamento das frações 33-36 coletadas da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de <i>D. oculi</i>	42
Tabela 11. Sistemas de eluição e frações obtidas do refractionamento das frações 39-41 coletadas da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de <i>D. oculi</i>	42
Tabela 12. Cepas bacterianas utilizadas na avaliação da atividade antibacteriana dos extratos fúngicos.....	44
Tabela 13. Fungos selecionados para triagem, quantidade de massas obtidas e rendimentos dos extratos metanólicos.....	51
Tabela 14. Resultado da CIM, em µg/mL, dos extratos testados frente a 3 bactérias patogênicas humanas utilizando a técnica de microdiluição em caldo.	56
Tabela 15. Massas dos extratos obtidos do fungo <i>D. oculi</i> a partir da extração com solventes orgânicos.....	57
Tabela 16. Ésteres metílicos de ácidos graxos identificados por CG-EM na mistura de triglicerídeos.	65

Tabela 17. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H (CDCl_3 , MHz) do ergosterol e sua comparação com a literatura.	72
Tabela 18. Porcentagem de indivíduos mortos frente às diferentes concentrações.....	77
Tabela 19. Resultado da CIM, em $\mu\text{g/mL}$, dos extratos de <i>Diaporthe oculi</i> testados frente às bactérias patogênicas humanas utilizando a técnica de microdiluição em caldo.	78

1. INTRODUÇÃO

Por séculos, as plantas têm sido utilizadas como matéria-prima na medicina, agricultura, indústria alimentícia, cosmética, entre outros fins. No entanto, a exploração excessiva de espécies vegetais, pode resultar em sua extinção. Como resultado, a busca por alternativas ecológicas para a produção de fitoquímicos valiosos tornou-se uma necessidade. Nesse contexto, os endófitos associados às plantas estão emergindo como uma fonte altamente promissora de substâncias bioativas (CAMPOS & ALBUQUERQUE, 2021; SHARAF *et al.*, 2021).

Os endófitos são microrganismos que habitam os tecidos internos das plantas e estabelecem relações ecológicas sem causar danos às suas hospedeiras. Esses microrganismos também têm a capacidade de reproduzir o metabolismo da planta hospedeira, bem como produzir, induzir e modificar as substâncias químicas dentro dos tecidos vegetais (LI *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2020; NURHAIDA *et al.*, 2023).

Entre os endófitos, os fungos endofíticos vêm se destacando por produzirem uma diversidade de metabólitos secundários bioativos. Os endófitos fúngicos são vantajosos porque quando são isolados *in vitro* e cultivados em condições adequadas, o número de células fúngicas e a produção de metabólitos secundários são multiplicados muito além da concentração normal encontrada nas plantas (GARYALI *et al.*, 2014; TEIMOORI-BOGHSAN *et al.*, 2020).

Os metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos pertencem a diferentes classes químicas, tais como alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides e substâncias fenólicas. Essa diversidade química e funcional de produtos naturais exibe um amplo espectro de propriedades farmacológicas, incluindo atividade anticancerígena, antiviral, antibacteriana, antifúngica, além de aplicações na agricultura, indústria e meio ambiente (MWANGA *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2023).

Com base na riqueza da biodiversidade brasileira e em seu potencial econômico, bem como na crescente demanda por fontes diversificadas de substâncias bioativas, o presente estudo realizou a bioprospecção dos fungos endofíticos de *Deguelia duckeana*. Dado que as atividades biológicas associadas a essa espécie vegetal e seus produtos indicaram potencial antitumoral, antiangiogênico e antifúngico, é possível que seus endófitos sejam fontes promissoras desses produtos bioativos (LIMA *et al.*, 2018; LEITE, *et al.* 2021).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o potencial químico e biológico dos fungos endofíticos isolados de *Deguelia duckeana* quanto a produção de substâncias bioativas.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar fungos endofíticos de *Deguelia duckeana*;
- Avaliar a composição química dos extratos dos fungos endofíticos de *Deguelia duckeana*;
- Selecionar fungo produtor de substâncias interessantes;
- Isolar, identificar ou elucidar as substâncias químicas do fungo selecionado;
- Avaliar as atividades antibacteriana e de toxicidade dos extratos e fases.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microrganismos endofíticos

O termo endófito (*endo* = dentro; *phyte* = planta) foi usado pela primeira vez por Anton de Bary (1866) e referia-se a qualquer microrganismo que habitasse o tecido interno das plantas, diferindo dos epifíticos que se encontram na superfície. Alguns anos depois, Carroll (1986) definiu endófitos como organismos mutualísticos que colonizam partes aéreas de tecidos vegetais vivos e não causam sintomas de doenças, excluindo fungos patogênicos e micorrízicos (DUTTA *et al.*, 2014).

Petrini (1991) propôs expandir a definição de Carroll para incluir todos os organismos que habitam órgãos vegetais e que, em algum estágio de sua vida, podem colonizar tecidos internos da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro. Dessa forma, patógenos latentes, conhecidos por viverem assintomaticamente dentro dos tecidos do hospedeiro, com uma fase epífita em seu ciclo de vida, também são endófitos (SHEN *et al.*, 2022).

Percebe-se que o conceito de endófito tem sido definido de muitas maneiras (WILSON, 1995; HALLMANN *et al.*, 1997; BACON & WHITE, 2000). À medida que o uso do termo se tornou popular e o conhecimento sobre esses organismos aumentou, surgiram confusões e ambiguidades a esse respeito (GALINDO-SOLÍS & FERNÁNDEZ, 2022). Visando agrupar os conceitos, Hyde e Soyong (2008) fizeram um compilado de várias definições de endofíticos propostos por vários pesquisadores (RASHMI *et al.*, 2019). No entanto, embora existam muitas alternativas, a definição de Petrini (1991) é a mais utilizada em estudos com endófitos (SUN & GUO, 2012; GOUDA *et al.*, 2016).

Os principais microrganismos endofíticos são fungos e bactérias, sendo encontrado ao menos um em quase todas as plantas estudadas até o momento (NAIR & PADMAVATHY, 2014). Independente do ambiente em que a planta hospedeira cresça, incluindo o Ártico e a Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas, manguezais e florestas costeiras, os endófitos estão presentes de forma ubíqua em seus tecidos internos. Eles já foram isolados de plantas herbáceas, gramíneas, árvores, arbustos, musgos, samambaias e plantas aquáticas (CONRADO *et al.*, 2022). Além disso, eles possuem um grande potencial de colonizar folhas saudáveis, pecíolos, caules, galhos, cascas, raízes, frutos, flores e sementes (FOUDA *et al.*, 2015).

Para recrutar endófitos, a planta hospedeira estabelece uma simbiose com a grande variedade de micróbios (POTSHANGBAM *et al.*, 2022; TRIPATHI *et al.*, 2022). De acordo com registros fósseis, associações simbióticas entre planta e microrganismo acontecem há mais de 450 milhões de anos (DELAUX & SCHORNACK, 2021). Dessa forma, as relações dos endófitos que vivem em plantas variam de mutualísticas, onde tanto a planta quanto o micróbio se beneficiam, a parasitas, onde o micróbio recebe algum benefício da interação à custa do hospedeiro (YE *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2022).

Na maioria das plantas, a colonização de endófitos ocorre por aberturas naturais ou artificiais, como estômatos, lesões causadas por implementos agrícolas, ou pelo atrito entre as raízes e o solo. Alguns endófitos colonizam o tecido vegetal através da secreção de enzimas, enquanto outros possuem estruturas especializadas, como haustório e apressório (SOARES *et al.*, 2017). A colonização também pode ocorrer verticalmente para sementes de progênie de plantas maternas pelas quais a prole é infectada. Para isso, é necessário que as condições ambientais estejam adequadas (PANACCIONE *et al.*, 2014).

Os endófitos desempenham papéis significativos no aumento do crescimento das plantas hospedeiras (YE *et al.*, 2021). A exemplos temos, o aumento dos nutrientes adquiridos pelas plantas, defesa das plantas contra patógenos e insetos, melhoramento da tolerância a estresse biótico e abiótico, modulação do desenvolvimento ou até mesmo supressão do crescimento de plantas daninhas (WHITE *et al.*, 2019; AHMAD *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020; BILOUS *et al.*, 2023). Em contrapartida, os endófitos são favorecidos com nutrientes e abrigo dentro da planta hospedeira (SINGH & DUBEY, 2018). A sobrevivência e o desenvolvimento das plantas são muitas vezes inseparáveis da participação de tais endófitos (SANTOYO *et al.*, 2016).

3.2 Fungos endofíticos

Os fungos fazem parte do reino Fungi que engloba um grande número de organismos eucarióticos multicelulares e unicelulares (ATLI *et al.*, 2022). Estimava-se que existissem cerca de 1,5 milhão de espécies de fungos no planeta Terra (PADHI *et al.*, 2013). No entanto, Hawksworth e Lücking (2017) propuseram, a partir de taxas de descoberta de espécies, extrapolações de proporções fungo:planta e dados de sequência molecular de amostras ambientais, que a estimativa atual é de 2,2 a 3,8 milhões. Desse valor, cerca de

150.000 espécies fúngicas são descritas na literatura, o que implica dizer que 4 a 7% dos fungos são conhecidos pelos seres humanos (LÜCKING *et al.*, 2021).

Nesse contexto, os fungos endofíticos representam um componente importante e quantitativo da biodiversidade fúngica, sendo conhecidos por influenciar a diversidade vegetal (ATLI *et al.*, 2022). Eles constituem uma comunidade microbiana altamente diversificada e versátil que parece ser onipresente na natureza (WEN *et al.*, 2022). A característica filamentosa da maioria dos fungos permite que esses organismos explorem e controlem um determinado território (NARANJO-ORTIZ; GABALDÓN, 2020). É comum que pesquisas envolvendo estudos com endofíticos encontrem conjuntos constituídos por mais de 30 espécies de fungos por espécie de planta hospedeira (SHUBHA & SRINIVAS, 2017).

Os fungos endofíticos são compostos predominantemente por membros de Ascomycetos e, ocasionalmente, por Basidiomycetos e Zigomicetos (GAKUUBI *et al.*, 2021). Os gêneros mais comuns isolados são *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Aspergillus* e *Xylaria*. Dentre os diferentes substratos, os endófitos foliares foram mais amplamente estudados em comparação com outras partes da planta hospedeira. E a maioria dos estudos sobre endófitos foi realizada em países asiáticos como China e Índia, países europeus como Alemanha, Espanha e Reino Unido. Além disso, importantes contribuições de pesquisas são oriundas do Brasil e dos Estados Unidos (RASHMI *et al.*, 2019).

Como os fungos endofíticos são um grupo taxonomicamente diversificado, sua classificação pode ser bastante desafiadora. Vários sistemas foram propostos para classificar endófitos fúngicos com base em um ou mais aspectos de sua biologia (BAMISILE *et al.*, 2018). O esquema de classificação mais antigo é o que divide os fungos endofíticos em clavicipitáceos e não clavicipitáceos. Este esquema está baseado nas estratégias de filogenia, funções ecológicas e história de vida (GAKUUBI *et al.*, 2021).

Os endófitos clavicipitáceos, também conhecidos como endófitos de gramíneas ou endófitos de classe 1, consistem principalmente de membros pertencentes à família *Clavicipitaceae*. Esse grupo é composto por 27 gêneros conhecidos, que incluem tanto vida livre quanto a coleção diversificada de espécies simbióticas. Por outro lado, os não clavicipitáceos são um grupo polifilético e diversificado cujos membros não são bem

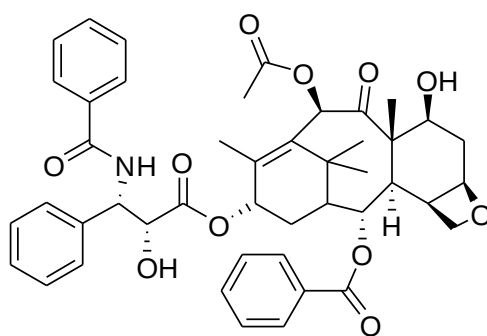
definidos taxonomicamente. A maioria dos seus membros pertence ao sub-reino Dikarya (Ascomycota ou Basidiomycota) (GAKUUBI *et al.*, 2021).

Os não clavicipitáceos estão divididos em classes 2, 3 e 4. A classe 2 apresenta baixa diversidade, mas possui ampla capacidade de colonização, podendo ocupar tecidos tanto acima quanto abaixo do solo, incluindo parte aérea, raízes e rizomas. A classe 3 apresenta alta diversidade em uma determinada planta hospedeira e, assim como a classe 4, consegue colonizar apenas tecidos acima do solo na parte aérea e na raiz. A classe 4 também possui ampla capacidade de colonização, embora sua diversidade não seja muito conhecida na atualidade (CARUSO *et al.*, 2022).

Além desse tipo de classificação, muitos autores sugerem a necessidade de subdividir ainda mais esses endófitos fúngicos em subclasses, utilizando critérios diversos, tais como: a faixa do hospedeiro, o modo de reprodução, a parte da planta colonizada, o modo de transmissão, a fonte de nutrição e a capacidade de expressar sintomas na planta hospedeira (SEGARAN & SATHIAVELU, 2019).

A primeira cepa endofítica foi isolada em 1898 a partir das sementes de azevém (*Lolium temulentum*), por Vogl *et al.* (WEN *et al.*, 2022). Embora essa descoberta tenha sido interessante, não despertou muita atenção até o isolamento do fungo endofítico feito por Stierle e Strobel em 1993. O fungo endofítico *Taxomyces andreanae*, tinha capacidade de produzir taxol (figura 1), uma substância química altamente valorizada com propriedades anticancerígenas, produzida pela hospedeira do fungo (STIERLE & STROBEL, 1993; HEINIG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2022). Essa descoberta impulsionou estudos sobre os fungos endofíticos, mudando o foco das fontes de metabólitos bioativos de plantas para os de fungos endofíticos, devido sua peculiaridade, diversidade e potencial biológico (HEINIG *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2020).

Figura 1. Estrutura do taxol.



3.3 Metabólitos secundários de fungos endofíticos

Os metabólitos secundários, conhecidos também como substâncias bioativas, metabólitos especializados, produtos secundários, constituintes fitoquímicos, produtos naturais, entre outros, são substâncias orgânicas produzidas principalmente por plantas, fungos e bactérias (MIKAIL *et al.*, 2022). Essas substâncias possuem baixo peso molecular e se referem a vias e produtos do metabolismo não essenciais para a vida dos seres vivos (YANG *et al.*, 2018). Desse modo, se diferem dos metabólitos primários, pelo momento da biossíntese e dispensabilidade para o crescimento e desenvolvimento do seu produtor (ERB & KLIEBENSTEIN, 2020; PFANNENSTIEL & KELLER, 2019).

Os fungos produzem uma rica fonte de metabólitos secundários, que representam um espaço químico valioso e diversificado de produtos naturais (VIVEKANANTH *et al.*, 2021). Embora produzidos em concentrações muito baixas, os metabólitos secundários podem conferir importantes vantagens seletivas aos fungos (NARANJO-ORTIZ & GABALDÓN, 2020). Eles são utilizados para se comunicar quimicamente com predadores e competidores, para defender o habitat ou para inibir o crescimento de concorrentes, sendo fundamentais para adaptação e/ou sobrevivência dos fungos em um determinado ambiente (COMBÈS *et al.*, 2012; CHAGAS, *et al.*, 2013; CONRADO *et al.*, 2022).

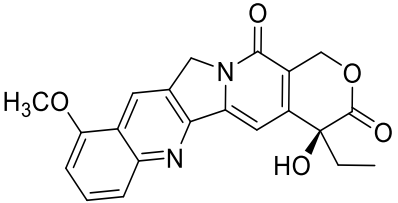
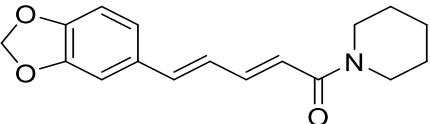
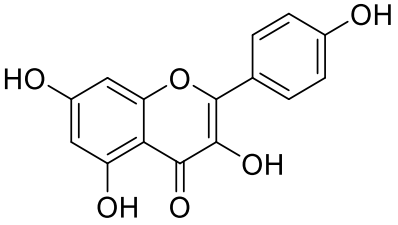
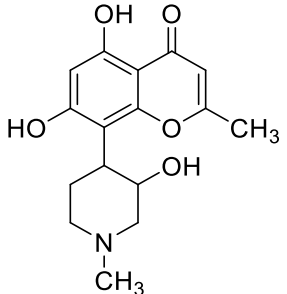
Nos estudos mais recentes, os fungos endofíticos têm se destacado por produzir inúmeros metabólitos secundários bioativos entre as espécies fúngicas. Tal descoberta tem suscitado crescente interesse por parte de químicos de produtos naturais e biólogos, que investigam as estruturas químicas produzidas por esses fungos isolados de diversas espécies de plantas (NISA *et al.*, 2015; GUPTA *et al.*, 2023).

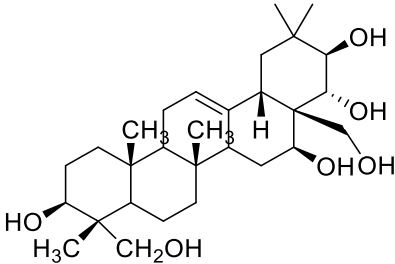
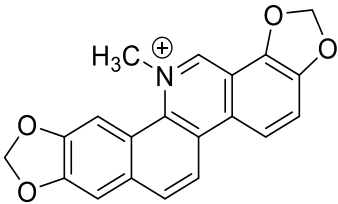
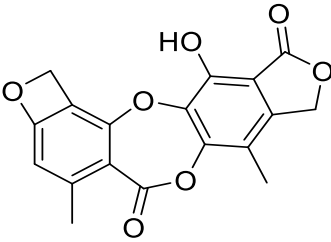
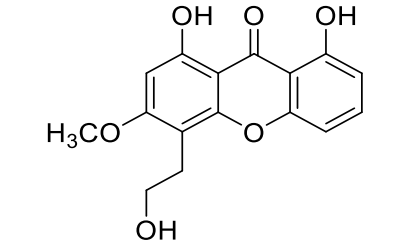
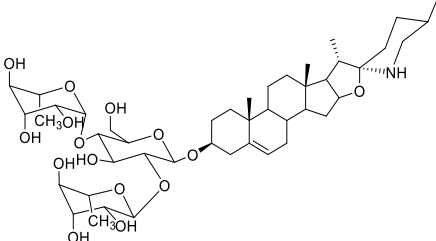
De acordo com Ortega e colaboradores (2021), houve um aumento no número de patentes relacionadas ao uso de endófitos para fins biológicos, agrícolas, fitorremediação e para a produção de produtos naturais ativos com aplicações biomédicas. Dados estatísticos coletados por Liu e colaboradores (2018) entre 2013 e 2017 mostraram que 31,6% das 167 moléculas com novos esqueletos e bioatividades eram produtos de fungos endofíticos.

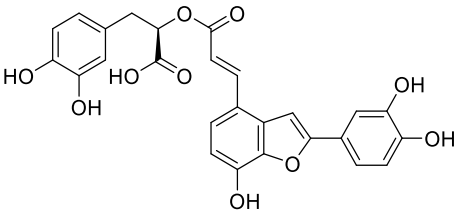
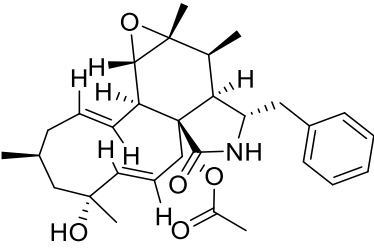
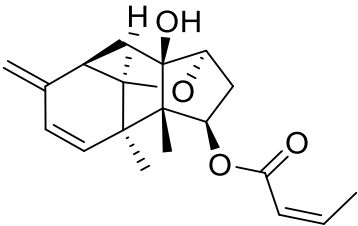
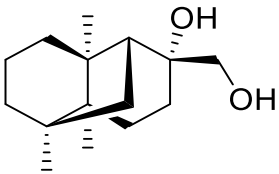
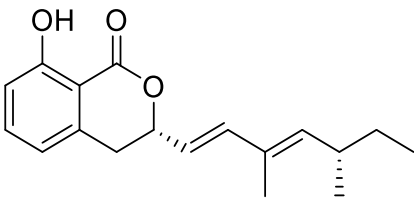
Muitas dessas substâncias possuem novos esqueletos com atividades citotóxicas, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias, antitumorais, antimaláricas, dentre outras (ATEBA *et al.*, 2018; UKWATTA *et al.*, 2020). Tais esqueletos pertencem a diferentes classes químicas, que incluem alcaloides, flavonoides, esteroides, terpenoides e

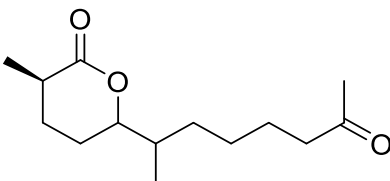
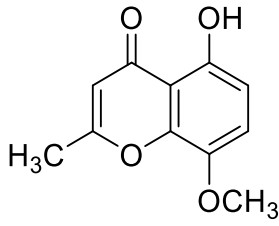
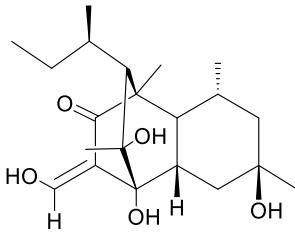
substâncias fenólicas (WEN *et al.*, 2022). Alguns exemplos de metabólitos bioativos de fungos endofíticos foram reunidos na tabela abaixo.

Tabela 1. Exemplos de metabólitos secundários bioativos de fungos endofíticos.

Substância	Propriedades biológicas	Cepa fúngica (Planta hospedeira)	Referência
 9-metoxicamptotecina (9-MCPT)	Antitumoral	<i>Botryosphaeria dothidea</i> (<i>Camptotheca acuminata</i>)	(DING <i>et al.</i> , 2013)
 Piperina	Antimicrobiana, antidepressiva, anti-inflamatória e anticâncer	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (<i>Piper nigrum</i>)	(CHITHRA <i>et al.</i> , 2014)
 Kaempferol	Atividades anticancerígenas, antioxidantes e anti-inflamatórias	<i>Mucor fragilis</i> (<i>Sinopodophyllum hexandrum</i>)	(HUANG <i>et al.</i> , 2014)
 Rohitukina	Anticâncer, citotóxico e inibidor de CDK	<i>Fusarium solani</i> (<i>Dysoxylum binectariferum</i>)	(KUMARA <i>et al.</i> , 2014)

 Gimnemagenina	Antidiabético	<i>Penicillium oxalicu</i> (<i>Gymnema sylvestre</i>)	(PARTHASARATHY & SATHIYABAMA, 2014)
 Sanguinarina	Antibacteriana, anti-helmíntica e anti-inflamatória	<i>Fusarium proliferatum</i> (<i>Macleaya cordata</i>)	(WANG <i>et al.</i> , 2014)
 Phomopsidona A	Atividades citotóxicas, antioxidantes e antifúngicas.	<i>Phomopsis</i> sp. A123 (<i>Kandelia candel</i> (L.))	(ZHANG <i>et al.</i> , 2014)
 1,8-di-hidroxi-4-(2-hidroxi-etil)-3- metoxixantona	Citotóxica	<i>Phomopsis amygdali</i> (<i>Paris axialis</i>)	(YUAN <i>et al.</i> , 2015)
 Solamargina	Anticancerígena	<i>Aspergillus flavus</i> (<i>Solanum nigrum</i>)	(EL-HAWARY <i>et al.</i> , 2016)

 Ácido salvianólico C	Cardiovascular e cerebrovascular	<i>Phoma glomerata</i> (<i>Salvia miltiorrhiza</i>)	(LI <i>et al.</i> , 2016)
 Epoxicitocalasina H	Antimalárica	<i>Diaporthe miriciae</i> (<i>Vellozia gigantea</i>)	(FERREIRA <i>et al.</i> , 2017)
 Tricotecotocina A	Anti- fitopatogênica	<i>Trichothecium</i> <i>crocinigenum</i> (<i>Solanum tuberosum</i>)	(YANG <i>et al.</i> , 2018)
 Emericelina A	Antifúngica, antibacteriana	<i>Emericella</i> sp. XL 029 (<i>Panax notoginseng</i>)	(PANG <i>et al.</i> , 2018)
 Diaporona A	Antibacteriano	<i>Diaporthe</i> sp. (<i>Pteroceltis</i> <i>tatarinowi</i>)	(GUO <i>et al.</i> , 2020)

 Chermesiterpenóide B	Antibacteriano	<i>Penicillium chermesinum</i> EN-480 (<i>Pterocladiella tenuis</i>)	(HU <i>et al.</i> , 2020)
 5-hidroxi-8-metoxi-2-metil-4H-cromo-4-ona	Fitotóxica	<i>Daldinia eschscholtzii</i> (<i>Gliricídia sepium</i>)	(FLORES-RESÉNDI <i>et al.</i> , 2021)
 Betaenona A	Citotóxica e fitotóxica	<i>N. betae</i> (<i>Suaeda glauca</i> (Bunge))	(LIU <i>et al.</i> , 2023)

3.4 Resistência antibacteriana e a necessidade de novos agentes antimicrobianos

As bactérias são microrganismos altamente adaptáveis ao longo do tempo, com o objetivo principal de se replicar, sobreviver e se disseminar. Para alcançar uma propagação rápida e eficiente, elas podem se ajustar às condições ambientais e evoluir de maneiras que garantam sua existência contínua. Quando algo, como um antibiótico, impede o crescimento das bactérias, elas tem a capacidade de desenvolver resistências ao medicamento, permitindo sua sobrevivência (LIEBERMAN *et al.*, 2014; UDDIN *et al.*, 2021).

A resistência das bactérias aos antibióticos pode ser classificada em dois tipos: resistência intrínseca ou inata e resistência adquirida. A primeira é composta por alguns gêneros (ou) espécies bacterianas específicas que possuem características estruturais/funcionais únicas que proporcionam resistência a determinados antibióticos. Os mecanismos bacterianos mais comuns envolvidos na resistência intrínseca são a redução da permeabilidade da membrana externa (mais especificamente o lipopolissacarídeo, em bactérias Gram-negativas) e a atividade natural das bombas de efluxo (KHAMENEH *et al.*, 2016; ABUSHAHEEN *et al.* 2020).

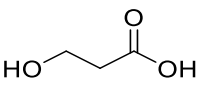
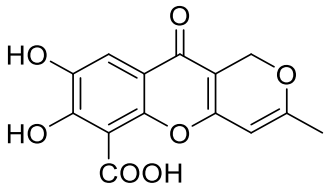
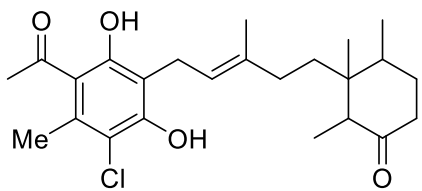
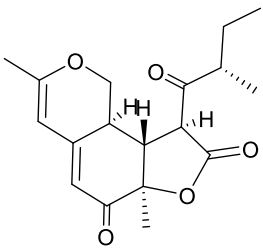
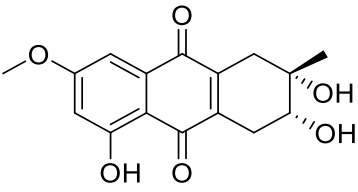
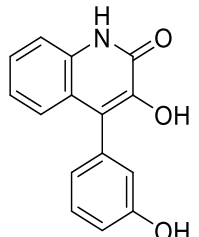
A resistência adquirida, por sua vez, decorre da aquisição de genes de resistência pelas bactérias, da mutação do DNA cromossômico e da combinação desses dois mecanismos. A obtenção de genes pode ocorrer por meio das principais vias pelas quais as bactérias adquirem material genético, tais como transformação, transposição e conjugação. Mutações cromossômicas são eventos raros em bactérias e resultam de erros durante a replicação cromossômica ou de reparos inadequados do DNA danificado (KHAMENEH *et al.*, 2016; REYGAERT, 2018).

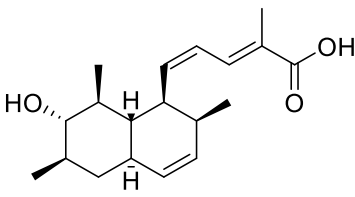
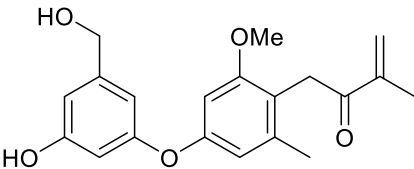
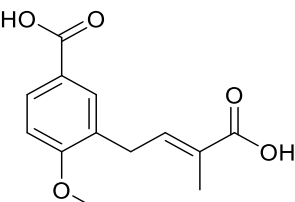
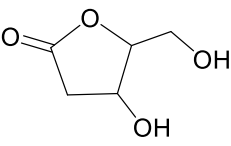
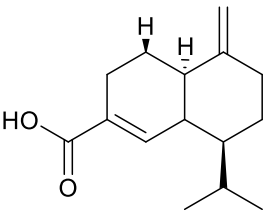
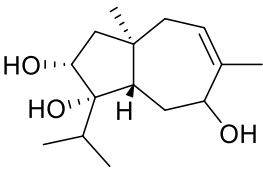
A resistência antibacteriana, juntamente com a escassez de novos medicamentos antimicrobianos, é um sinal alarmante para a saúde humana, animal e ambiental em todo o mundo. Uma lista de prioridades para bactérias resistentes a antibióticos foi criada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para orientar a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos. Organismos críticos prioritários incluem *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*, que são resistentes aos carbapenêmicos. O grupo de alta prioridade inclui *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, *Salmonella* spp. e *Neisseria gonorrhoeae*, enquanto *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Shigella* spp. fazem parte do grupo de prioridade mediana (PAPHITOU, 2013; OMS, 2017; ASOKAN *et al.*, 2019).

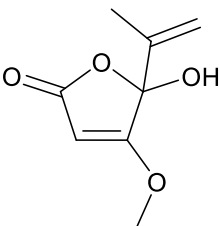
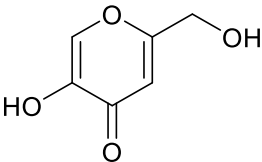
De acordo com a Organização Mundial da Saúde, se medidas não forem tomadas para conter a multirresistência bacteriana, até 2050, doenças resistentes a medicamentos poderão causar até 10 milhões de mortes anualmente. Isso tem um impacto social e financeiro significativo, além do aumento de taxas de mortalidade associadas a bactérias multirresistentes, há também despesas com saúde e perda de produtividade. (PAPHITOU, 2013; OLIVEIRA, 2019; OMS, 2019).

Nesse contexto, a busca por novos agentes antibacterianos a partir de produtos naturais tem se mostrado uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novos medicamentos. Os endófitos fúngicos, por sua vez, têm sido relatados como excelentes fontes de metabólitos secundários estruturalmente novos e bioativos. Estes metabólitos bioativos podem ser excelentes pontos de partida para a criação de novos antibióticos no combate a cepas resistentes (MBEKOU *et al.*, 2021). Diante disso, a tabela 2 apresenta alguns metabólitos bioativos produzidos por fungos endofíticos com propriedades antibacterianas.

Tabela 2. Exemplos de metabólitos de fungos endofíticos com propriedades antibacterianas.

Substância	Fungo endofítico	Propriedade antibacteriana	Referência
 Ácido 3-Hidroxi propionico	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	<i>Saphylococcus aureus</i> e <i>Saphylococcus typhi</i>	(SEBASTIANES <i>et al.</i> , 2012)
 Penialidina A	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	(JOURDA <i>et al.</i> , 2014)
 4,5-diidroascoclorina	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Bacillus megaterium</i>	(HUSSAIN <i>et al.</i> , 2015)
 Colletotrichona C	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Escherichia coli</i> e <i>P. aeruginosa</i>	(WANG <i>et al.</i> , 2016)
 Altersolanol B	<i>Phomopsis longicolla</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> e <i>Vibrio anguillarum</i>	(LI <i>et al.</i> , 2017)
 Viridicatol	<i>Penicillium</i> sp. R22	<i>Staphylococcus aureus</i>	(MA <i>et al.</i> , 2017)

 6-(2'S-hidroxi-1'-heptil)-4-hidroxi-3-metil-2H-piran-2-ona	<i>Penicillium ochrochloronthe</i>	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> ; <i>S. entérica</i> e <i>S. typhi</i>	(ZHAO <i>et al.</i> , 2018)
 (4-(3-metoxi-5-metilfenoxi)-2-metoxi-6-metilfenil)-3-metilbut-3-en-2-ona.	<i>Phomopsis fukushii</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	(LI <i>et al.</i> , 2018)
 Ácido rizopicnis A	<i>Rhizopycnis vagum</i> Nitaf22	<i>B. subtilis</i> , <i>S. hemolyticus</i> , <i>A. tumefaciens</i> , <i>P. lachrymans</i> , <i>R. solanacearum</i> e <i>X. vesicatoria</i>	(WANG <i>et al.</i> , 2018)
 2'-desoxirribolactona	<i>Curvularia. sp.</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Pseudomonas agarici</i> e <i>Staphylococcus warneri</i>	(KAANICHE <i>et al.</i> , 2019)
 Tricocadinina D	<i>Trichoderma virens</i>	<i>E. coli</i> , <i>A. hidrofilia</i> , <i>M. luteus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>V. harveyi</i> e <i>V. parahemolyticus</i>	(SHI <i>et al.</i> , 2019)
 β-hidroxi CAF-603	<i>Artemisia argyi</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	(SHI <i>et al.</i> , 2021)

 Ácido penicílico	<i>Chaetomium elatum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	(ESHBOEV <i>et al.</i> , 2023)
 Ácido kójico	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Aeromonas sobria</i>	(NURUNNABI <i>et al.</i> , 2018; YE <i>et al.</i> , 2023)

3.5. Ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach

Artemia salina Leach é um microcrustáceo adaptado a condições hipersalinas que tem a capacidade de mudar seu modo reprodutivo, produzindo cistos quando as condições ambientais se tornam desfavoráveis. Os cistos são embriões de gástrula altamente resistente com capacidade de tolerar altos níveis de radiação UV, anóxia prolongada, temperaturas extremas e ciclos repetidos de hidratação e desidratação severa. Os cistos são colhidos comercialmente e podem ser armazenados por anos em bancos de cistos de laboratório para bioensaios de toxicidade (GAJARDO & BEARDMORE, 2012; LENORMAND *et. al.*, 2018).

Os bioensaios de toxicidade são elaborados com o propósito de avaliar ou prever os efeitos tóxicos em sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias. Eles envolvem a exposição de extratos microbiano, animal, vegetal ou mineral, no crescimento ou sobrevivência de um determinado organismo. Dentro desse contexto, a *Artemia salina*, é um modelo animal amplamente empregado na triagem de toxicidade devido a rapidez, baixo custo, eficiência e à necessidade de uma quantidade mínima de amostra. Além disso, esse ensaio não requer soro animal e, portanto, evita o uso desnecessário de animais em experimentos científicos (RAJABI *et al.*, 2015; ATAYDE, 2017; JIMOH *et al.*, 2020; OKUMU *et al.*, 2021).

3.6 O gênero *Diaporthe*

O gênero *Diaporthe* foi estabelecido por Nitschke em 1870 e pertence à família *Diaporthaceae*. Trata-se de um gênero altamente complexo, caracterizado por seu

pleomorfismo. Sendo a forma telemórfica, *Diaporthe*, tem se destacado principalmente por suas filogenias moleculares (MANAWASINGHE *et al.*, 2019). A partir do estabelecimento de critérios de identificação, baseados na associação de hospedeiros, morfologia e características de cultura, ocorreu um considerável aumento no número de espécies de *Diaporthe*. Atualmente, são relatados mais de 1.100 epítetos para *Diaporthe* e 986 para *Phomopsis*, sua forma assexuada (DISSANAYAKE *et al.*, 2020).

As espécies de *Diaporthe* apresentam ampla distribuição global e diversos modos de nutrição, estabelecendo associações hospedeiras com árvores, vegetais, frutas e plantas ornamentais (LUO *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2022). Elas exibem uma variedade de comportamentos, podendo atuar como patógenos, endófitos e sapróbios em diversos hospedeiros, incluindo humanos e outros mamíferos. Quando se manifestam como patógenos vegetais, as espécies de *Diaporthe* podem causar diversos sintomas, como manchas foliares, pragas, morte, crosta, decomposição, podridão da extremidade do caule, tronco, ou mesmo doenças de murcha (UDDIN *et al.*, 2013).

Ademais, *Diaporthe* (incluindo seu estado *Phomopsis*) é um dos gêneros de fungos endofíticos mais frequentemente encontrados em plantas. Segundo Chaisiri e colaboradores (2021), uma única espécie de *Diaporthe* pode estar associada a diferentes hospedeiros, enquanto um único hospedeiro pode ser infectado por várias espécies de *Diaporthe*. Além disso, existe considerável variabilidade nos caracteres genotípicos dentro de uma espécie, isso faz com que o gênero seja considerado uma fonte potencial de metabólitos que podem ser utilizados numa variedade de aplicações farmacológicas (SONG *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2018).

Como exemplos de metabólitos bioativos de espécies do gênero *Diaporthe*, podem ser mencionadas as diaportonas A e B, isoladas de *Diaporthe* sp. P133, um fungo endofítico de *Pandanus amaryllifolius*. Essas substâncias demonstraram capacidade de inibir o crescimento da cepa *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇RV, com concentração inibitória mínima (CIM) de 100,9 µM para diaportonas A e uma CIM significativamente menor de 3,5 µM para a diaportona B (BUNGIHAN *et al.*, 2011). Já a linhagem endofítica *Diaporthe* CY-5286, isolada de plantas de manguezal chinês, produziu dicerandrol D que apresentou atividade antimalárica nanomolar e baixa citotoxicidade (CALCUL *et al.*, 2013).

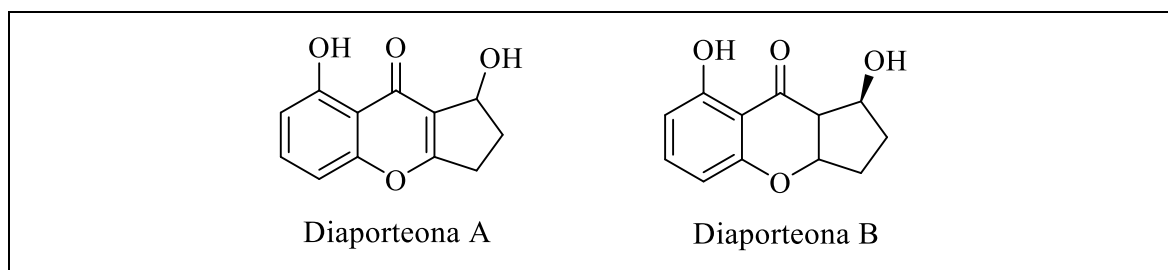
Uma cepa de *Diaporthe helianthi* isolada de *Luehea divaricata* produziu o metabólito tirosol, um composto fenólico bem conhecido com propriedades antioxidantes e

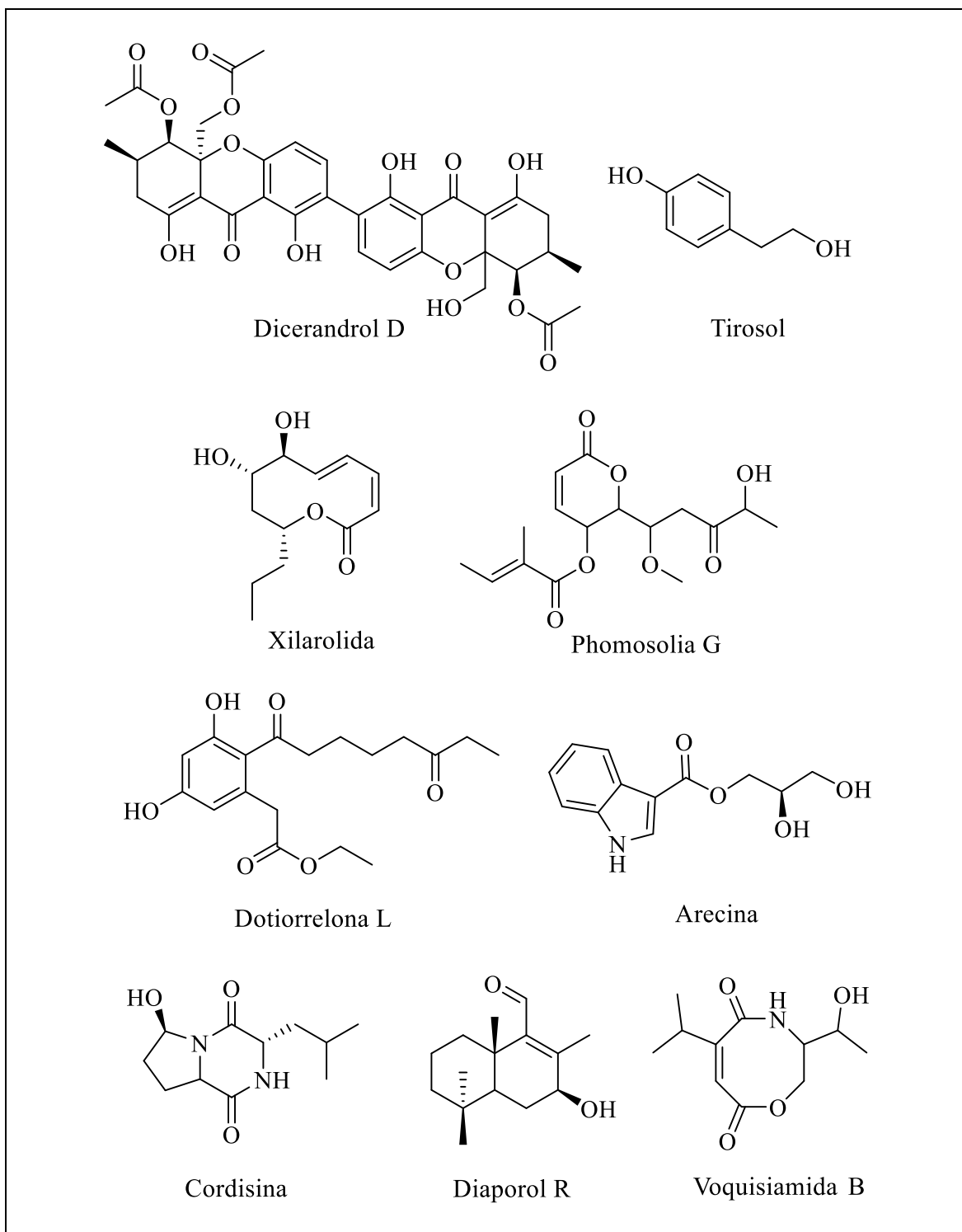
antimicrobiana (SPECIAN *et al.*, 2012). Em *Diaporthe terebinthifolii*, foi relatado a presença de xilarolida, substância que possui atividade citotóxica contra a linhagem celular de câncer de mama, além de atividade antifúngica moderada contra *C. albicans* (YEDUKONDALU *et al.*, 2016). Já em *Diaporthe* sp. AC1, endófito fúngico associado a *Artemisia argyi*, foram isolados 8 metabólitos incluindo um novo, o phomopsolida G, que apresentou atividades antifúngicas, antibacterianas e citotóxicas (GU *et al.*, 2022).

Investigações químicas de *Diaporthe pseudomangiferaea*, isolado de folhas de *Tylophora ouata*, levou ao isolamento de 18 metabólitos. Dentre estes, 6 inibiram a ativação de células MRC-5 de fibroblastos pulmonares humanos, com destaque para a substância dotiorrelona L, que possuiu atividades mais fortes (LIU *et al.*, 2018). Em *Diaporthe arecae*, um fungo endofítico associado ao mangue *Kandelia obovate*, foram isolados 23 dicetopiperazinas e um indolglicerol, designado como arecina. A cordisinina A, dentre as dicetopiperazinas, exibiu atividade antiangiogênica promissora em células progenitoras endoteliais humanas (CHANG *et al.*, 2019).

Chen e colaboradores (2015), investigaram os constituintes químicos de *Diaporthe* sp., um fungo endofítico associado às folhas de *Rhizophora stylosa*, que levou ao isolamento de 10 novos sesquiterpenoides, dos quais, o diaporol R apresentou citotoxicidade moderada contra a linhagem celular SW480 com CI_{50} no valor de $8,72 \pm 1,32 \mu M$. Em estudos de extratos brutos de *Diaporthe vochysiae* foi relatado considerável atividade antibacteriana, principalmente contra bactérias Gram-negativas. A avaliação química desta espécie levou ao isolamento de voquisiamida B, que inibiu o crescimento de *Klebsiella pneumoniae*, com CIM de $80 \mu g/mL$ (NORILER *et al.*, 2019). A figura 2 ilustra as estruturas químicas das substâncias.

Figura 2. Estruturas químicas isoladas de espécies do gênero *Diaporthe*.





3.7 A hospedeira *Deguelia duckeana*

O gênero *Deguelia* é composto por cerca de 21 espécies neotropicais distribuídas desde o Brasil até a Costa Rica e Nicarágua, sendo um dos aproximadamente 650 gêneros pertencentes à família Fabaceae (FLORA DO BRASIL, 2022). No Brasil, são relatadas

pouco mais de 15 espécies endêmicas, sendo que a maior diversidade de espécies do gênero é encontrada na Floresta Amazônica, no Cerrado e na Mata Atlântica (LIMA *et al.*, 2017).

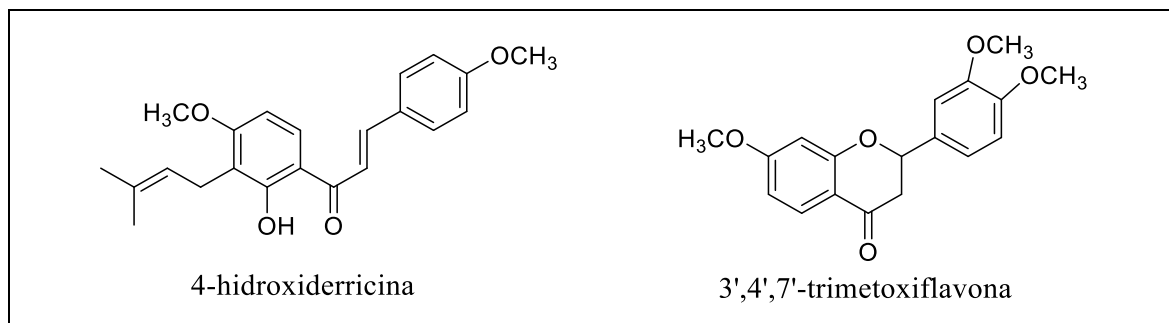
Entre as espécies do gênero *Deguelia*, a *Deguelia duckeana* (figura 3), identificada pela Dra. Ana Maria Goulart de Azevedo Tozzi, é uma liana conhecida popularmente por sua característica ictiotóxica. Comumente chamada de timbó ou cipó-cururu, sua distribuição ocorre predominantemente na região norte do Brasil, com presença confirmada nos estados Amazonas, Pará e Rondônia (LIMA *et al.*, 2013; CAMARGO & TOZZI, 2014).

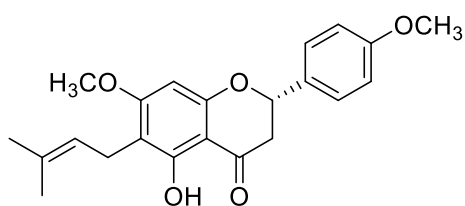
Figura 3. Espécie hospedeira *Deguelia duckeana* mantida no viveiro do LABB-INPA.



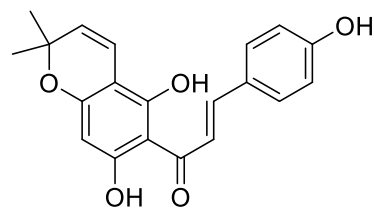
Quanto a composição química de *D. duckeana*, esta é caracterizada pela alta presença de flavonoides, o que é comum no gênero *Deguelia*. Estudos fitoquímicos dessa espécie identificaram chalconas, estilbenos, lignanas e esteróides, os quais podem ser visualizados na figura 4 (CURSINO *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2018).

Figura 4. Substâncias isoladas de *Deguelia duckeana*.





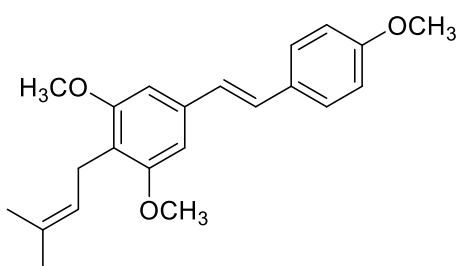
5-hidroxi-4',7-dimetoksi-6-prenilflavanona



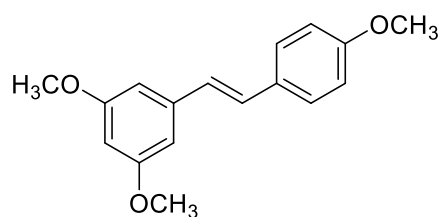
lonchocarpina (R=H)

4-hidroxi lonchocarpina (R= OH)

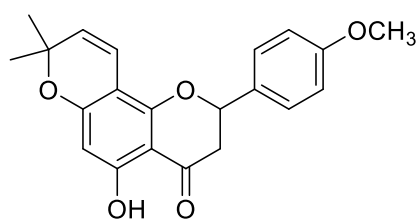
4-metoxi lonchocarpina (R= OCH₃)



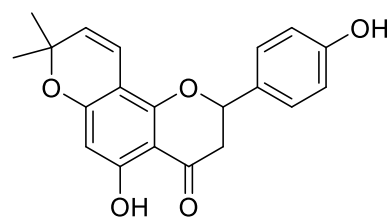
3,5,4' - trimetoksi-4-prenilstilbeno



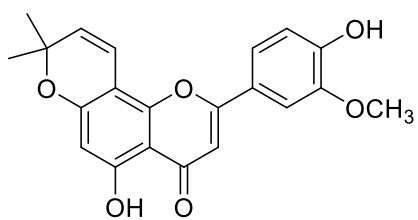
3,5,4' - trimetoksiestilbeno



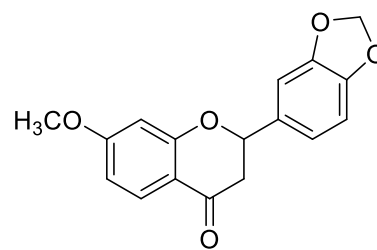
4'-metoksiisolonchocarpina



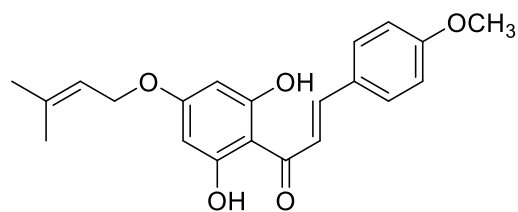
4'-hidroxiisolonchocarpina



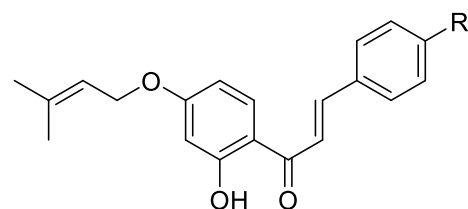
2,2-dimetilcromona-5,4'-hidroxi-5'-metoksi flavona



3',4'-metilenodioxi-7-metoksi flavona

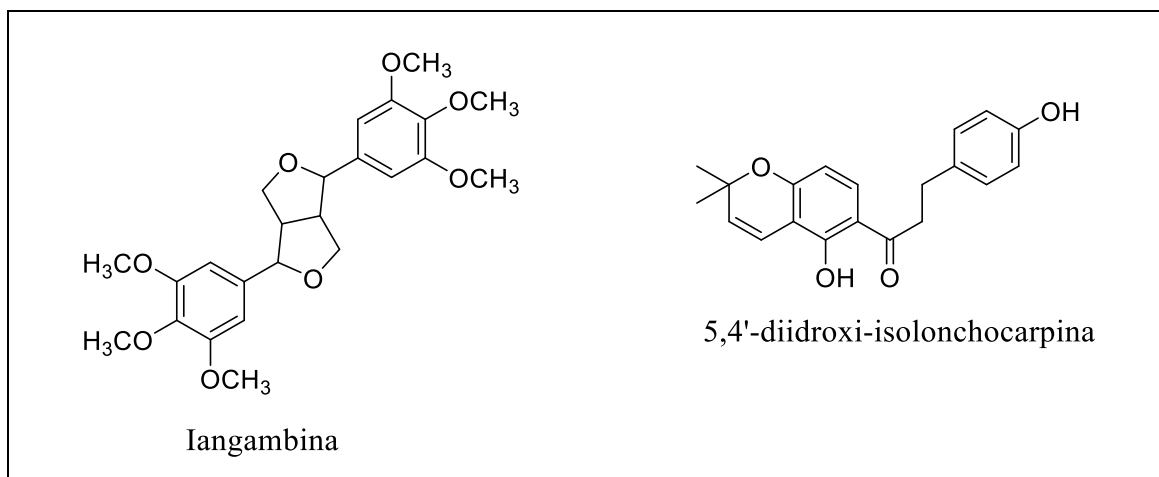


4-metoxiderricidina



derricidina (R=H)

4-hidoxiderricidina (R=OH)



Quanto as investigações biológicas, Lima e colaboradores (2013) relataram que os extratos brutos de folhas, galhos e raízes da *Deguelia duckeana* apresentaram alto potencial citotóxico contra o microcrustáceo *Artemia salina*, sendo 100% letais até mesmo na concentração de 5,0 mg/mL. Também foi relatado neste estudo, que apenas o extrato hexânico dos caules mostrou atividade moderada contra *S. aureus* e todos os extratos apresentaram baixo potencial antioxidante. Outro estudo relatou a atividade antimicobacteriana frente à cepa *Mycobacterium tuberculosis* em concentração mínima de 100 µg/mL (CARRION et al., 2013).

Já Cursino e colaboradores (2016), relataram que a chalcona 4-hidroxiisolonchocarpina e a flavanona 4'-hidroxiisolonchocarpina, isoladas das raízes da *D. duckeana*, demonstraram grande potencial anticâncer ao induzirem a morte celular em células neuronais SK-N-SH usando o ensaio de LDH. Esses efeitos citotóxicos podem explicar as mortes relatadas em peixes. Por outro lado, a flavonona 3',4'-metilenodioxi-7-metoxiflavona reduziu o metabolismo celular no ensaio MTT sem induzir citotoxicidade. Além disso, esse foi o primeiro estudo a demonstrar flavonoides afetando a fosforilação de eEF2, AMPK e eIF4E.

A literatura também relata atividade antifúngica do extrato diclorometânico da raiz, que apresentou concentração inibitória mínima de 800 µg/mL. Também é relatado o isolamento de 104 fungo. Também é relatado o isolamento de 104 fungo. Também é relatado o isolamento de 104 fungo contra o fungo *Cryptococcus gattii*. A 4-hidroxiisolonchocarpina, isolada desse extrato, foi ativa contra os fungos *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. albicans* (LIMA et al., 2018). Os extratos hexânicos, principalmente das raízes, apresentaram atividades antiangiogênicas consideráveis. O 3,5,4'-trimetoxiestilbeno e a 4-metoxisolonchocarpina,

substâncias fenólicas isoladas do extrato hexânico das raízes, apresentaram tal potencial antiangiogênico (LEITE *et al.*, 2021).

Nesse sentido, considerando o histórico fitoquímico e as atividades biológicas reportadas às substâncias isoladas da planta *D. duckeana*, a execução desta pesquisa é justificada, pela exploração biotecnológica de fungos endofíticos associados a referida espécie vegetal. Na pretensão de averiguar se os fungos produzem as mesmas substâncias químicas que a planta hospedeira, visando o aumento de produção dessas moléculas, ou se sintetizam outras moléculas com potencial biotecnológico. Além do mais, este estudo é pioneiro para espécie vegetal em questão e complementa conhecimentos sobre os microrganismos endofíticos da Amazônia.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

Foram coletadas folhas saudáveis e de boa qualidade fitossanitária da espécie *Deguelia duckeana* (Figura 5) no viveiro do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia-LABB, localizado no INPA - Campus I, com número de registro de exsicata 278426, o qual se encontra depositado no herbário do INPA. O estudo foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN/MMA) sob o número: A5B34C1. Em seguida, o material vegetal foi levado para o LABB para ser processado.

Figura 5. Folhas de *Deguelia duckeana* utilizadas nesse trabalho.



4.2 Desinfecção do material vegetal e isolamento de fungos endofíticos

Antes do procedimento de desinfecção das folhas, preparou-se meio de cultura sólido batata dextrose ágar (BDA), o qual foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos e adicionado em placas de Petri estéreis. Estas foram armazenadas em incubadora BOD a 30 °C, com observação de 24 h. Outros materiais (água destilada, béqueres, cabos de bisturi, pinças, ponteiros de pipeta automática etc.) também foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 35 minutos.

A desinfecção do material vegetal foi realizada para a retirada dos microrganismos epifíticos. Quatro folhas saudáveis foram lavadas em água corrente com detergente líquido neutro. Em seguida, na câmara de fluxo laminar, as folhas foram imersas sequencialmente em béqueres contendo agentes desinfetantes na seguinte ordem: imersão em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito 2,5% (4 minutos), álcool 70% (1 minuto), e, por fim as folhas foram lavadas 3 vezes em água destilada estéril. Foi realizado o controle da última água da lavagem a fim de verificar a eficiência do método de desinfestação em relação à eliminação da microbiota epifítica. Para isso, foram retirados 500 µL da água e inoculados em três placas contendo meio sólido BDA.

Posterior a desinfecção, as folhas foram cortadas com auxílio de bisturi e pinça em pequenos fragmentos que foram inoculados em placas de Petri contendo meio sólido BDA suplementado com oxitetraciclina 125 µg/mL. Foram adicionados cinco fragmentos por placa, e as placas foram incubadas a 30 °C por 10 dias em incubadora BOD. Durante esse período, foi acompanhado o surgimento das cepas fúngicas para fora do tecido vegetal, as mesmas foram transferidas para novas placas de Petri com meio BDA.

A taxa de colonização (TC) foi calculada conforme (AZEVEDO, 1998):

$$Tc (\%) = \frac{\text{Número total de isolados} \geq 1}{\text{Número total de fragmentos}} \times 100$$

4.3 Purificação e conservação dos fungos endofíticos isolados de *Deguelia duckeana*

Após os isolamentos dos endófitos de *D. duckeana*, as colônias fúngicas foram repicadas para novos meios de cultura (BDA) a fim de realizar a purificação para posterior conservação.

Os isolados foram conservados através da criopreservação, no qual seis fragmentos de meio com o crescimento fúngico foram transferidos para uma solução contendo caldo nutriente e glicerol a 20% v/v, e mantidos em ultrafreezer a -80°C .

4.4 Avaliação preliminar dos fungos endofíticos isolados de *Deguelia duckeana* para a produção de metabólitos

4.4.1 Cultivo dos fungos endofíticos em pequena escala

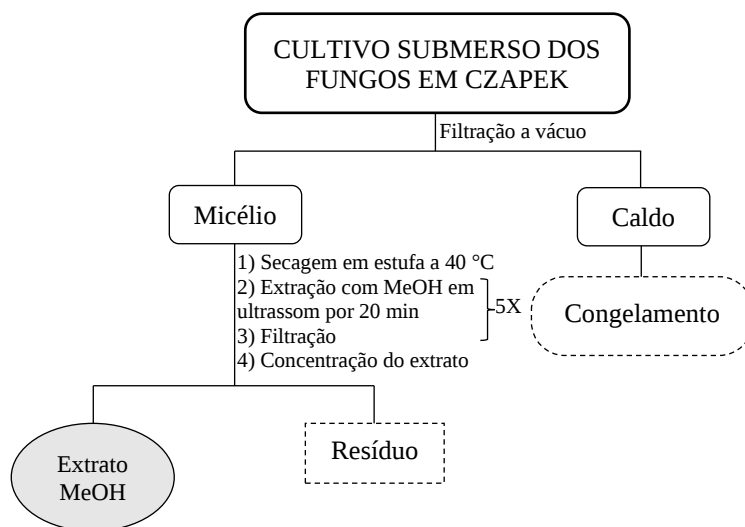
Dos fungos endofíticos isolados, realizou-se uma seleção para o cultivo submerso. Os fungos selecionados foram repicados em placa de Petri com meio BDA e após 8 dias de crescimento, foram submetidos ao cultivo submerso. O cultivo submerso foi realizado com meio líquido Czapek acrescido de 0,2% de extrato de levedura. Para cada fungo, utilizou-se Erlenmeyer de 500 mL, contendo 250 mL de meio de cultura. Os Erlenmeyers foram acondicionados em incubadora de bancada a 30°C com agitação orbital, a 120 rpm, por um período de 20 dias.

Após o período de crescimento estabelecido, os caldos fermentados foram separados da massa micelial por meio de um sistema de filtração a vácuo (kitassato, funil de Büchner e papel filtro). Os caldos fermentados foram acondicionados em potes e congelados, e os micélios foram submetidos a extrações.

4.4.2 Extração dos micélios dos fungos isolados de *Deguelia duckeana*

A massa micelial de cada fungo foi seca em estufa de ar circulante a temperatura de 40°C . Posteriormente, os micélios foram transferidos para Erlenmeyers para extração dos metabólitos. As extrações foram feitas em banho de ultrassom (40 kHz, Unique) com o solvente orgânico metanol (MeOH), por vinte minutos e cinco repetições. Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 40°C (Figura 6). Posteriormente os extratos foram secos em capela de exaustão de gases e então foram pesados em balança analítica e submetidos a prospecção química para escolha do fungo de interesse.

Figura 6. Fluxograma da preparação dos extratos metanólicos dos fungos endofíticos de *Deguelia duckeana*.



4.4.3 Análise cromatográfica dos extratos MeOH dos fungos isolados de *Deguelia duckeana*

As análises químicas dos extratos foram realizadas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC-WhatmanTM) utilizando cromatofolhas de alumínio com sílica gel com indicador de fluorescência UV₂₅₄ e como eluente, fez-se uso de solventes orgânicos em diversas proporções, conforme a polaridade do extrato analisado. Utilizou-se como revelador físico, para visualização das classes químicas dos extratos, luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 254 nm e 365 nm e como reveladores químicos, anisaldeído sulfúrico, sulfato cérico [Ce(SO₄)₂], reagente de Dragendorff, vapor de iodo e cloreto férrico (FeCl₃).

4.4.4 Ressonância Magnética Nuclear

Os extratos provenientes de cada fungo endofítico foram submetidos a análise por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H (Bruker BioSpin AG, modelo Fourier 300 UltraShield, com frequência de 300 MHz para ¹H e 75 MHz para ¹³C com sonda EasyProbe Dual 300 MHz S1 5mm Z-gradient).

Para o processamento dos dados e análises dos espectros utilizou-se o software TopSpin 4.1.3 (Bruker). Os extratos foram solubilizados no solvente deuterado DMSO-d₆. Todos os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS).

4.5 Identificação dos fungos isolados de *Deguelia duckeana*

Os fungos selecionados foram enviados para identificação molecular na Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane em Manaus-AM e consistiu nas seguintes etapas: extração de DNA genômico, amplificação da região de interesse, purificação do produto amplificado e sequenciamento desta região.

Foi extraído DNA genômico das culturas selecionadas por meio do kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram amplificadas por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando iniciadores flanqueando alvos desde a região 3' do gene 18S rRNA até a região 5' do gene 28S rRNA, que corresponde ao espaçador interno transcrito (ITS) ITS1 – 5,8S – ITS2. Esta região foi escolhida por ser utilizada em diversos estudos para caracterização de espécies fúngicas.

O perfil de termociclagem utilizado para a região ITS consistiu em uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento dos primers a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, finalizando com uma etapa de extensão final a 72 °C por 2 minutos. Os primers utilizados foram ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3').

As amplificações da região ITS de cada cultura foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose, corado com GelRed (*Biotium*). Os fragmentos amplificados correspondentes a toda região ITS1 – 5,8S – ITS2 foram então purificados com PEG 20% para remoção de reagentes não incorporados durante o processo de amplificação e, posteriormente, foram submetidos à reação de sequenciamento nucleotídico pela técnica de *Sanger* na plataforma de genômica do ILMD. Após esta etapa, os eletroferogramas foram utilizados para construção de *contigs* e montagem final de cada sequência, com auxílio de softwares de bioinformática, sendo, por fim, revisados manualmente. As sequências obtidas foram submetidas a identificação a nível de espécie por meio de comparação destas com sequências depositadas no banco de dados *GenBank*.

4.6 Obtenção de extratos com metabólitos secundários de interesse

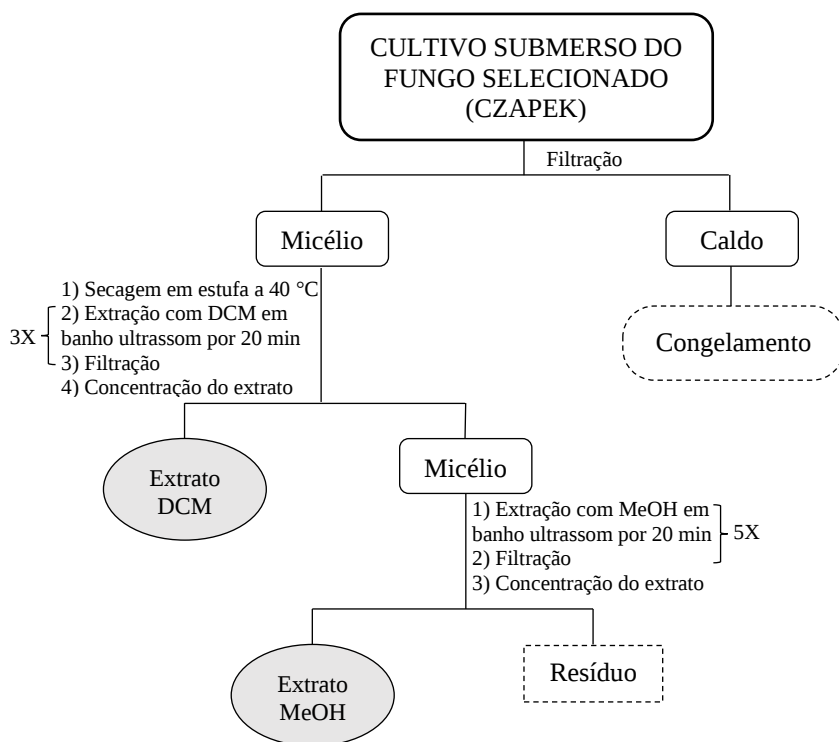
4.6.1 Cultivo em escala ampliada do fungo endofítico selecionado

Para obtenção de maior quantidade de biomassa do fungo selecionado foram preparados 6 L de meio Czapek acrescido de 0,2% de extrato de levedura. Foram utilizados 2 frascos de 5 L contendo 3 L de meio de cultura. Acondicionou-se os frascos em incubadora orbital *shaker* a 30 °C, com agitação de 120 rpm durante 20 dias. Passado o tempo de crescimento o caldo fermentado foi separado da massa micelial por meio de um sistema de filtração a vácuo (kitassato, funil de Büchner e papel filtro). O caldo fermentado foi acondicionado em pote e congelado, e o micélio foi submetido a extração.

4.6.2 Extração dos micélios do fungo endofítico selecionado

Foi realizada a extração dos micélios (56,3 g) com solventes orgânicos em ordem de polaridade crescente (diclorometano e metanol), sendo três vezes para diclorometano e cinco vezes para metanol (figura 7). Utilizou-se a proporção de 1 g de micélio para 10 mL de solvente. Os extratos dos micélios foram concentrados em rota evaporador e posteriormente secos em capela de exaustão de gases.

Figura 7. Fluxograma para obtenção dos extratos brutos do fungo endofítico selecionado.



4.6.3 Partição líquido-líquido do extrato metanólico do micélio do fungo selecionado

O extrato MeOH (16 g) foi solubilizado em uma solução hidrometanólica (1:1 v/v) obedecendo a referência de 1,0 grama de extrato para 50 mL de solução hidrometanólica.

Colocou-se o extrato solubilizado em MeOH/H₂O em um funil de separação, no qual adicionou-se AcOEt na proporção 1:1 v/v. Em seguida, agitou-se levemente o funil para promover o contato das substâncias que tinham afinidade com o solvente AcOEt. Feita a agitação, deixou-se o funil em repouso. O procedimento foi repetido 5 vezes, até a visual falta de coloração do solvente (solvente transparente e claro) (figura 8). Posteriormente as fases obtidas foram concentradas em rota evaporador a 40 °C.

Figura 8. Partição líquido-líquido do extrato metanólico do micélio do fungo selecionado.



4.6.4 Análises químicas dos extratos do micélio do fungo selecionado

Todos os extratos e fases provenientes do cultivo submerso do fungo selecionado foram submetidos às análises por CCDC e RMN de ¹H, como descritos nos itens 4.4.3 e 4.4.4 respectivamente.

4.7 Fracionamento dos extratos do micélio do fungo selecionado

4.7.1 Fracionamento cromatográfico do extrato diclorometano (DCM) do micélio

As análises realizadas em CCDC foram fundamentais para a seleção do método cromatográfico de fracionamento, incluindo a escolha da fase estacionária e dos eluentes mais eficazes para a separação dos constituintes dos extratos, visando o isolamento de substâncias. A figura 9 ilustra o fluxograma do fracionamento, a tabela 4 a reunião das frações e as massas obtidas do ext. DCM e as tabelas 3, 5 e 6 mostram os sistemas de eluição utilizados.

Figura 9. Fluxograma do fracionamento do extrato diclorometano do micélio.

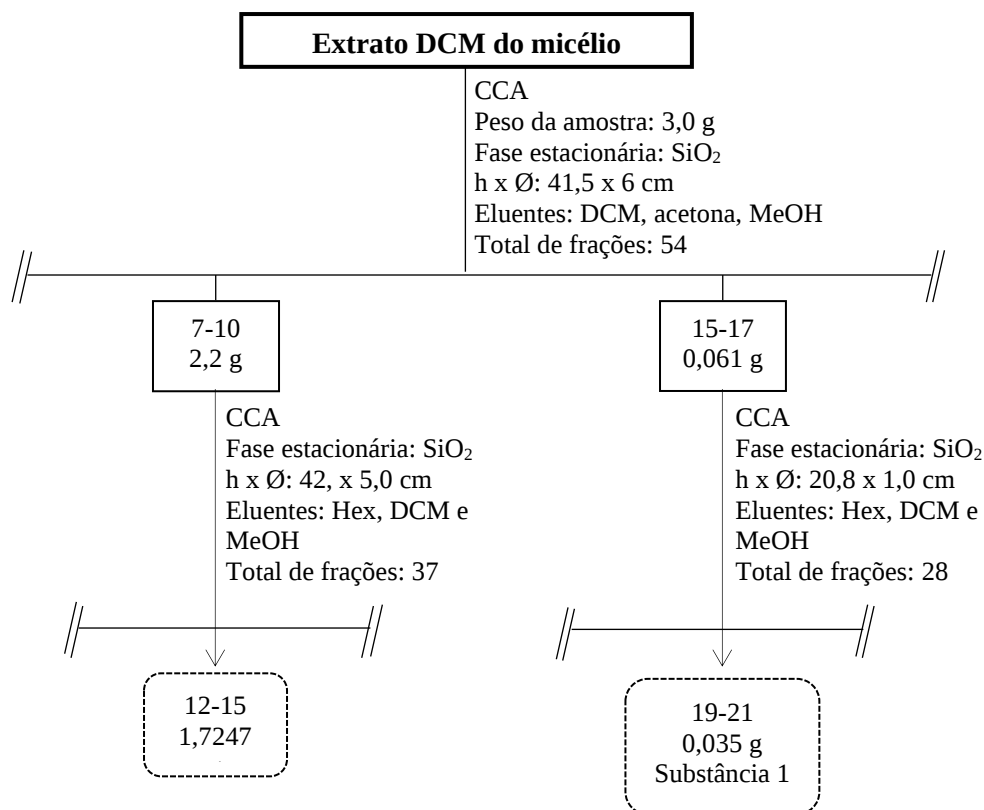


Tabela 3. Sistemas de eluição e frações obtidas do fracionamento do extrato DCM do fungo *Diaporthe oculi*.

Cromatografia em coluna aberta extrato DCM	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-7
DCM/ acetona 9:1	8-16
DCM/ acetona 8:2	17-19
DCM/ acetona 7:3	20-26
DCM/ acetona 1:1	27-31
DCM/ acetona 3:7	32-35
acetona 100%	36-41
MeOH/ acetona 1:1	42-48
MeOH 100%	49-54

Tabela 4. Reunião das frações obtidas do extrato diclorometano do fungo *D. oculi*.

Frações reunidas	Massa (mg)
1-4	5,0
5-6	19,3
7-10	2.204,0
11-15	116,3
14	156,3
15-17	61,5
18-21	33,5
22-25	62,5
26-28	34,0
29-32	4,5
33-34	22,0
35-36	43,7
37-40	14,4
41-42	30,0
43-46	62,5
47-52	129,5
53	3,3
54	4,3

Tabela 5. Sistemas de eluição e frações obtidas do refractionamento das frações 7-10 coletadas do extrato DCM do fungo *Diaporthe oculi*.

Cromatografia em coluna aberta extrato F7-10	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hex/DCM 8:2	1-5
Hex/DCM 7:3	6-7
Hex/DCM 6:4	8-9
Hex/DCM 5:5	10-13
Hex/DCM 4:6	14-20
Hex/DCM 3:7	21-26
Hex/DCM 2:8	27-31
DCM 100%	32-33
DCM/MeOH 9:1	34-35
MeOH 100%	36-37

Tabela 6. Sistemas de eluição e frações obtidas do refracionamento das frações 15-17 coletadas do extrato DCM do *fungo Diaporthe oculi*.

Cromatografia em coluna aberta extrato F15-17	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hex/DCM 5:5	1-3
Hex/DCM 4:6	4-7
Hex/DCM 3:7	8-11
Hex/DCM 2:8	12-14
Hex/DCM 1:9	15-19
DCM 100%	20-25
DCM/MeOH 9:1	26-28

4.7.1 Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio

A figura 10 ilustra o fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de *D. oculi* a tabela 7 as frações e massas obtidas e as tabelas 8, 9, 10 e 11 os sistemas de eluição.

Figura 10. Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de *D. oculi*.

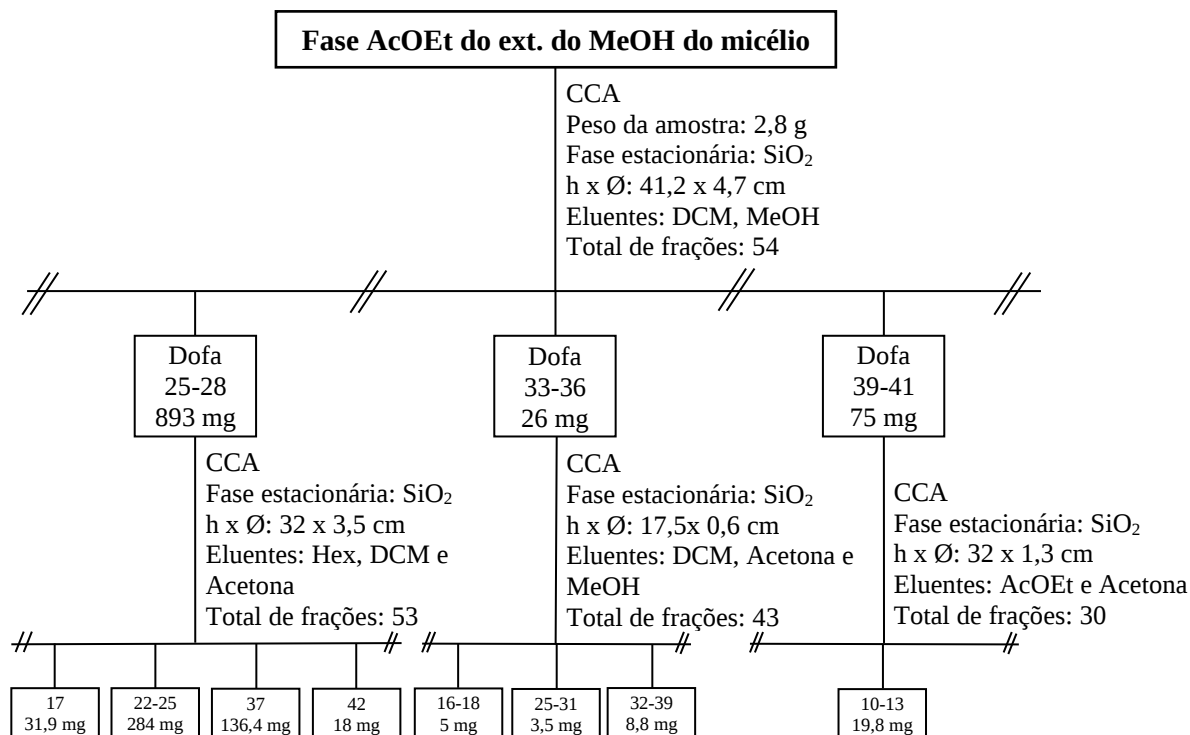


Tabela 7. Reunião das frações obtidas da fase AcOEt do extrato MeOH do fungo *D. oculi*.

Frações reunidas	Massa (mg)
1-3	4,1
4-6	9,7
7-10	13,4
11-13	7,2
14-17	42,3
18-21	10,3
22-24	297,2
25-28	893,0
29-30	14
31-32	9,1
33-36	26,2
37-38	43,5
39-41	75,8
42-47	194,4
48-50	387,6
51-54	597,9

Tabela 8. Sistemas de eluição e frações obtidas do fracionamento da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de *D. oculi*

Cromatografia em coluna aberta fase AcOEt	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-10
DCM/ MeOH 98:2	11-17
DCM/ MeOH 95:5	18-25
DCM/ MeOH 9:1	26-32
DCM/ MeOH 8:2	33-38
DCM/ MeOH 7:3	39-46
DCM/MeOH 1:1	47-51
MeOH 100%	52-54

Tabela 9. Sistemas de eluição e frações obtidas do refracionamento das frações 25-28 coletadas da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de *D. oculi*.

Cromatografia em coluna aberta extrato F25-28	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
Hex/DCM 8:2	1-5
Hex/DCM 7:3	6-10
Hex/DCM 6:4	11-14
Hex/DCM 1:1	15-16
Hex/DCM 4:6	17
Hex/DCM 3:7	18-20
Hex/DCM 2:8	21-24
Hex/DCM 1:9	25-28
DCM 100%	29-34
DCM/Acetona 95:5	35-39
DCM/Acetona 9:1	40-44
DCM/Acetona 8:2	45-47
DCM/Acetona 7:3	48-50
DCM/Acetona 1:1	51-52
Acetona 100%	53

Tabela 10. Sistemas de eluição e frações obtidas do refractionamento das frações 33-36 coletadas da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de *D. oculi*.

Cromatografia em coluna aberta extrato F33-36	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
DCM 100%	1-5
DCM/Acetona 95:5	6-9
DCM/Acetona 9:1	10-11
DCM/Acetona 8:2	12-15
DCM/Acetona 7:3	16-20
DCM/Acetona 1:1	21-29
DCM/Acetona 3:7	30-32
DCM/Acetona 2:8	33-35
Acetona 100%	36-37
Acetona/ MeOH 1:1	38-39
MeOH 100%	40-43

Tabela 11. Sistemas de eluição e frações obtidas do refractionamento das frações 39-41 coletadas da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de *D. oculi*.

Cromatografia em coluna aberta extrato F39-41	
Sistemas de eluição	Frações coletadas
AcOEt 100%	1-2
AcOEt/Acetona 95:5	3-5
AcOEt/Acetona 9:1	6-7
AcOEt/Acetona 8:2	8-10
AcOEt/Acetona 7:3	11-13
AcOEt/Acetona 1:1	14-17
AcOEt/Acetona 3:7	18-22
AcOEt/Acetona: 2:8	23-24
AcOEt/Acetona 1:9	25-27
Acetona 100%	28-30

4.8. Análise do perfil de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

O perfil de ácidos graxos de amostras lipídicas previamente extraídas foi analisado após derivatização para ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) adaptado de acordo com Vasquez *et al.* (2021).

4.8.1 Derivatização

Usou-se 10 mg da amostra de triacilglicerídeos que foram misturados com 0,25 mL de clorofórmio/metanol (2:1; v/v) e 500 mL de NaOH 0,1 M em metanol. Essa mistura foi aquecida a 60 °C por 30 minutos, em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 0,2 mL de água destilada, os FAMES formados foram extraídos com a adição de 1mL de hexano, foram agitados em vórtex por um minuto, após agitação, a fase superior isolada foi coletada.

O procedimento foi repetido com a fase inferior para recuperar os FAMES remanescentes, foram agitados e deixados em repouso após 30 minutos coletado 1 mg/mL de hexano e analisado por equipamento de Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas – CG-EM (Nexis GC2030, GCMS- QP2020 NX, Shimadzu) instalado na Central Analítica do IFAM-CMC, equipado com injetor split-splitless e um amostrador automático.

Os FAMES foram separados usando uma coluna capilar de sílica fundida SHRTx-5Sil-MS (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme). O hélio foi usado como gás de arraste a 2 mL/min. A temperatura de injeção foi de 260 °C, modo split, 1 µL, e a fonte de íons do espectrômetro de massa e as temperaturas da interface foram de 230 e 280 °C, respectivamente. A análise cromatográfica começa a 50 °C e aumenta a 20 °C/min até 210 °C, permanece por 18 min, e então sobe para 230 °C a 20 °C/min e permanece por 13 min. O tempo total de execução é de 40 min. Os espectros de massa foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV. A taxa de varredura foi de 1,6 varreduras/s em uma faixa de massa de 30–700 amu. A identificação dos esteres metílicos de ácidos graxos foi realizada pelas bibliotecas WILEY 275 e National Institute of Standards and Technology (NIST 3.0). As determinações analíticas foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos em g de ácido graxo/100 g de FAMES.

4.9 Ensaios Biológicos

4.9.1 Avaliação da atividade antibacteriana

Para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos fúngicos utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, conforme a metodologia descrita pela norma M7-10 do *Manual Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015) e adaptada com o protocolo de ensaios de antimicrobianos do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA. As cepas utilizadas neste ensaio (tabela 12) fazem parte da coleção de bactérias da Amazônia (CBAM) e foram concedidas ao LABB pelo ILMD/FioCruz Amazônia.

Tabela 12. Cepas bacterianas utilizadas na avaliação da atividade antibacteriana dos extratos fúngicos.

Nº de acesso de linhagem CBAM	Nome científico	Sigla	Coloração de Gram
0664	<i>Acinetobacter baumannii</i>	AB	-
0162	<i>Aeromonas hydrofila</i>	AH	-
0006	<i>Escherichia coli</i>	EC	-
0639	<i>Enterococcus faecium</i>	EFA	+
0051	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KP	-
0138	<i>Morganella morganii</i>	MM	-
0519	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PA	-
0026	<i>Staphylococcus aureus</i>	SA	+
0209	<i>Salmonella enterica</i>	SE	-

As cepas bacterianas foram cultivadas em meio sólido Mueller-Hinton ágar, por meio do método de estriamento. Posteriormente, com o auxílio de uma alça de platina, as colônias bacterianas foram transferidas para frasquinhos contendo H₂O destilada, até atingirem a concentração de 0,5 na escala de *McFarland*. Em seguida, 10 mg de extratos fúngicos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL.

Foi feito o controle negativo (DMSO + microrganismo), controle positivo (antibiótico + microrganismo) e um controle de esterilidade do caldo (3 poços contendo apenas o caldo). Para controle negativo foram utilizados 90 µL de caldo Mueller-Hinton

contendo 5% de DMSO e 10 µL de inóculo. Para o controle positivo foram utilizados 90 µL do antibiótico oxitetraciclina na concentração de 125 µg/mL e 10 µL de inóculo.

As bactérias, juntamente com as diferentes diluições dos extratos fúngicos, foram inoculados, em triplicata, em microplacas de 96 poços. Na sequência, foi feita a leitura inicial em espectrofotômetro tipo ELISA no comprimento de onda de 625 nm, então as microplacas foram mantidas em estufa de crescimento microbiano a 30 °C. Passadas 24 horas, foi realizada a leitura final em espectrofotômetro tipo ELISA no comprimento de onda de 625 nm.

A partir das leituras espectrofotométricas foi determinada a viabilidade microbiana para cada microrganismo, que foi calculada através da porcentagem de inibição do crescimento microbiano onde a medida da absorbância final foi diminuída pela inicial utilizando o software Excel.

4.9.2 Ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Para o ensaio foi utilizado como meio de crescimento uma solução salina (sal marinho) 3,8‰ e para a eclosão, adicionou-se 10 mg de cistos de *A. salina*. As condições de crescimento utilizadas foram: temperatura de 27 a 30 °C e iluminação em lâmpada fluorescente, por 48 horas. Após esse período, transferiram-se as larvas para microplacas de 24 poços, sendo distribuídas 10 larvas de *A. salina* para cada poço. Cada placa continha o controle da solução salina, o controle do solvente utilizado e os poços a que são adicionados os extratos em teste, todos em triplicata. As placas com as larvas de *A. salina* foram mantidas por 24 horas sob iluminação de lâmpada fluorescente.

Após esse período, contabilizou-se o número de larvas sobreviventes, tanto nos poços de controles quanto no teste. A análise foi feita na concentração de 1000 µg/mL, e não foi necessário encontrar a Concentração Letal de 50% (CL50).

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento de fungos endofíticos

Foram isolados 28 fungos endofíticos (figura 11) a partir de 20 fragmentos foliares de *Deguelia duckeana*. O procedimento utilizado nesta pesquisa para desinfestar a microbiota epifítica mostrou-se eficaz, visto que não houve crescimento microbiano na última água de lavagem. Isso evidencia que houve isolamento apenas de fungos endofíticos.

Na investigação de microrganismos endofíticos, é importante escolher um protocolo de desinfecção capaz de remover completamente a microbiota epifítica sem afetar a endofítica. Essa etapa deve ser realizada adequadamente para validar o procedimento e evitar interpretações errôneas sobre a microbiota endofítica cultivável (DOS REIS *et al.*, 2022).

Figura 11. Fungos endofíticos isolados de *Deguelia duckeana*.



A comunidade de fungos endofíticos associados às folhas de *Deguelia duckeana* é considerada alta, visto que a taxa de colonização foi de 140%. Por se tratar de uma planta tropical, tal quantitativo já é esperado. Conforme Rashmi e colaboradores (2019), as plantas tropicais podem abrigar mais espécies endofíticas do que outros ecossistemas, como os árticos e boreais, nos quais a taxa de colonização varia de menos de 1% a 44%.

A Amazônia abriga uma alta diversidade microbiana. O clima tropical com altas temperaturas e taxas elevadas de precipitação justificam essa pluralidade ecológica que abriga uma enorme quantidade de espécies (SANTOS *et al.*, 2020; YAO *et al.*, 2022). A

seguir estão descritos alguns trabalhos que apresentam a diversidade fúngica endofítica de plantas amazônicas.

Casas e colaboradores (2017) isolaram 90 fungos endofíticos de *Plectranthus amboinicus*, tendo como principais representantes os fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. e *Mycelia sterilia*. Já Ortiz-Ojeda e colaboradores (2020), reportaram o isolamento de 56 fungos endofíticos de folhas e caules da espécie vegetal *Acmella ciliata*. Quatorze dos isolados foram identificados e *Colletotrichum*, foi o gênero mais frequente, seguido por *Curvularia*, *Plectosphaerella* e *Sordariomicetos*.

Também é relatado o isolamento de 104 fungos endofíticos de folhas e caule da espécie vegetal *Passovia stelis*, dos quais 73 foram identificados como pertencentes aos gêneros *Guignardia*, *Phomopsis*, *Xylaria* e *Colletotrichum*, com destaque para o gênero *Guignardia*, o qual apresentou a maior frequência dentre os isolados (SILVA *et al.* 2020). Além disso, da espécie *Oenocarpus bataua* Mart, foram isolados 63 fungos endofíticos, sendo 50 da folha e 13 do caule, com 38 fungos identificados, sendo *Xylaria*, o gênero mais frequente, seguido por *Phomopsis*, *Phoma*, *Geotrichum*, *Penicillium* e *Nigrospora* (DINIZ *et al.*, 2021a).

A diversidade fúngica endofítica da espécie vegetal *Astrocaryum ulei* Burret da mesma forma foi investigada, pois foram isolados 88 fungos, dos quais 71 foram identificados. *Xylaria* foi o gênero mais frequente, com 48,8%, seguido por *Penicillium*, *Phomopsis*, *Fusarium* e *Aspergillus* (DINIZ *et al.*, 2021b).

Da hospedeira *Euterpe oleracea* Mart, Sena e colaboradores (2022) isolaram 32 fungos, identificados em diversos gêneros, incluindo *Pestalotiopsis*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Chaetomium*, *Mucor*, *Botryodiplodia*, *Xylaria*, *Curvularia* e *Neocosmospora*.

Quanto ao isolamento dos fungos endofíticos de *Senna reticulata*, foram isolados 309 fungos endofíticos. Foram identificadas 27 morfoespécies distribuídas em dez gêneros, *Phomopsis*, foi o mais abundante, em seguida, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Trichoderma*, *Cladosporium* e *Xylaria* (INÁCIO *et al.*, 2021).

É também relatado na literatura fungos endofíticos associados às folhas de três clones de *Hevea* spp. (localizados na Embrapa Amazônia Ocidental). Um total de 269 isolados foram obtidos, e a análise filogenética mostrou que o filo Ascomycota foi o mais

abundante (95,4%), com predominância dos gêneros *Colletotrichum* e *Diaporthe*, seguido pelo filo Basidiomycota (4,6%), com abundância dos gêneros *Trametes* e *Phanerochaete* (AMARAL *et al.*, 2022).

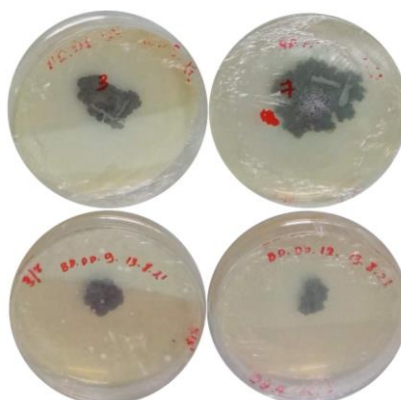
Para organizar os isolados (codificados de BDDD01 a BDDD28), realizou-se uma distribuição em grupos, levando em consideração as semelhanças macroscópicas, como a cor das colônias, bordas e a observação frente e verso das placas. Com isso, os fungos foram divididos em 7 grupos, observados no quadro abaixo.

Quadro 1. Classificação em grupos por características morfológicas dos fungos endofíticos isolados de *Deguelia duckeana*.

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
BDDD 4 BDDD16 BDDD20 BDDD28	BDDD 05 BDDD 06 BDDD10	BDDD14 BDDD17 BDDD18 BDDD19	BDDD 21 BDDD24 BDDD 25 BDDD 26 BDDD27	BDDD 11 BDDD 15 BDDD 22 BDDD 23	BDDD 01 BDDD 02 BDDD 03 BDDD 07 BDDD 08 BDDD 09 BDDD 12	BDDD 13

Percebe-se que os isolados do grupo 6 (figura 12) possuem o maior número de fungos e, em contraste aos outros grupos, eles apresentaram crescimento lento quando observada suas características macro morfológicas. Os fungos frequentemente apresentam exigências nutricionais diversas e específicas que podem limitar a extensão e a robustez de seu crescimento na ausência de um nutriente específico. Diante disso, o tipo de meio de cultivo e a temperatura são fatores importantes para o crescimento fúngico, uma vez que influenciam a abundância e riqueza de espécies isoladas (GUOCHANG *et al.*, 2012; SMITHEE *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2021).

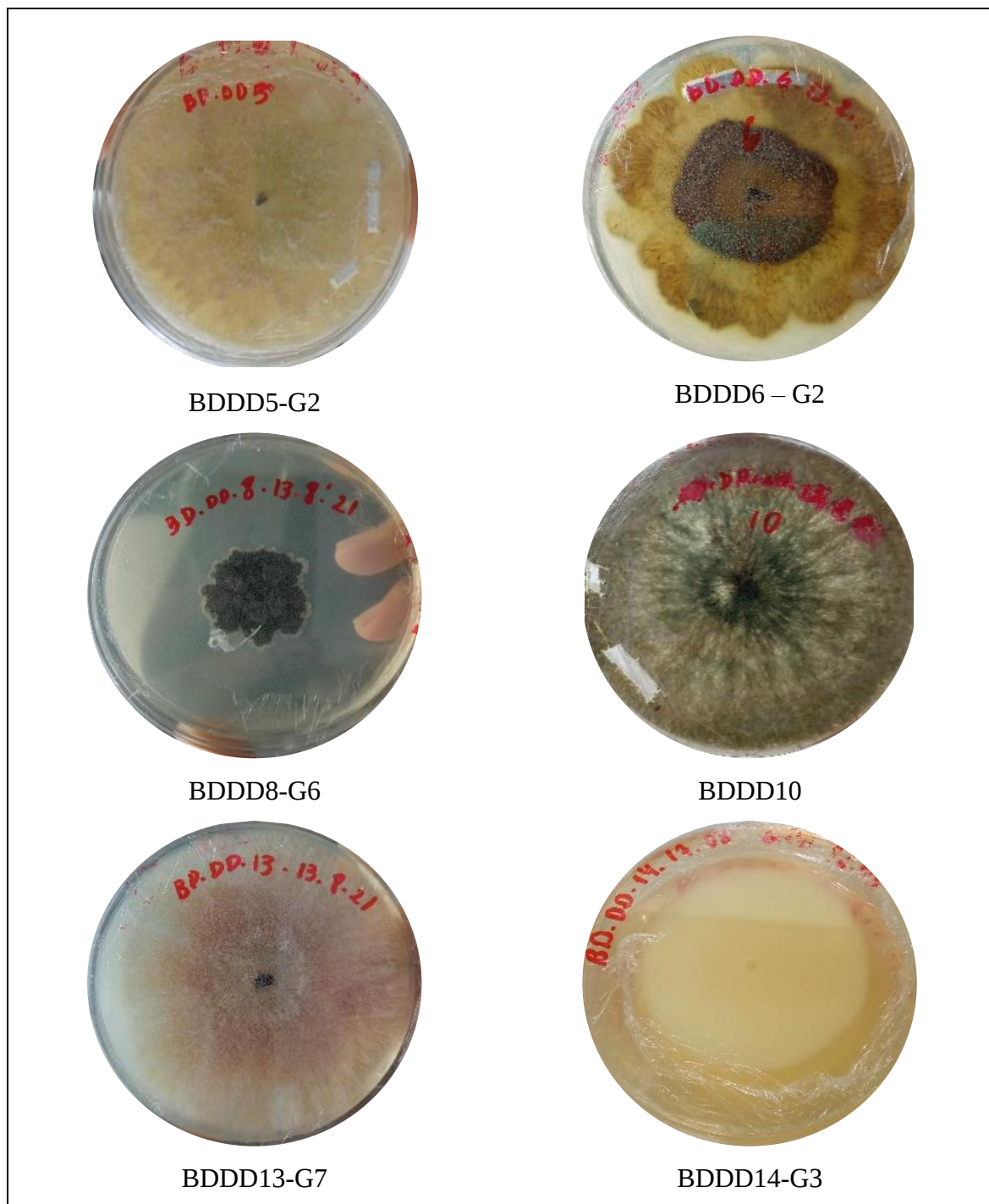
Figura 12. Exemplificação das características macroscópicas dos fungos endofíticos do grupo 6.



5.2 Avaliação prévia para a produção de metabólitos

Alguns indivíduos de cada grupo foram selecionados, de acordo com as características macroscópicas, para cultivo em meio líquido, a fim de obter os respectivos extratos brutos para análises químicas e biológicas. No total, 14 fungos foram cultivados e a figura 13 apresenta os fungos selecionados.

Figura 13. Características macroscópicas dos fungos endofíticos isolados de *Deguelia duckeana*.

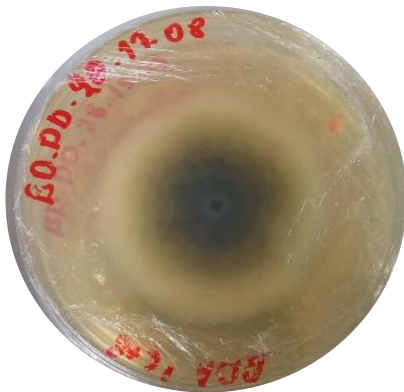




BDDD16-G1



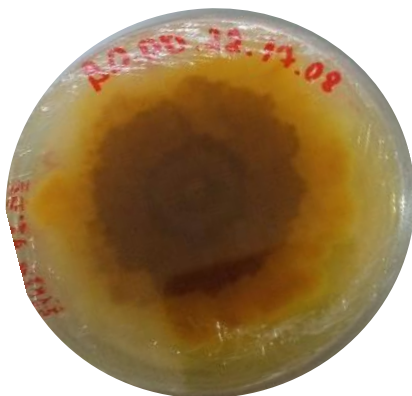
BDDD17-G3



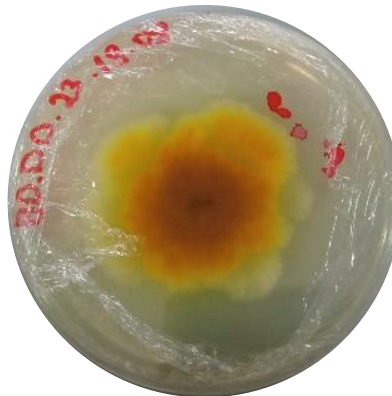
BDDD20-G1



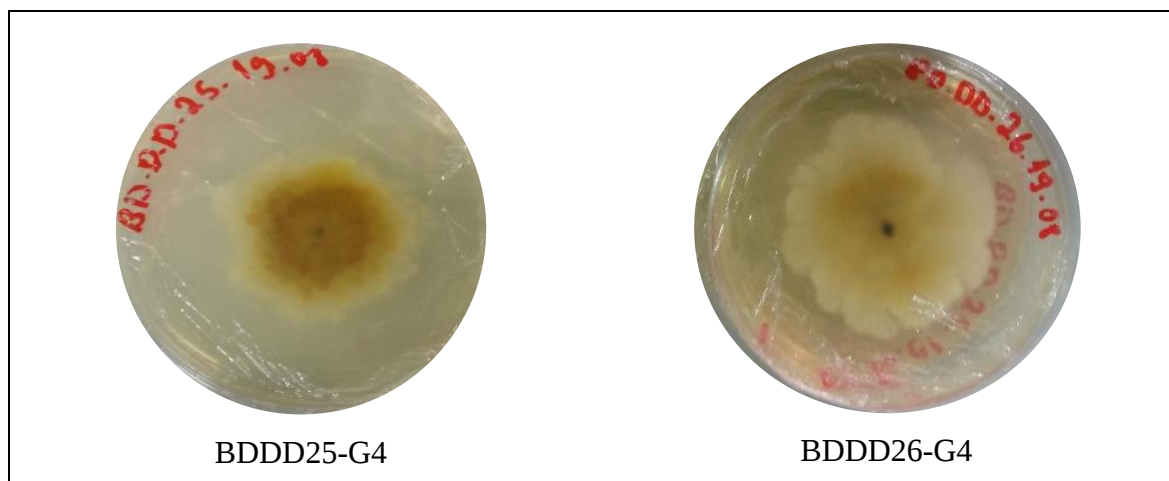
BDDD21-G4



BDDD22-G5



BDDD23-G5



Os 14 fungos cultivados em meio líquido agitado tiveram apenas seus micélios submetidos a extração com metanol. Com isso, as massas dos extratos metanólicos variaram entre 0,556 g e 1,43 g e seus rendimentos variaram de 13,22 a 27,43%, como observadas na tabela 13.

Tabela 13. Fungos selecionados para triagem, quantidade de massas obtidas e rendimentos dos extratos metanólicos.

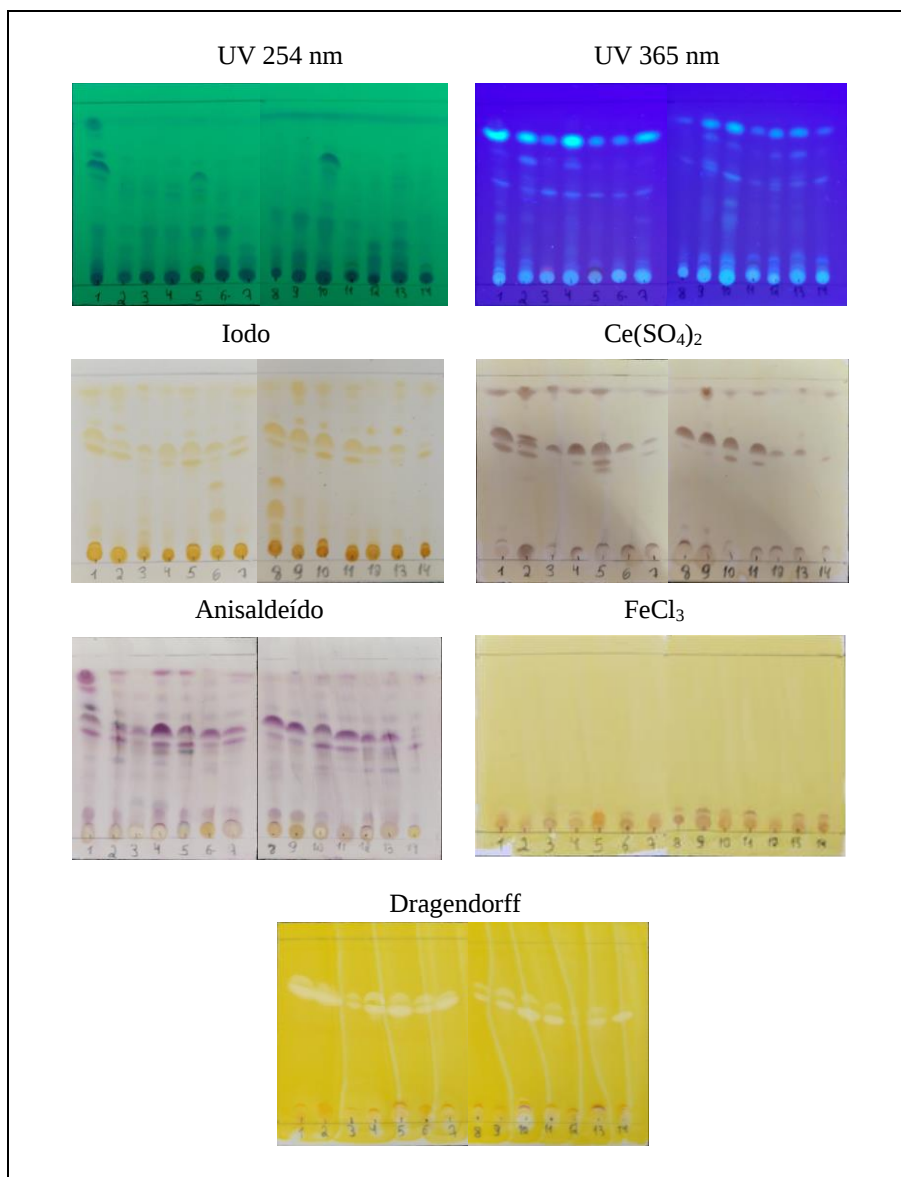
Nº	Fungo	Massa micélio (g)	Massa do extrato MeOH (g)	$M_{\text{ext}}/M_{\text{mic}} \times 100$ (%)
(1)	BDDD05-G2	4,69	1,014	21,62
(2)	BDDD06-G2	4,87	0,7717	15,8
(3)	BDDD08-G6	6,69	0,8847	13,22
(4)	BDDD10-G2	3,0	0,7157	23,85
(5)	BDDD13-G7	3,83	0,7516	19,62
(6)	BDDD14-G3	2,19	0,556	25,4
(7)	BDDD16-G1	3,08	0,6141	19,93
(8)	BDDD17-G3	5,90	0,9224	15,63
(9)	BDDD20-G1	3,87	1,04	26,9
(10)	BDDD21-G4	4,61	0,6977	15,13
(11)	BDDD22-G5	4,91	1,043	21,24
(12)	BDDD23-G5	3,49	0,8753	27,43
(13)	BDDD25-G4	3,08	0,7426	24,1
(14)	BDDD26-G4	5,30	0,9413	17,76

M_{ext} : massa do extrato; M_{mic} : massa do micélio

5.3 Análise cromatográfica dos extratos MeOH dos micélios dos fungos isolados de *Deguelia duckeana*

Os extratos resultantes da extração dos micélios com MeOH foram eluidos em sistema DCM/MeOH 9:1. A figura 14 apresenta os resultados obtidos, onde todos os extratos apresentaram fluorescência quando expostos à luz UV nos dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), além de manchas amarronzadas serem observadas na presença de vapores de iodo. Esses resultados indicam a presença de substâncias contendo ligações duplas isoladas e/ou conjugadas.

Figura 14. Placas de CCDC dos extratos metanólicos dos micélios de 14 fungos endofíticos de *Deguelia duckeana*.



As análises das placas de CCDC utilizando os reveladores anisaldeído sulfúrico e $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ apontaram indícios da presença de terpenoides e esteroides, pela coloração roxo/lilás. Já a revelação com FeCl_3 resultou em uma coloração com bandas escuras, inferindo a presença de substâncias fenólicas. Quando as placas de CCDC foram reveladas com o reagente de Dragendorff, com exceção do extrato 3, observou-se uma coloração laranja, inferindo a presença de substâncias nitrogenadas.

5.4. Análise por RMN de ^1H dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos isolados de *Deguelia duckeana*.

De modo geral, os espectros de RMN de ^1H (figuras 15 e 16) dos extratos metanólicos do micélio dos fungos apresentaram sinais característicos de hidrogênios metílicos e metilênicos (δ_{H} 0,5-2,4 ppm), hidrogênios de carbonos carbinólicos (δ_{H} 3,0-4,0 ppm), hidrogênios de duplas isoladas (δ_{H} 4,8-6,5 ppm) e hidrogênios duplas conjugadas (δ_{H} 6,5-8,2 ppm).

Figura 15. Comparação de espectros de RMN de ^1H (300 MHz) dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos endofíticos de *Deguelia duckeana* ($\text{DMSO}-d_6$).

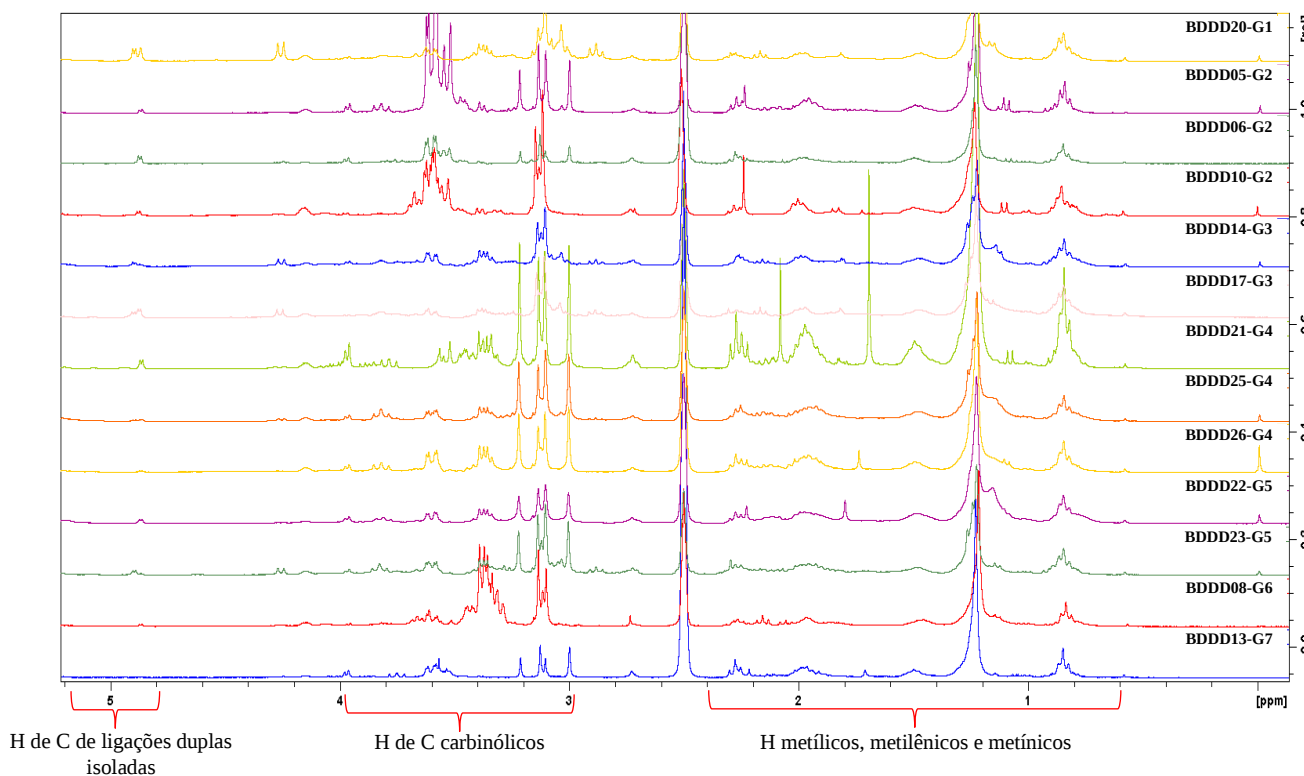
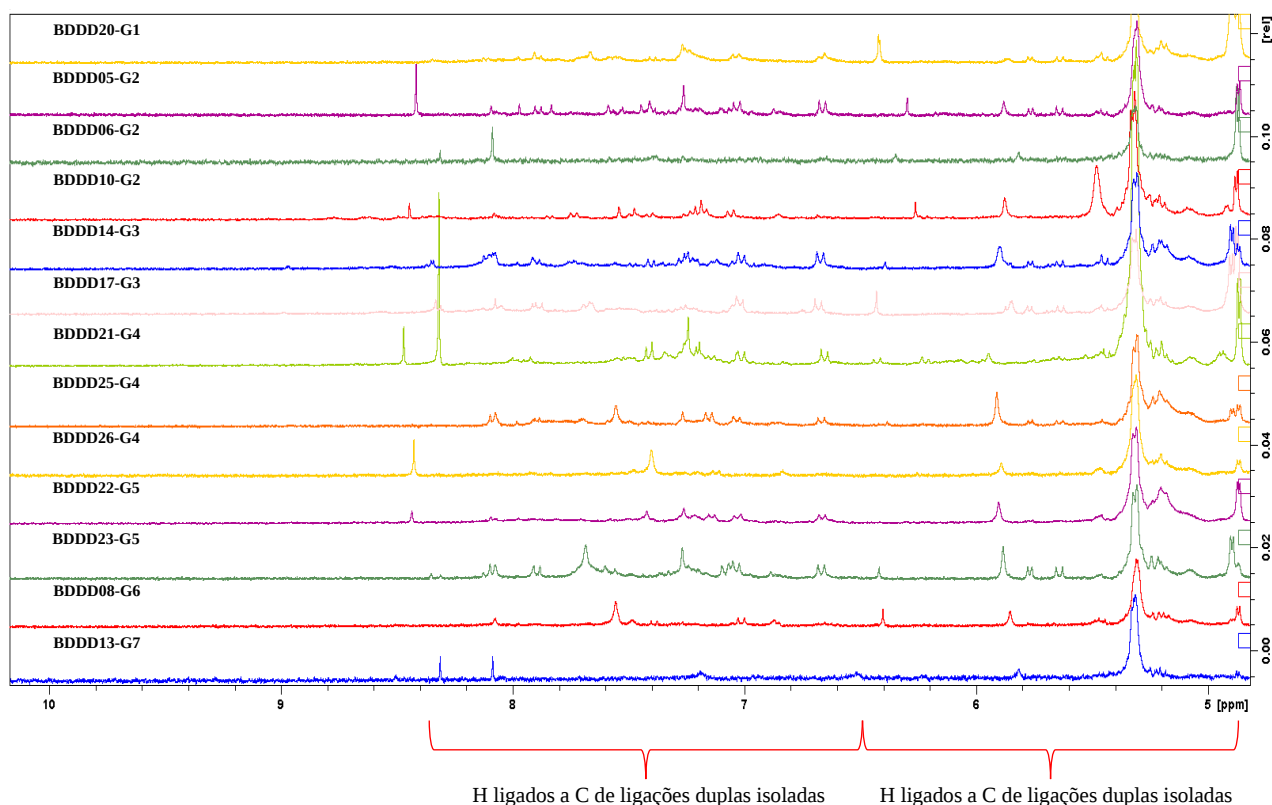


Figura 16. Continuação da comparação de espectros de RMN de ^1H (300 MHz) dos extratos metanólicos dos micélios dos fungos endofíticos de *Deguelia duckeana* (DMSO- d_6).



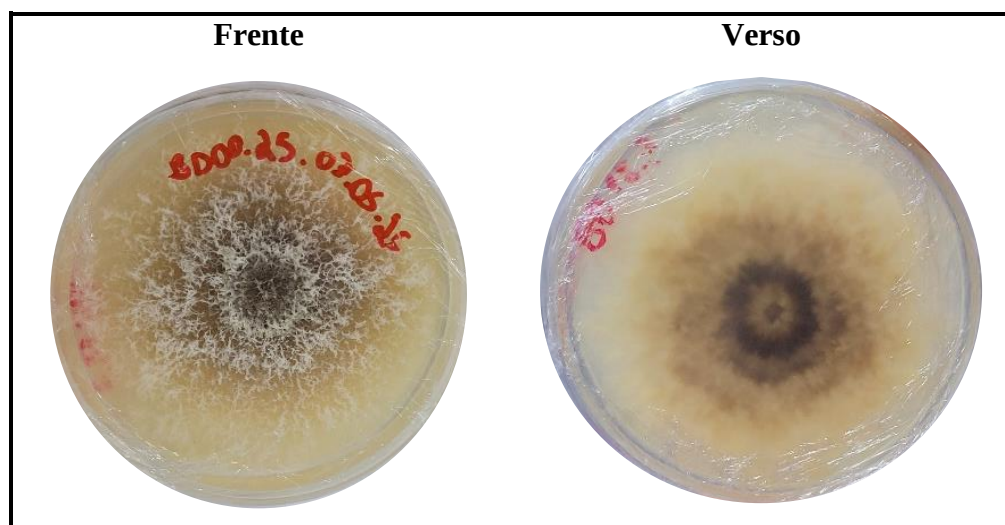
As análises dos extratos brutos por RMN ^1H confirmaram a presença das classes de substâncias reveladas por CCDC. Diante dessas análises, os fungos codificados como BDDD14-G3, BDDD23-G5 e BDDD25-G4 apresentaram maior quantidade de sinais, principalmente na região dos aromáticos e por isso foram selecionados para serem identificados e submetidos a avaliação da atividade antibacteriana.

5.5 Identificação fúngica

Para a identificação molecular dos fungos BDDD14-G3, BDDD23-G5 e BDDD25-G4 as sequências de DNA's obtidas foram analisadas na plataforma do *GenBank* por colaboradores da Fiocruz. Os resultados revelaram que os fungos codificados como BDDD23-G5 e BDDD25-G4 foram identificados a nível de gênero como *Diaporthe* sp1. e sp2. e o fungo BDDD14-G3 como *Colletotrichum* sp.

A nível de espécie, o único fungo identificado foi o BDDD25-G4. Este fungo possui uma homologia de 99% de identidade como *Diaporthe oculi* (figura 17) que foi autenticado pela análise molecular da região ITS do rDNA contendo ITS1 e ITS2, e do gene 5.8S rRNA interveniente, sob número de acesso NR 161018.1.

Figura 17. Características macroscópicas do fungo endofítico *Diaporthe oculi*, isolado de *D. duckeana*.



A espécie fúngica *Diaporthe oculi* foi relatada pela primeira vez em 2018, no Japão, como um patógeno humano isolado de um olho infectado (OZAWA *et al.*, 2019). Embora quatro estudos tenham citado essa espécie na literatura, nenhum deles a relacionou como um fungo endofítico ou realizou investigações químicas até o momento (ARCIUOLO *et al.*, 2020; BORMAN; JOHNSON, 2021; NORPHANPHOUN *et al.*, 2022; OZAWA *et al.*, 2019). Portanto, o presente trabalho é o primeiro a desenvolver o estudo com essa espécie fúngica como endofítico e a realizar sua caracterização química.

5.6 Avaliação da atividade antibacteriana dos fungos selecionados

Na avaliação antibacteriana dos extratos metanólicos provenientes dos micélios dos fungos selecionados adotou-se como critério a utilização de bactérias consideradas prioritárias pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2017). Das 12 bactérias classificadas como prioritárias, apenas 3 delas (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) estavam disponíveis na coleção de cepas do LABB-INPA. Essas bactérias não foram sensíveis aos extratos metanólicos fúngicos avaliados na concentração de 500 µg/mL.

No entanto, na concentração de 1000 µg/mL, conforme evidenciado na tabela 14, o extrato metanólico fúngico BDDD25-G4 foi capaz de inibir o crescimento das três cepas bacterianas, sendo mais evidente a inibição frente à *Staphylococcus aureus*. Os extratos fúngicos de BDDD14-G3 e BDDD23-G5 apresentaram atividade de inibição apenas

em relação a uma das bactérias, a saber, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Tabela 14. Resultado da CIM, em µg/mL, dos extratos testados frente a 3 bactérias patogênicas humanas utilizando a técnica de microdiluição em caldo.

Amostras	AB	SA	PA
BDDD14-G3 <i>Colletotrichum</i> sp.	NA	NA	1000 µg/mL (24,41) ±0,010
BDDD23-G5 <i>Diaporthe</i> sp.	NA	1000 µg/mL (13,28) ±0,020	NA
BDDD25-G4 <i>Diaporthe oculi</i>	1000 µg/mL (11,65) ±0,010	1000 µg/mL (55,34) ±0,003	1000 µg/mL (44,93) ±0,007
Oxitetraciclina	99,72 ±0,001	99,83 ±0,003	99,76 ±0,004

NA: Não houve inibição. () Dados de inibição. ± Desvio Padrão. **AB** (*Acinetobacter baumannii*), **SA** (*Staphylococcus aureus*), **PA** (*Pseudomonas aeruginosa*).

Para o gênero *Diaporthe*, distintas pesquisas constataram atividade antibacteriana conferidas a diversas espécies frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Por exemplo, extratos brutos metanólicos de *Diaporthe* sp. MFLUCC16-0682 e *Diaporthe* sp. MFLUCC16-0693, isolados de flores de *Melodorum fruticosum*, apresentaram CIMs na faixa de 7,81–250 µg/mL. Ambas as cepas inibiram *S. flexneri*, *V. cholerae* e *P. aeruginosa* significativamente em comparação com outros extratos brutos fúngicos da planta hospedeira. (TANAPICHATSAKUL *et al.*, 2018).

Uma cepa de *Diaporthe helianthi*, isolada de *Luehea divaricata*, apresentou atividade antibacteriana estatisticamente significativa frente à *S. aureus* (SPECIAN *et al.*, 2012). Já a substância éter flavomannina-6,6'-di-O-metil, isolada do fungo endofítico *Diaporthe melonis*, também inibiu o crescimento de *S. aureus* com uma CIM de 32 µg/mL (OLA *et al.*, 2014).

LI e colaboradores (2015) isolaram 7 substâncias de *Diaporthe* LG23, fungo endofítico de *Mahonia fortunei*, dentre as quais a substância 19-nor-lanosta-5(10),6,8,24-tetraeno-1α,3β,12β,22S-tetraol, apresentou atividade antibacteriana significativas frente a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* com valores de CIM de 2,0 µg/mL e 5,0 µg/mL, respectivamente.

Em extratos brutos de *D. schini* é relatado a atividade antibacteriana frente a *S. aureus* com CIM de 125 µg/mL. As principais substâncias identificadas destes extratos por CG-EM foram: 13-docosenamida (Z)-, 2-hexadeceno, 3,7,11,15-tetrametil; 9-octadecenamida e ácido 11-octadecenoico, os quais já foram previamente descritos na literatura por sua atividade biológica (DOS REIS *et al.*, 2019).

É importante ressaltar que na literatura também já foi constatada atividade antibacteriana no extrato da planta hospedeira frente a *Staphylococcus aureus* (LIMA *et al.*, 2013). Diante disso, pode-se considerar a possibilidade da planta hospedeira e seus fungos endofíticos sintetizarem as mesmas substâncias detentoras de atividade antibiótica.

5.7 Rendimento dos extratos dos micélios do fungo *Diaporthe oculi*

A massa de cada extrato obtido a partir do cultivo em escala ampliada do fungo *Diaporthe oculi* pode ser visualizada na tabela 15.

Tabela 15. Massas dos extratos obtidos do fungo *D. oculi* a partir da extração com solventes orgânicos.

Massa micelial (g)	Extrato	Massa (g)	M _{ext} /M _{mic} X 100 (%)
53,3	DCM	3,17	5,94
	MeOH	16,41	30,8
	Fase AcOEt	3,02	5,7

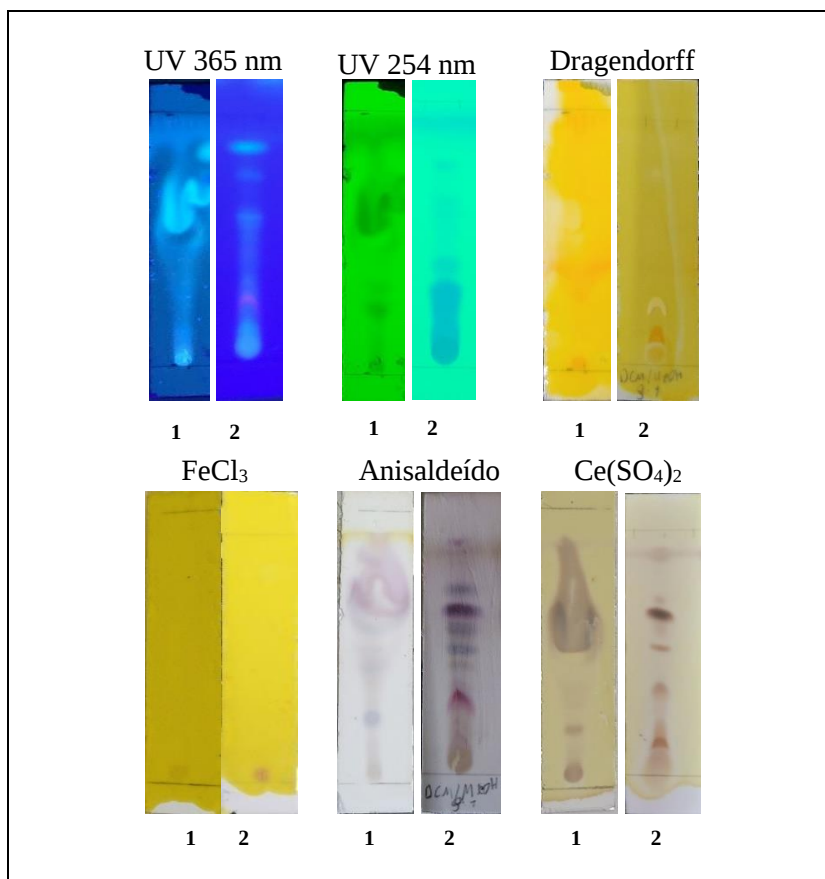
5.8 Prospecção química dos extratos miceliais do fungo *Diaporthe oculi*

5.8.1 Análise cromatográfica do extrato DCM e da fase AcOEt

A análise por CCDC do extrato DCM e da fase AcOEt dos micélios do fungo *D. oculi* (figura 18), apresentaram fluorescência na luz UV nos dois comprimentos de onda (254 e 365 nm), indicando a presença de moléculas com duplas ligações conjugadas, podendo ser de moléculas com cadeia aberta ou aromáticas. Quando as placas de CCDC do extrato DCM e da fase AcOEt foram reveladas com o Reagente Dragendorff, observou-se uma coloração laranja, inferindo a presença de substâncias nitrogenadas.

Na revelação com anisaldeído sulfúrico e Ce(SO₄)₂ as placas de CCDC apresentaram indícios de terpenoides e esteroides pois observou-se a formação de bandas com coloração roxo/lilás. Para FeCl₃, tanto no extrato bruto quanto na fase AcOEt, foi possível observar uma leve coloração amarronzada, indicando concentrações muito baixas de substâncias fenólicas.

Figura 18. Placas de CCDC dos extratos brutos dos micélios do fungo *D. oculi*: (1) ext DCM, (2) fase AcOEt. Sistema de eluç: ext. DCM - DCM/acetona (9:1), fase AcOEt – DCM/MeOH (9:1).



5.8.2 RMN de ^1H dos extratos e fase do micélio do fungo *D. oculi*

Ao analisar o espectro de RMN de ^1H do extrato DCM (figura 19), foi possível observar sinais característicos de hidrogênios metílicos na faixa de 0,6 a 1,2 ppm, além de um sinal intenso em 1,25 ppm, correspondente aos hidrogênios de CH_2 presentes em substâncias alifáticas de cadeia linear longa ("graxa"). Também foi possível observar um sinal do tipo "duplo duplete" entre 4,1 e 4,3 ppm, típicos de triacilgliceróis, e sinais de hidrogênios ligados a carbonos de duplas ligações isoladas na faixa de 5,2 a 5,3 ppm.

Nos espectros de RMN de ^1H do extrato metanólico e da fase AcOEt proveniente dele (figuras 20 e 21), foram observados diversos sinais de substâncias alifáticas e aromáticas. Entre os sinais observados, destacam-se os característicos de hidrogênios metílicos e metilênicos, hidrogênios de carbonos carbinólicos e hidrogênios ligados a carbonos de duplas ligações isoladas e conjugadas.

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H do extrato DCM dos micélios do fungo *D. oculi* em CDCl_3 (300 MHz).

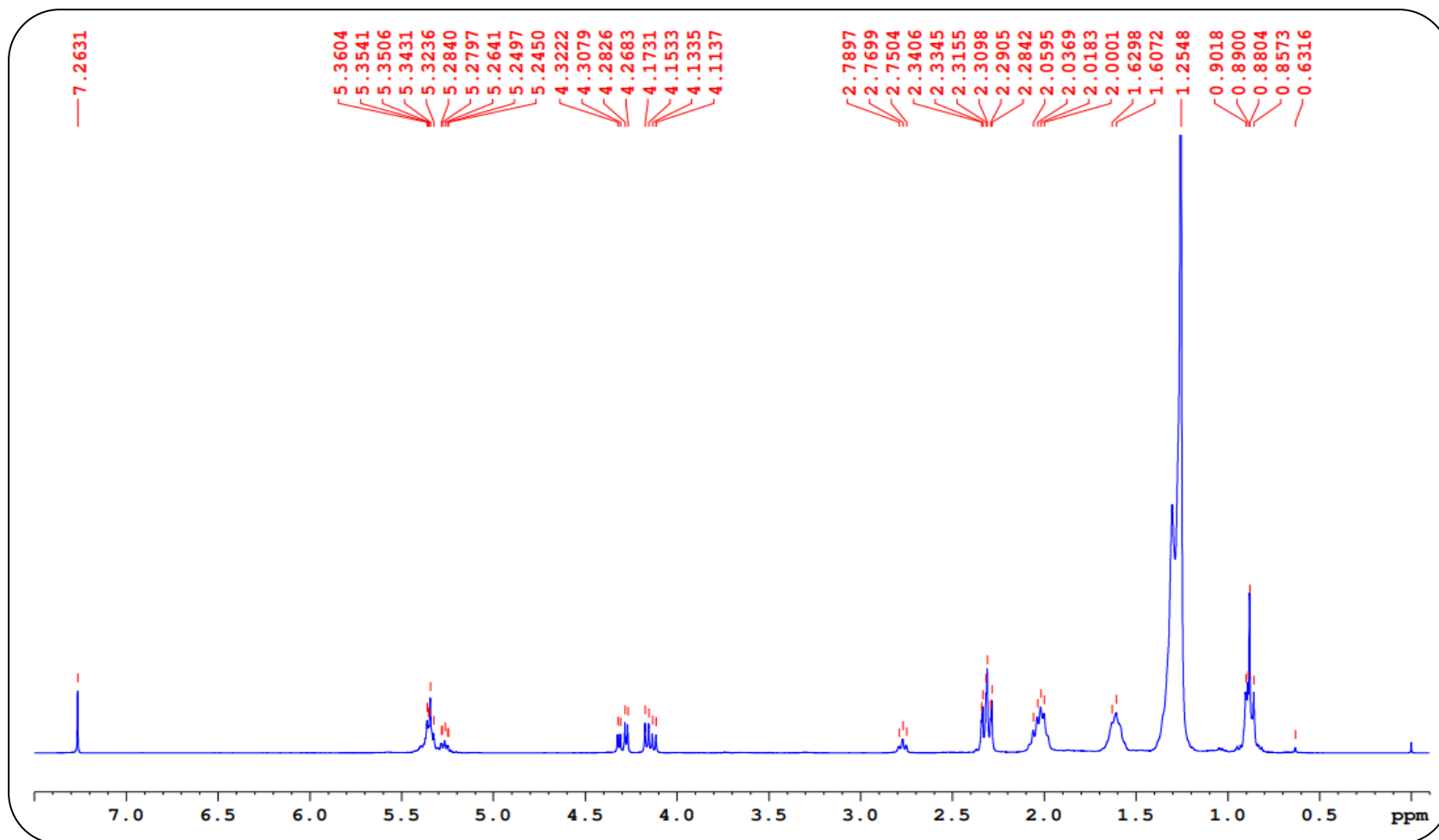


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H do extrato metanólico em $\text{DMSO}-d_6$ dos micélios do fungo *D. oculi* (300 MHz).

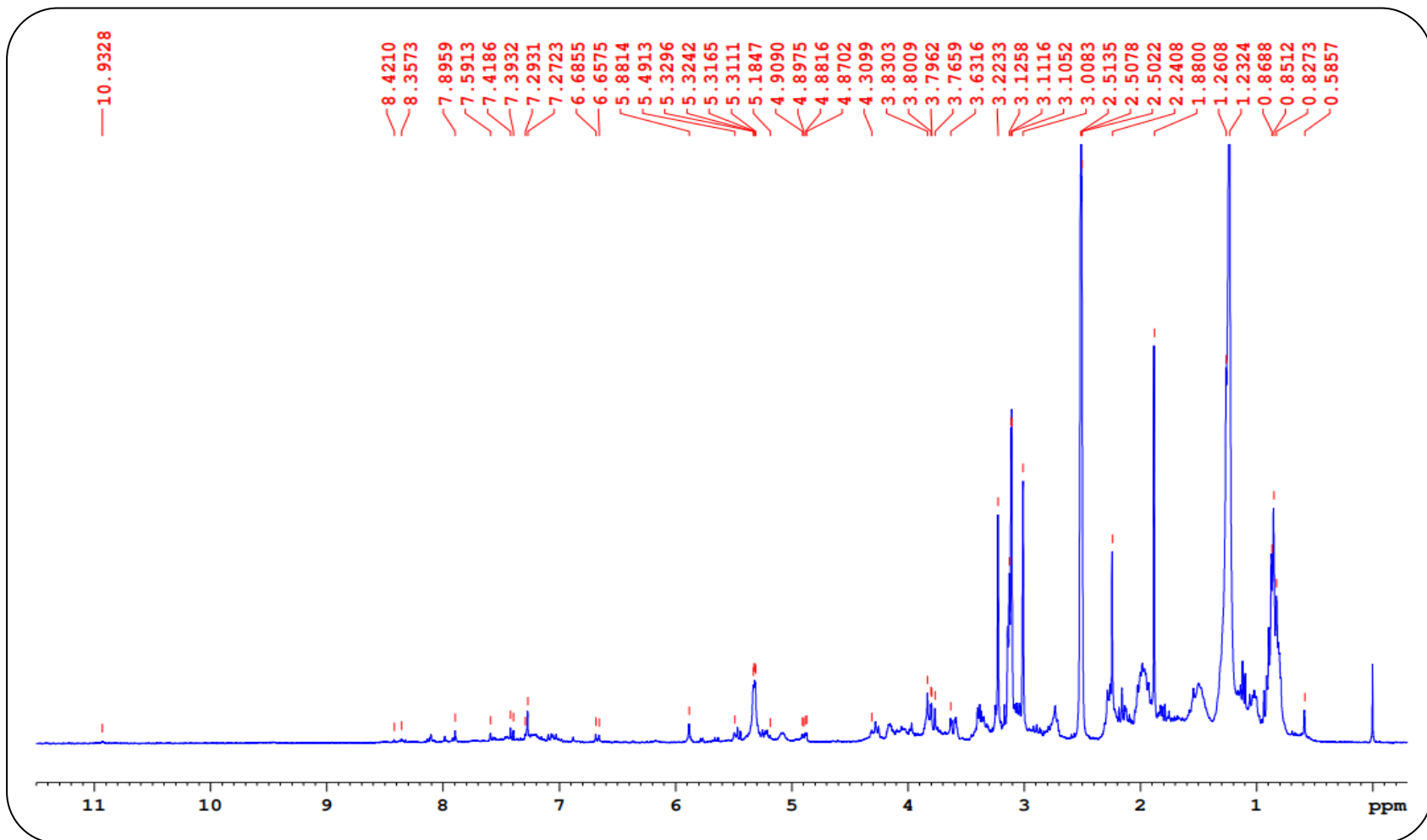
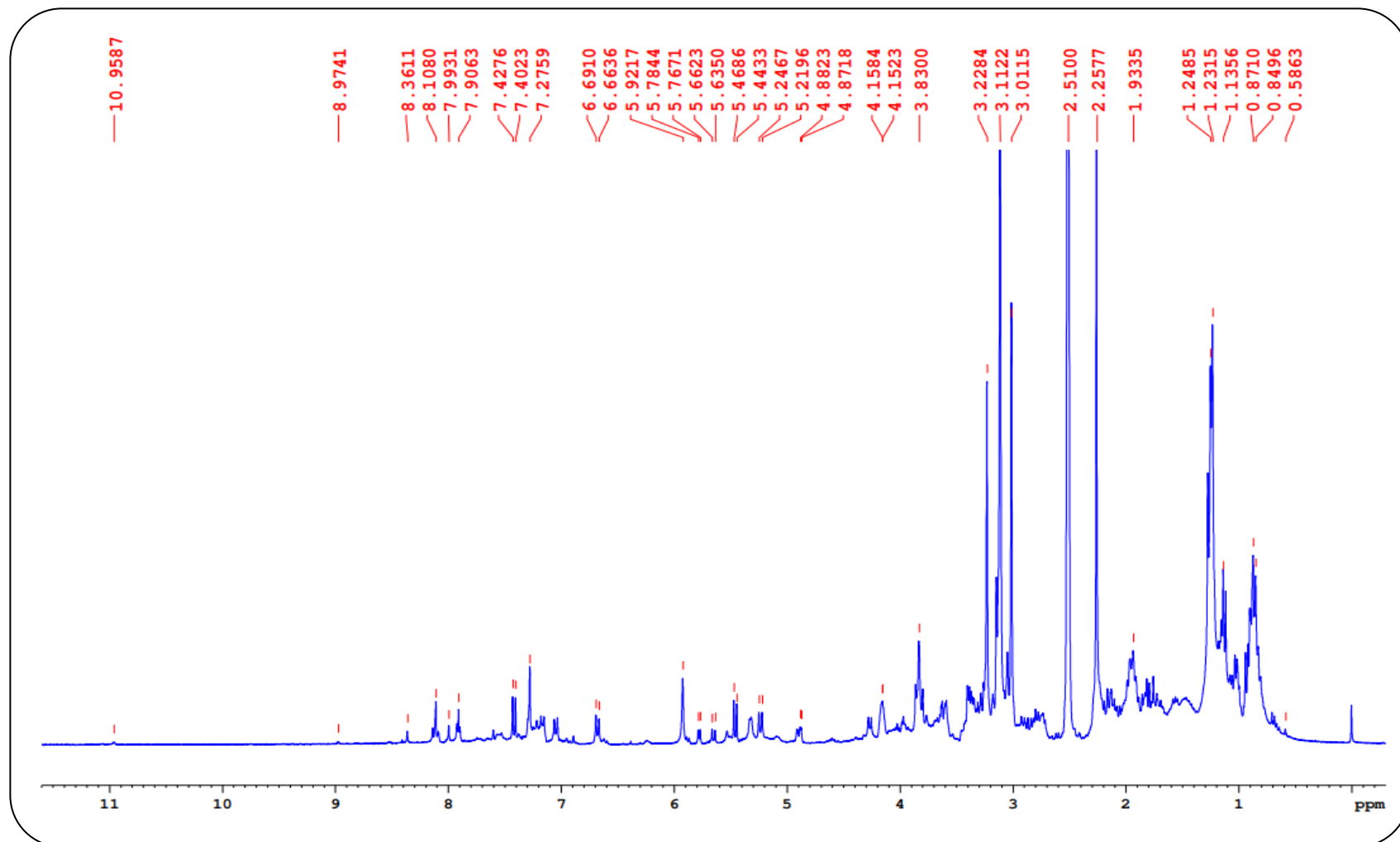
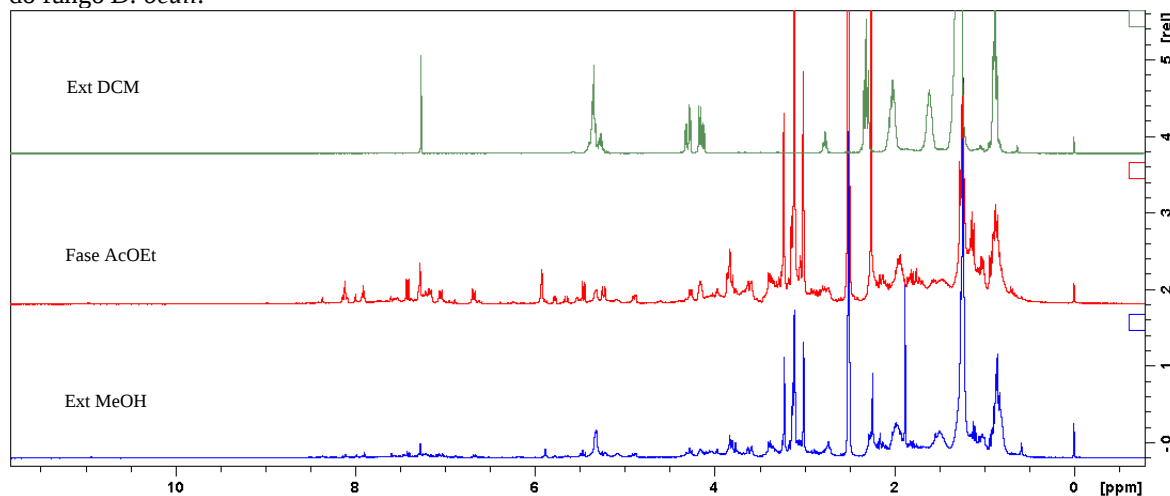


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H do Fase AcOEt em $\text{DMSO-}d_6$ dos micélios do fungo *D. oculi* (300 MHz).



Ao comparar os espectros de ^1H dos extratos e fase do micélio do fungo *D. oculi* (figura 22), percebe-se pouca semelhança de sinais entre o extrato diclorometânico e o extrato metanólico. Os deslocamentos químicos similares podem ser observados na faixa dos hidrogênios metílicos, principalmente o simpleto em 1,25 ppm, e na faixa de ligações duplas isoladas (δ_{H} 5,3 ppm). Nota-se também que o extrato MeOH e sua fase AcOEt demonstraram uma maior quantidade de sinais na região de H aromáticos.

Figura 22. Comparação dos espectros de RMN de ^1H dos extratos DCM, MeOH e a fase AcOEt dos micélios do fungo *D. oculi*.



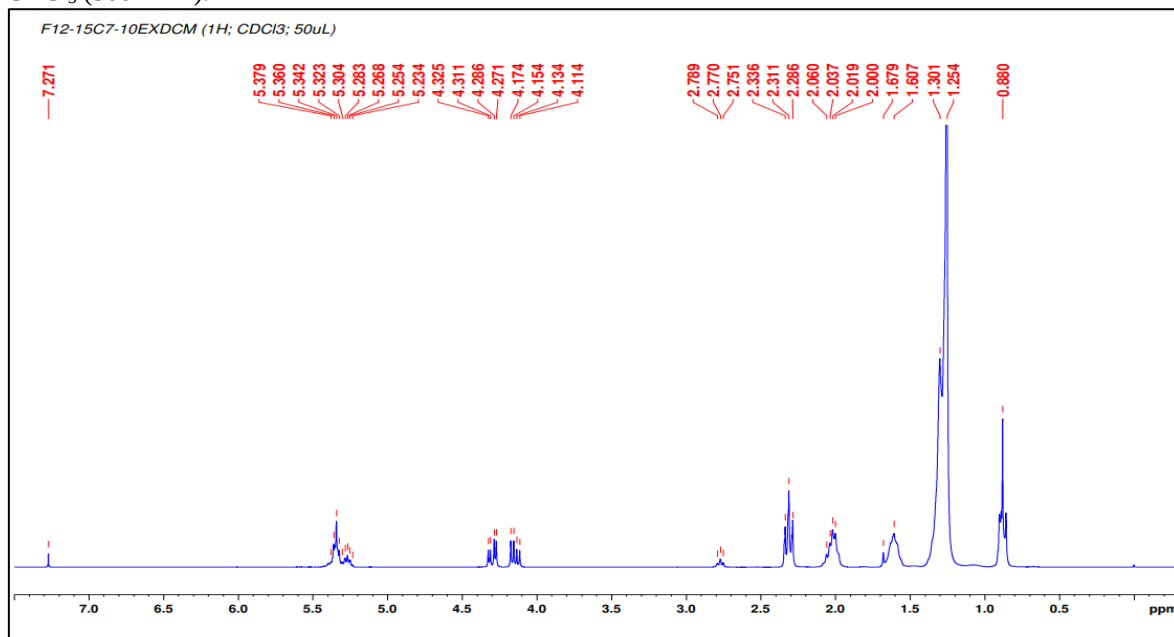
5.9 Determinação estrutural das substâncias isoladas do extrato diclorometano do micélio de *D. oculi*

5.9.1 Identificação dos constituintes químicos da fração F1215C710

A fração F1215C710 teve rendimento de 1,247 g e apresentou-se como um líquido viscoso em temperatura ambiente. Ao fazer a análise do espectro de RMN de ^1H (figura 23), verificou-se que se tratava de uma mistura de triacilgliceróis, evidenciada pelo sinal do tipo duplo duplete entre δ_{H} 4,11-4,32 ppm, característico de hidrogênios ligados aos carbonos do glicerol. Além disso, foram observados sinais em δ_{H} 0,88 ppm, característicos dos hidrogênios das metilas dos ácidos graxos.

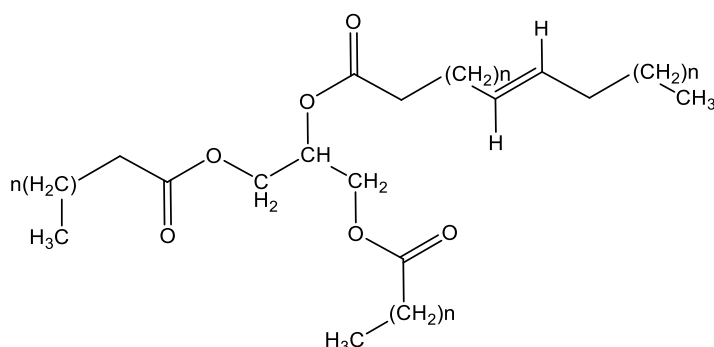
O sinal intenso em δ_{H} 1,25-1,30 ppm foi atribuído aos hidrogênios de grupos metilênicos de cadeias alifáticas. Já os sinais entre δ_{H} 2,0-2,05 ppm foram atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos β da dupla ligação entre carbonos. Da mesma forma, os sinais entre δ_{H} 2,20-2,34 ppm foram atribuídos aos hidrogênios de carbonos β do éster, e os sinais entre δ_{H} 5,23-5,37 ppm correspondem aos hidrogênios de carbonos de ligações duplas.

Figura 23. Espectro de RMN de ^1H da fração 12-15 obtida do ext. DCM do micélio do fungo *D. oculi* em CDCl_3 (300 MHz).



Kaushik e colaboradores (2020) relataram o isolamento de uma mistura de triacilgliceróis proveniente do extrato hexano do fungo endofítico *Trichoderma* sp. EFI671. Os valores do deslocamento químico da mistura mostraram sinais de RMN de ^1H em δ 0,88 (9H, m), 1,27 (6H, m), 1,60 (8H, m), 2,02 (8H, m), 2,31 (6H, td, $J=7,6$ e $3,3$ Hz), 2,77 (2H, t, $J=6,7$ Hz), 4,14 (2H, dd, $J=11,9$ e $6,0$ Hz), 4,29 (2H, dd, $J=11,9$ e $4,3$ Hz), 5,26 (1H, tt, $J=6,0$ e $4,3$ Hz), 5,35 (6H, m). Tais valores são similares aos sinais de RMN de ^1H da fração F1215C710 confirmando ser de triacilgliceróis (figura 24).

Figura 24. Estrutura típica de triacilgliceróis.



Os triacilgliceróis, também conhecidos como triglicerídeos, constituem um grupo de lipídios que são comumente armazenados em plantas. Fungos endofíticos também demonstram uma alta capacidade de produzi-los. Esses triacilgliceróis fazem parte da

matéria-prima de óleos não comestíveis, encontrando aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e principalmente de biocombustíveis (ELFITA *et al.*, 2020).

Para analisar a composição química da mistura de triacilgliceróis, estes foram submetidos a hidrólise, seguido pela metilação dos ácidos e, em seguida, os ácidos graxos metilados foram analisados por CG-EM. Os dados obtidos das análises por CG-EM dos triacilgliceróis mostrou que a fração F1215C710 tinha como componentes majoritários ácido palmítico (27.23%) e ácido esteárico (16.68%). Já os componentes minoritários foram o ácido octanóico e ácido dodecanóico. A figura 25 apresenta os cromatogramas de íons totais, a tabela 16 apresenta os ésteres metílicos de ácidos graxos identificados na mistura de triacilgliceróis e a figura 26 suas estruturas químicas.

Figura 25. Cromatogramas de íons totais em duplicata da fração F1215C710.

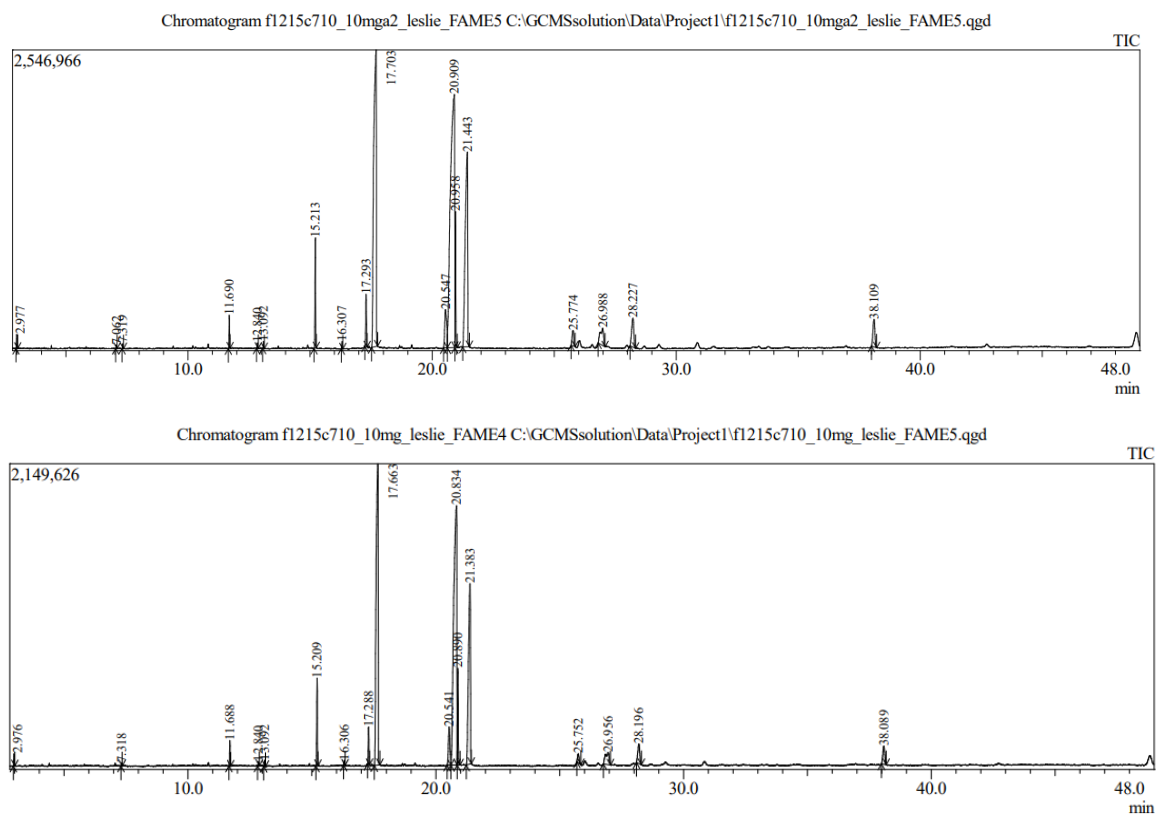
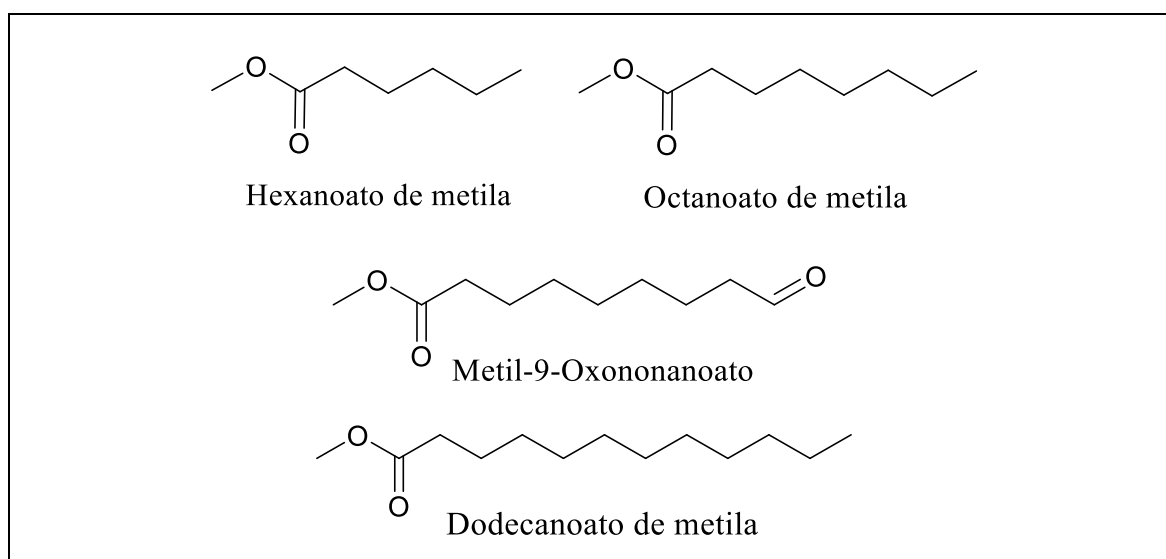
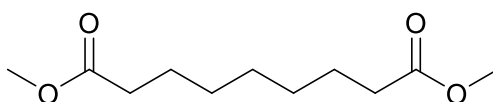


Tabela 16. Ésteres metílicos de ácidos graxos identificados por CG-EM na mistura de triacilgliceróis.

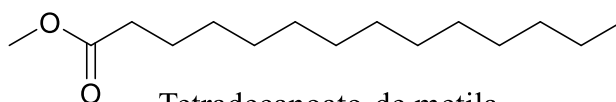
Nº da substância	Ésteres formados (Ácidos graxos)	Fórmula molecular	Tempo de retenção (min)	Área do pico (%)
1	Hexanoato de metila (Ácido hexanóico)	$C_7H_{12}O_2$	2,98	0,22
2	Octanoato de metila (Ácido octanóico)	$C_9H_{18}O_2$	7,30	0,06
3	Metil-9-Oxononanoato (Ácido-9-oxononanóico)	$C_{10}H_{18}O_3$	11,68	0,64
4	Dodecanoato de metila (Ácido dodecanóico)	$C_{13}H_{26}O_2$	12,84	0,1
5	Dimetil azelato (Ácido azelaico)	$C_{11}H_{20}O_4$	13,09	0,14
6	Tetradecanoato de metila (Ácido tetradecanóico)	$C_{15}H_{30}O_2$	15,21	2,35
7	Pentadecanoato de metila (Ácido pentadecanóico)	$C_{16}H_{32}O_2$	16,31	0,15
8	Palmitoleato de metila (Ácido palmitoleico)	$C_{17}H_{32}O_2$	17,29	1,31
9	Palmitato de metila (Ácido pamítico)	$C_{17}H_{34}O_2$	17,68	27,23
10	Linoleato de metila (Ácido linoleico)	$C_{19}H_{34}O_2$	20,54	2,75
11	Estearato de metila (Ácido esteárico)	$C_{19}H_{38}O_2$	21,41	16,68
12	18-Metilnonadecanoato de metila (Ácido nonadecanoico)	$C_{21}H_{42}O_2$	28,21	2,29
13	Docosanoato de metila (Ácido docosanóico)	$C_{23}H_{46}O_2$	38,10	1,92

Figura 26. Estruturas químicas dos ésteres metílicos de ácidos graxos identificados por CG-EM.

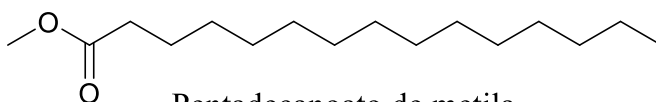




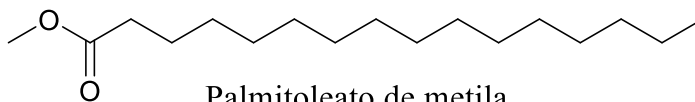
Dimetil azelato



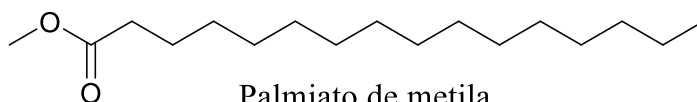
Tetradecanoato de metila



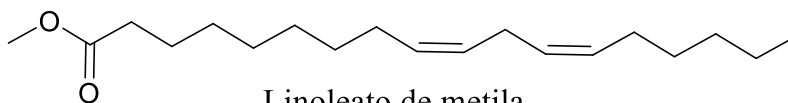
Pentadecanoato de metila



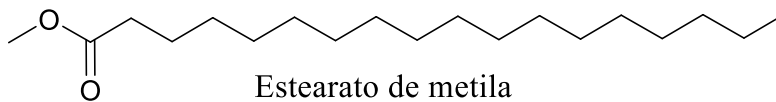
Palmitoleato de metila



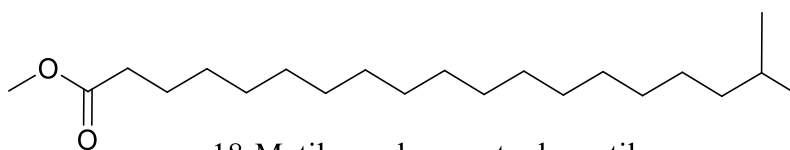
Palmiato de metila



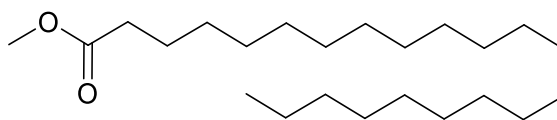
Linoleato de metila



Estearato de metila



18-Metilnonadecanoato de metila



Docosanoato de metila

Na literatura, os ácidos palmítico, linoleico, oleico e mirístico destacam-se como os principais constituintes majoritários dos triacilgliceróis fúngicos. Como exemplo, a análise por CG-EM dos triacilgliceróis da co-cultura de microalgas e leveduras que incluíam

Candida pimensis, *Arthroderma vanbreuseghemii*, *Diaporthe aspalathi*/*Diaporthe meridionalis* e *Hericium americanum*, indicou que o ácido oleico foi o ácido graxo encontrado em maior porcentagem (64,95% de oleato de metila) (SUASTES-RIVAS *et al.*, 2020).

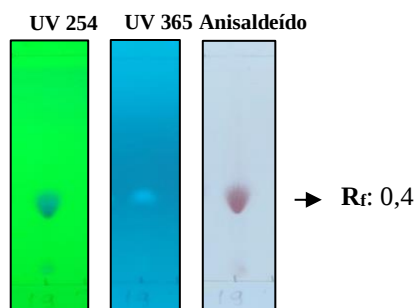
Já o extrato hexano do fungo endofítico *Trichoderma* sp. EFI671 apresentou os ácidos linoleico e palmítico como componentes principais e ácido esteárico como componente secundário (KAUSHIK *et al.*, 2020). De três cepas fúngicas isoladas de *Solanum nigrum*, duas apresentaram o ácido linoleico como componente majoritário dos triacilgliceróis. Na análise de RMN de ^1H do óleo fúngico bruto de *Aspergillus flavus* o teor de ácido linoleico e ácido oleico foi de 61,8% e 23,6%, respectivamente (EL-HAWARY *et al.*, 2016).

A cepa endofítica *Lasiodiplodia exígua*, isolada de *Sapindus mukorossi*, apresentou ácido mirístico e ácido palmítico como componentes majoritários. Em *Phomopsis* sp., isolado de *Mesua ferrea*, foram identificados ácido oleico e ácido palmítico. E *Phomopsis* sp. de *Jatropha curcas* apresentou ácido mirístico, ácido palmítico e ácido oleico como componentes majoritários (SUSMITA *et al.*, 2020).

5.9.2 Identificação da substância 1 (F19-21C1517)

A substância 1, codificada como F19-21C1517 (35,0 mg), foi isolada do extrato DCM dos micélios de *D. oculi*, apresentando aspecto sólido amorfo de coloração branca. Em placa de CCD (figura 27), mostrou absorção em luz UV de 254 e 365 nm e, quando revelada com anisaldeído sulfúrico, exibiu mancha lilás.

Figura 27. Placas de CCDC da fração 19-21 isolada do ext. DCM. Sistema: DCM 100%.



A substância 1 foi identificada com base na análise dos dados de RMN de ^1H , ^{13}C e comparação com a literatura. O espectro de RMN de ^1H (figuras 29, 30 e 31) sugeriu

um padrão espectral de esteroides, pois apresentou sinais de metilas em δ 0,63 (s, 3H); δ 0,83 (dd, 6H); δ 0,92 (d, 3H); δ 0,96 (s, 3H); δ 1,04 (d, 3H) e δ 1,47 (m, 3H). Além dos sinais nas regiões de hidrogênio olefínicos em δ 5,19 (m, 1H); δ 5,21 (m, 1H); δ 5,39 (dd, 1H) e δ 5,58 (dd, 1H).

A partir do espectro de ^{13}C (figura 32) foi possível verificar 28 carbonos, sendo 6 C de metilas (δ 12,02; δ 16,02; δ 17,58; δ 19,62; δ 19,93; 21,07), 7 metilênicos (δ 21,07; δ 22,96; δ 28,27; δ 31,94; δ 38,32; δ 39,03; δ 40,74), 11 metínicos (δ 70,42; δ 119,54; δ 116,23; δ 46,18; δ 54,51; δ 55,66; δ 40,42; δ 135,53; δ 131,92; δ 42,78; δ 33,04) e 4 quaternários (δ 42,78; δ 36,98; δ 141,36; δ 139,74).

Através da comparação dos espectros obtidos com dados de Alexandre *et. al* (2017) que podem ser observados na tabela 17, foi possível identificar o esteroide ergosterol (figura 28).

Figura 28. Estrutura do Ergosterol

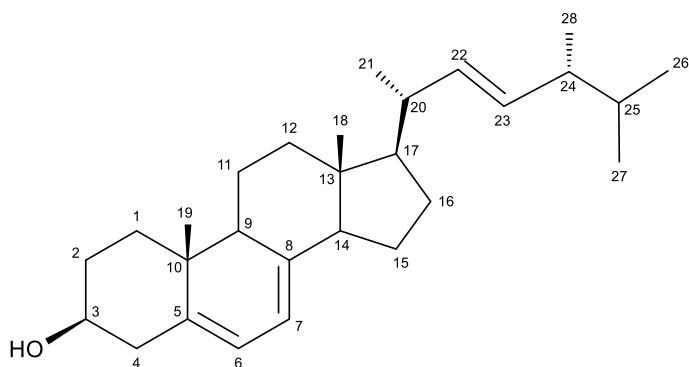


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H do ergosterol, obtido do ext. DCM dos micélio do fungo *D. oculi* (CDCl_3 , 300 MHz).

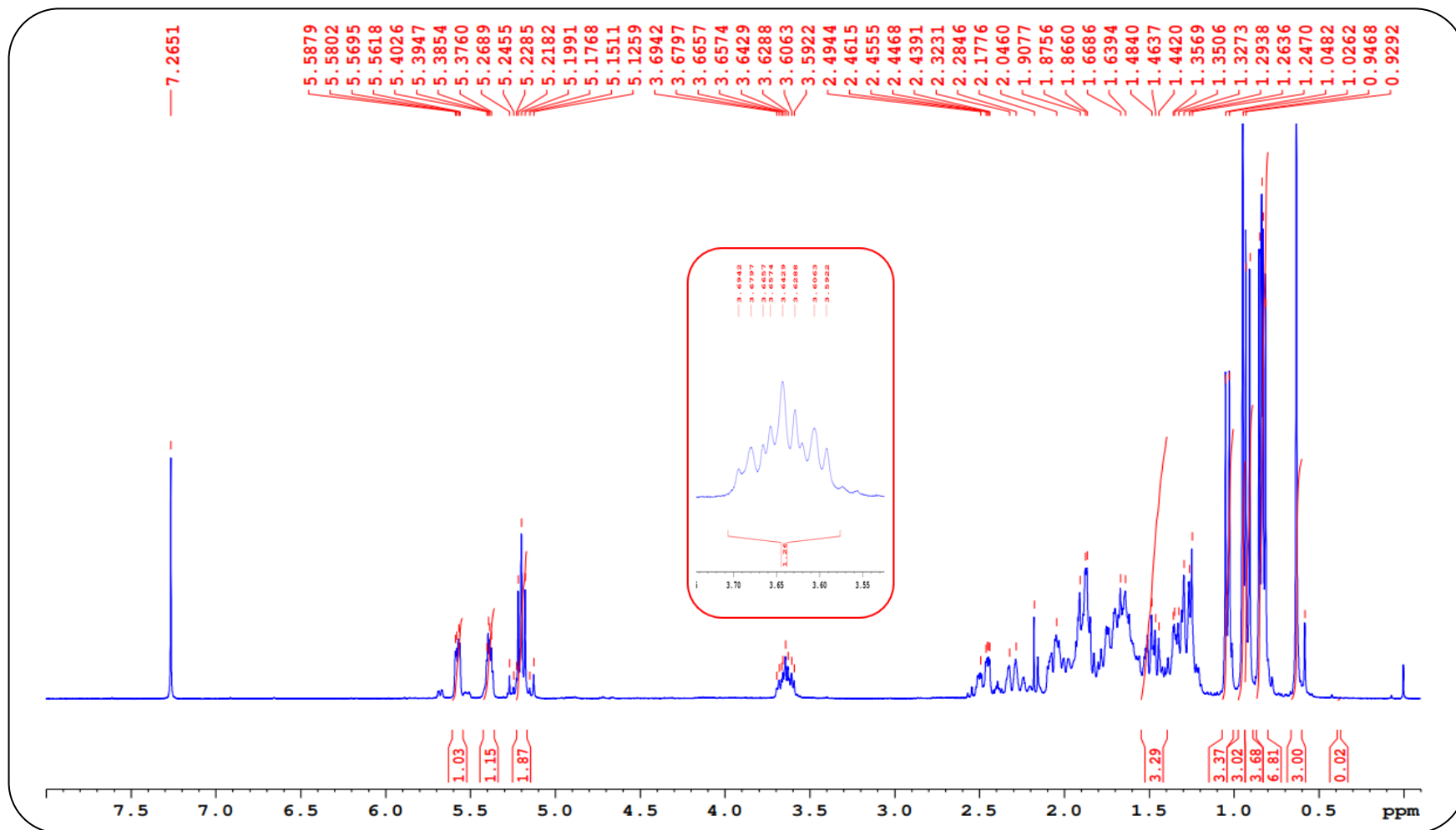


Figura 30. Expansão do espectro de RMN de ^1H dos sinais metílicos do ergosterol, obtido do ext. DCM dos micélios do fungo *D. oculi* (CDCl_3 , 300 MHz).

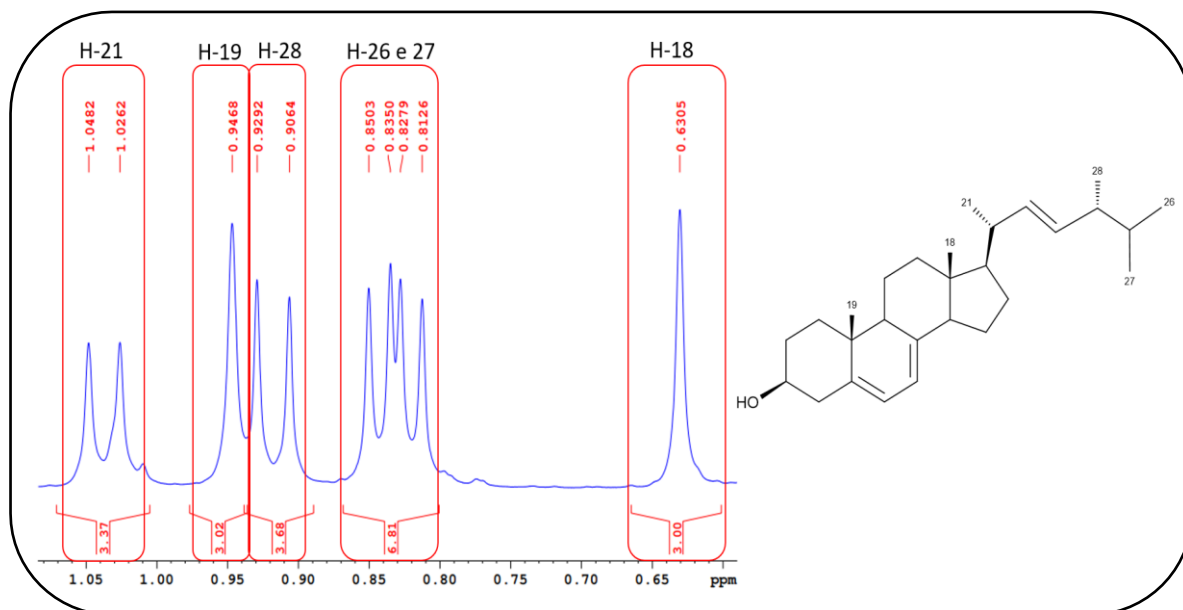


Figura 31. Expansão dos sinais de RMN de ^1H das duplas olefínicas do ergosterol, obtido do ext. DCM dos micélios do fungo *D. oculi* (CDCl_3 , 300 MHz).

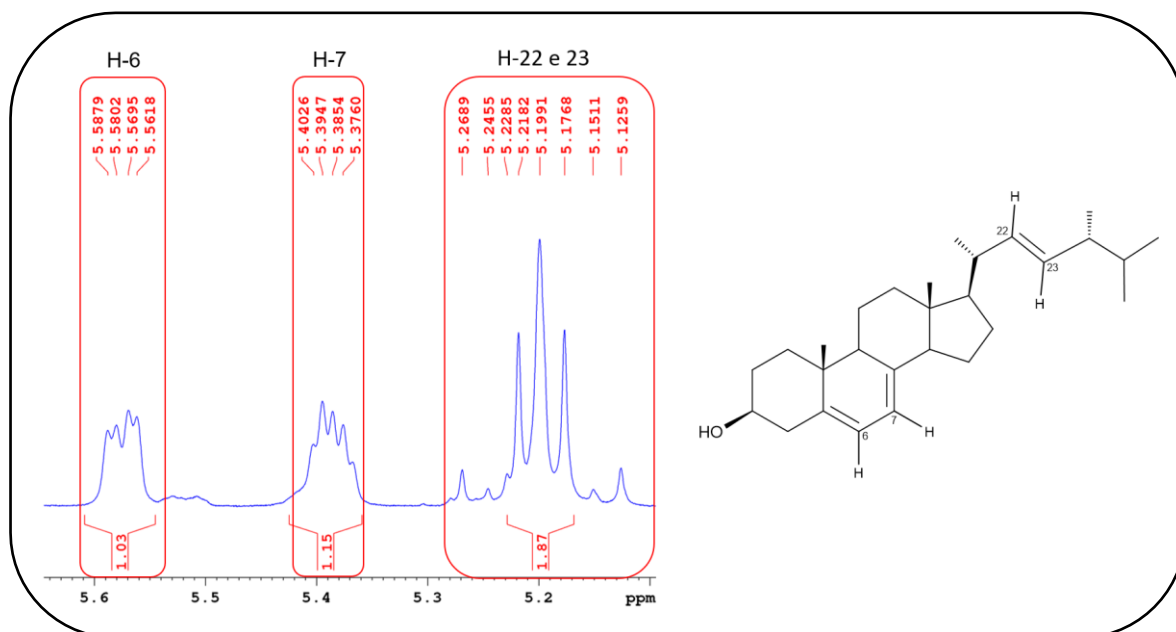


Figura 32 Espectro de RMN de ^{13}C do ergosterol obtido do ext. DCM do micélio do fungo *D. oculi* (CDCl_3 , 300 MHz).

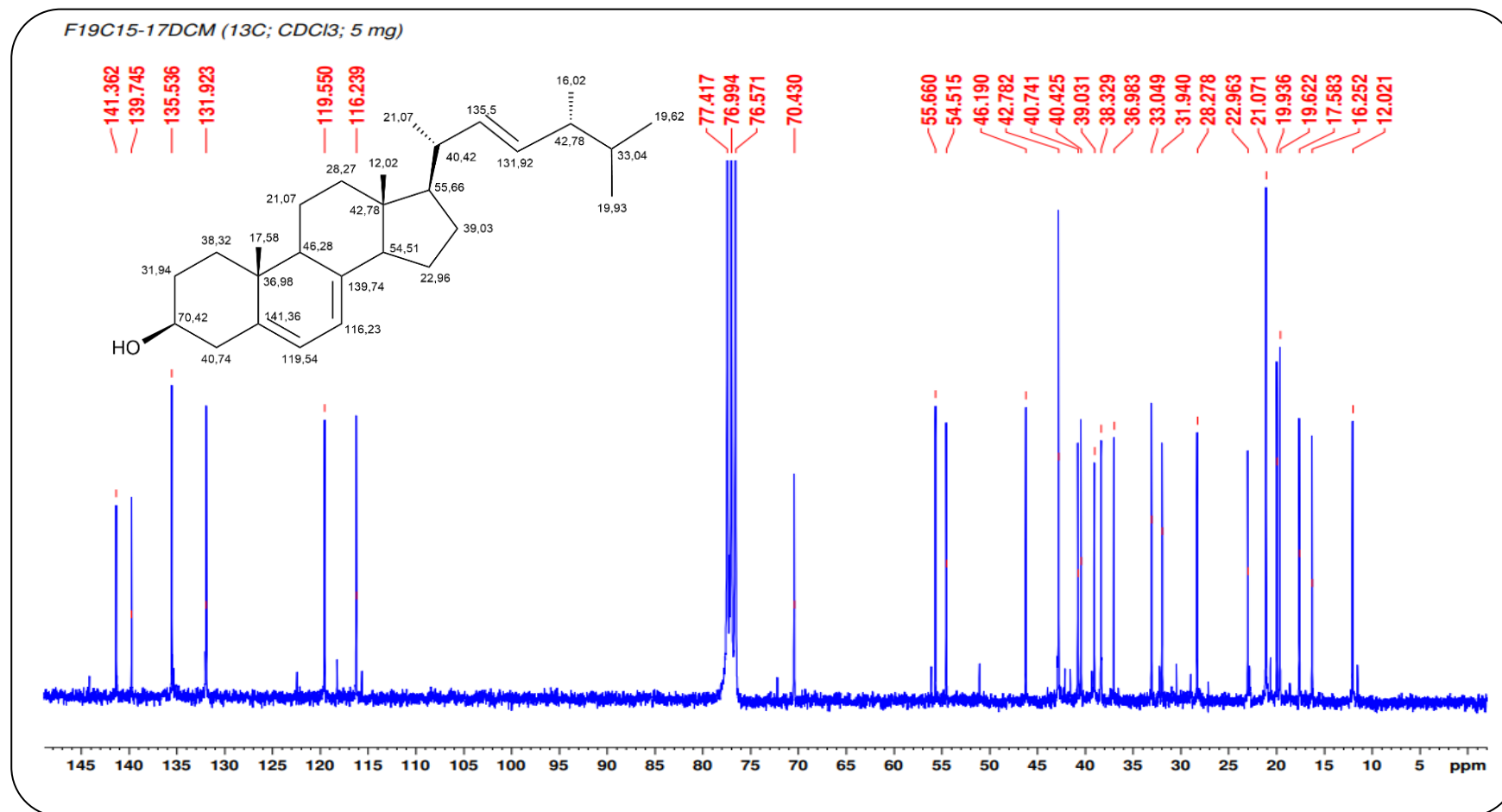


Tabela 17. Dados de RMN de ^{13}C e ^1H (CDCl_3 , MHz) do ergosterol e sua comparação com a literatura.

N°	RMN ^{13}C δ (ppm) ^{1*}	RMN ^1H δ (ppm) ^{2*}	RMN ^{13}C δ (ppm) ^{3*}	RMN ^1H δ (ppm) ^{4*}
	Substância 1		(ALEXANDRE <i>et al.</i> , 2017)	
1	38,32		38,4	
2	31,94		31,9	
3	70,42	3,63 <i>m</i> (1H)	70,5	3,64 <i>m</i> (1H)
4	40,74		40,8	
5	139,74		139,8	
6	119,54	5,58 <i>dd</i> (J=5,52 e 2,31 Hz, 1H)	119,6	5,58 <i>dd</i> (J=5,5 e 3,0 Hz, 1H)
7	116,23	5,39 <i>dd</i> (J=5,16 e 2,6 Hz, 1H)	116,3	5,38 <i>dd</i> (J=5,4 e 2,9 Hz, 1H)
8	141,36		141,4	
9	46,28		46,2	
10	36,98		37,1	
11	21,07		21,1	
12	39,03		39,1	
13	42,78		42,9	
14	54,51		54,6	
15	22,96		22,9	
16	28,27		28,3	
17	55,66		55,7	
18	12,02	0,94 <i>s</i> (3H)	12,1	0,95 <i>s</i> (3H)
19	16,02	0,63 <i>s</i> (3H)	16,3	0,65 <i>s</i> (3H)
20	40,42		40,3	
21	21,07	1,04 <i>d</i> (J=6,6 Hz, 3H)	21,1	1,04 <i>d</i> (J=6,6 Hz, 3H)
22	135,50	5,19 <i>m</i> (1H)	135,6	5,20 <i>m</i> (1H)
23	131,92	5,21 <i>m</i> (1H)	131,9	5,21 <i>m</i> (1H)
24	42,78		42,9	
25	33,04		33,1	
26	19,93	0,85 <i>d</i> (J=6,72 Hz, 3H)	19,9	0,84 <i>d</i> (J=6,7 Hz, 3H)
27	19,62	0,82 <i>d</i> (J=6,72 Hz 3H)	19,7	0,82 <i>d</i> (J= 6,7 Hz, 3H)
28	17,58	0,92 <i>d</i> (J=6,84 Hz, 3H)	17,6	0,92 <i>d</i> (J= 6,6 Hz, 3H)

1* 75 MHz, CDCl_3 ; 2* 300 MHz, CDCl_3 ; 3* 75 MHz, CDCl_3 ; 4* 300 MHz, CDCl_3 .

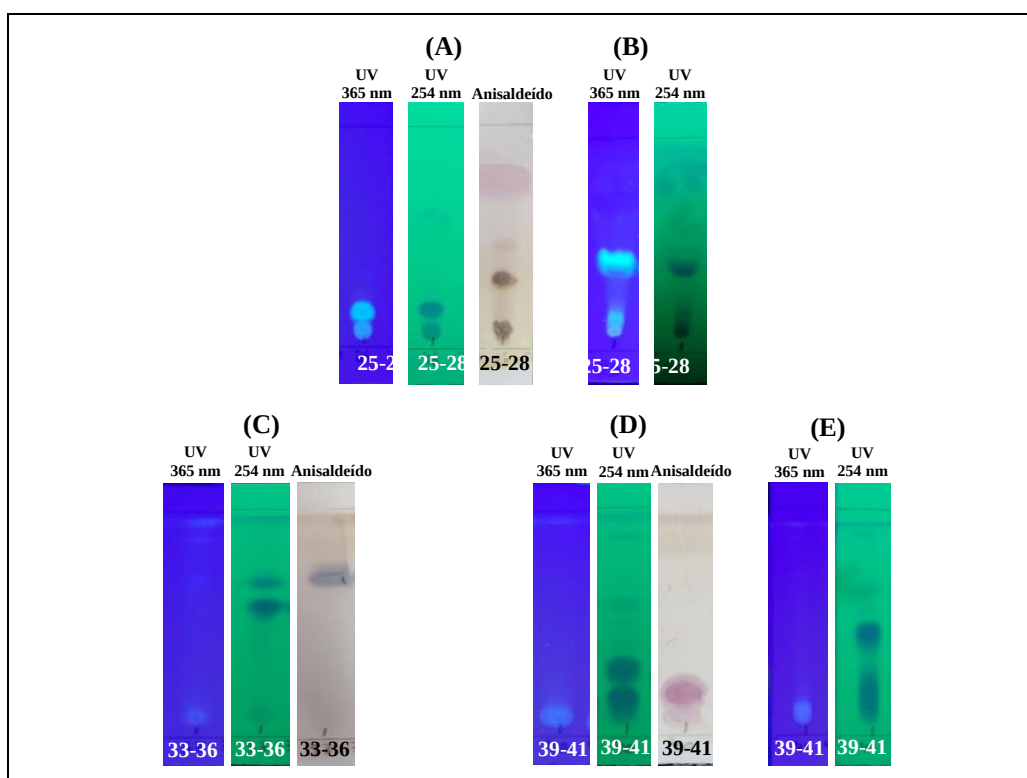
O ergosterol é um componente essencial das membranas celulares fúngicas, que determina a fluidez, permeabilidade e atividade das proteínas associadas à membrana (JORDÁ & PUIG, 2020). Ele tem sido reconhecido como um importante composto bioativo, com relatos de seu potencial anti-inflamatório, antifibrótico e antifúngico. Este último ocorre devido a sua capacidade de interromper o crescimento e as atividades metabólicas de fungos patogênicos (MBANBO *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2013; PENG *et al.*, 2014).

Na literatura, o ergosterol isolado de *Amauroderma rude* foi capaz de induzir a morte de células cancerígenas de camundongos com a linhagem celular de câncer murino B16 (LI *et al.*, 2015). Foi constatado também que ele possui efeito terapêutico na prevenção da nefropatia diabética, que é uma complicação microvascular do diabetes e representa um tratamento promissor para atenuar essa condição (DONG *et al.*, 2019).

5.10 Análises de frações obtidas de fracionamentos da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de *Diaporthe oculi*

Após fracionamento em coluna de sílica da fase AcOEt do extrato metanólico do micélio de *D. oculi*, as frações foram submetidas a análises em CCDC e aquelas que apresentaram similaridades e os mesmos valores de R_f foram reunidas. Das frações reunidas, as denominadas Dofa.25-28 (Figura 33 A e B), Dofa.33-36 (Figura 33 C) e Dofa.39-41 (Figura 33 D e E) mostraram-se interessantes e foram submetidas a novos fracionamentos.

Figura 33. Placas de CCDC de frações obtidas do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH. Sistema de eluição: (A): Hex/DCM 9:1; (B): DCM 100%; (C): AcOEt/acetona 9:1; (D): AcOEt/acetona 8:2, (E): AcOEt/acetona 1:1.



O refracionamento de Dofa.25-28 deu origem a 53 subfrações. As cromatoplas das subfrações mais interessantes são visualizadas na figura 34 e descritas a seguir.

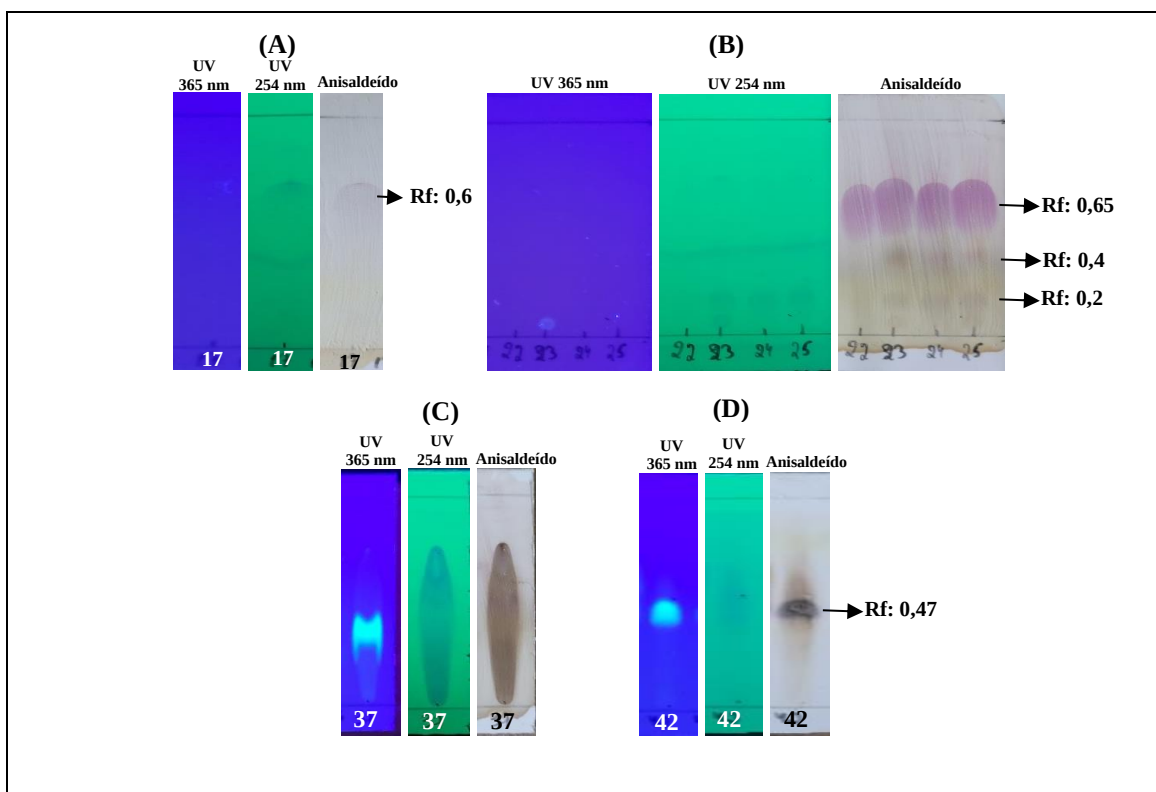
A subfração 17 (Figura 34 A), com massa de 31,9 mg, não revelou bandas ao ser exposta à luz UV₃₆₅. No entanto, em UV₂₅₄ e com anisaldeído, foi observada uma leve banda, o que infere a possível presença de substância(s) com ligações duplas conjugadas e terpenoides ou esteroides.

As subfrações 22-25 (Figura 33 B) (com um total de 284 mg) apresentaram uma leve fluorescência quando revelada em luz UV₃₆₅ e UV₂₅₄, mas exibiram manchas lilás ao serem revelada com anisaldeído evidenciando também a possível presença de terpenoides ou esteroides.

A subfração 37 (Figura 34 C), com massa de 136,4 mg, apresentou fluorescência ao ser revelada em luz UV₃₆₅ e UV₂₅₄, indicando a presença de substâncias com ligações duplas. Além disso, a revelação com anisaldeído resultou em uma mancha escura.

A subfração 42 (Figura 34 D), com uma massa de 18,2 mg, revelou uma forte fluorescência azul quando exposta à luz UV₃₆₅. Na UV₂₅₄, observou-se leve mancha escura. A revelação com anisaldeído também resultou em uma banda escura no mesmo Rf da fluorescência.

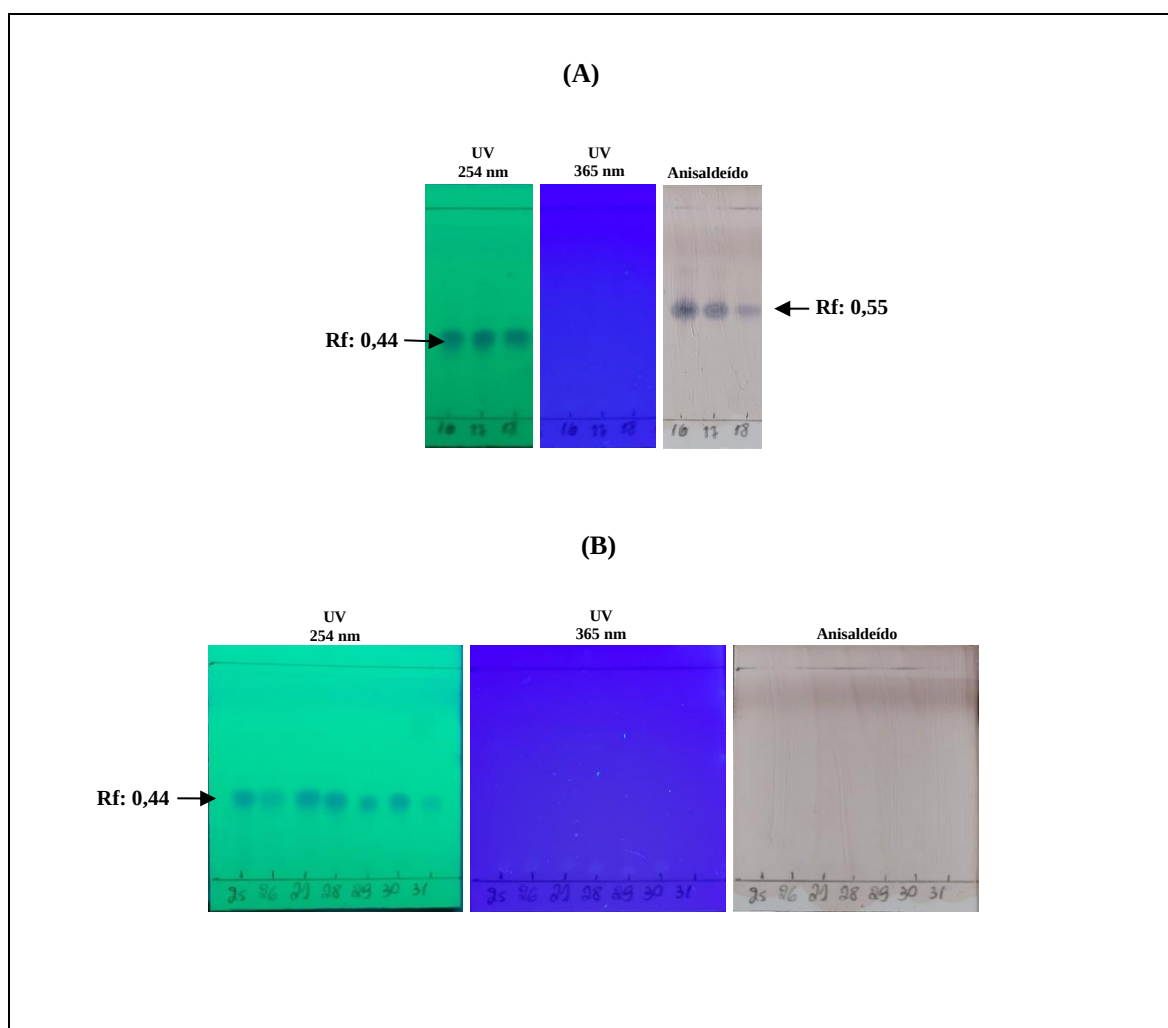
Figura 34. Placas de CCDC de frações obtidas do refractionamento de Dofa.25-28 da fase AcOEt do extrato MeOH. Sistema de eluição: **(A)** e **(B)**: Hex/DCM 3:7; **(C)**: Hex/DCM 2:8 e **(D)**: DCM/Acetona 9:1

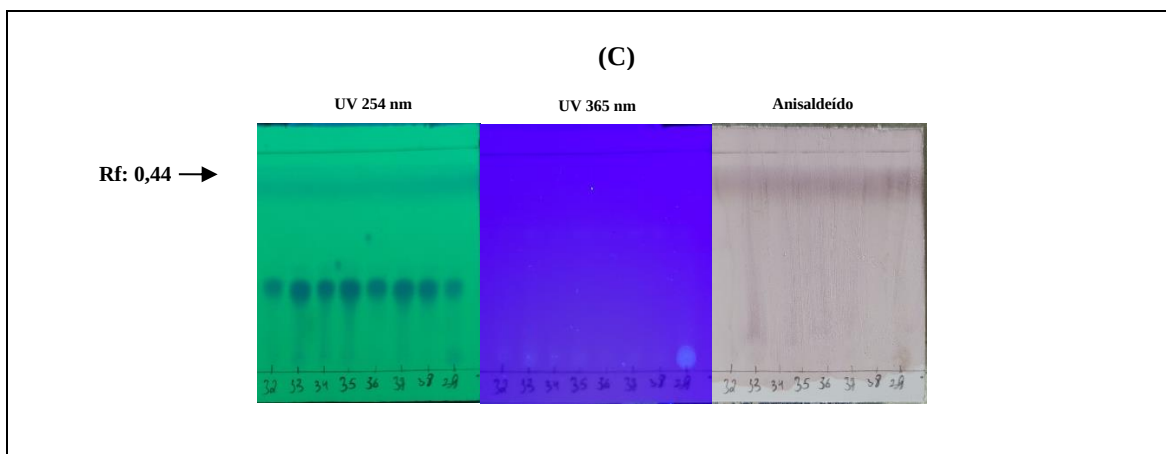


Ao analisar as placas de CCDC das subfrações do refractionamento de Dofa.33-36, notou-se que as subfrações 16-18 (figura 35A) não exibiram fluorescência quando a cromatoplaca foi exposta à luz UV₃₆₅. No entanto, observaram-se manchas escuras sob exposição à luz UV₂₅₄ e manchas azul escuro ao serem reveladas com anisaldeído. As três subfrações apresentam o mesmo Rf, o que implica dizer que se trata da(s) mesma(s) substância(s).

As subfrações 25-39 (figura 35 B e C) apresentara manchas escuras ao serem reveladas em luz UV₂₅₄ e não apresentaram fluorescência em luz UV₃₆₅. Quando reveladas com anisaldeído, não apresentaram bandas, indicando a ausência de terpenoides ou esteroides.

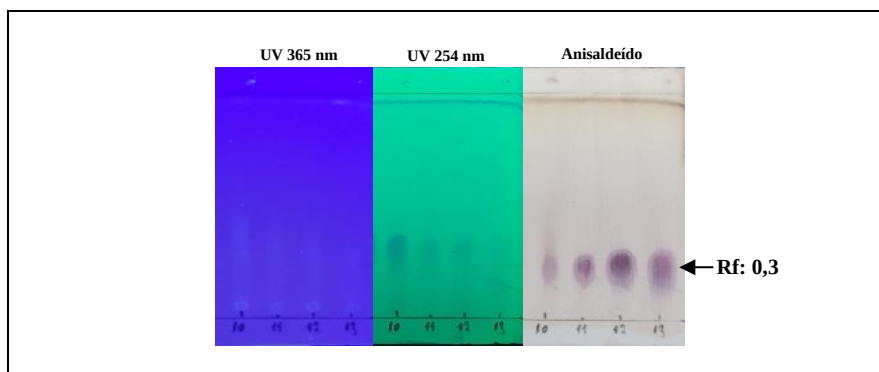
Figura 35. Placas de CCDC de frações obtidas do refractionamento de Dofa.33-36 da fase AcOEt do extrato MeOH. Sistema de eluição: **(A)** AcOEt/Acetona; 8:2 e **(B)** e **(C)** AcOEt/Acetona 7:3.





No refractionamento de Dofa.39-41 as subfrações 10-13 (figura 36) se mostraram interessantes. Quando a cromatoplaça das subfrações foram expostas sob luz UV₃₆₅ e UV₂₅₄ observou-se uma leve fluorescência. Já quando revelada com anisaldeído notou-se manchas roxo/lilás o que infere a presença de terpenos ou esteroides.

Figura 36. Placas de CCDC de frações obtidas do refractionamento de Dofa.39-41 da fase AcOEt do extrato MeOH. Sistema de eluição:AcOEt/Acetona; 8:2.



Não foi possível submeter nenhuma das subfrações a purificação por CLAE, nem à técnica de RMN para identificação de substâncias, devido aos equipamentos estarem inoperantes até o presente momento.

5.11 Ensaios biológicos de extrato e fases do micélio de *Diaporthe oculi*

5.11.1 Ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Os resultados do ensaio de toxicidade frente à *A. salina* demonstraram que houve um baixo índice de mortalidade dos microcrustáceos, como pode ser visualizado na tabela 18. Referindo-se ao índice de toxicidade de Meyer, extratos brutos com CL₅₀ inferiores a 1000 µg/mL são considerados tóxicos e os extratos brutos com CL₅₀ superiores a 1000

µg/mL são considerados não tóxicos. Portanto, o extrato DCM e as fases AcOEt e hidrometanólica do extrato MeOH são atóxicas (HAMIDI *et al.* 2014).

Resultados atóxicos indicam que os extratos podem ser úteis para uso em cosméticos e produtos farmacêuticos, desde que demonstrem atividades biológicas para esses fins. (OHIKHENA, *et al.*, 2016).

Tabela 18. Porcentagem de indivíduos mortos frente às diferentes concentrações

Amostras testadas	Concentração (µg/mL)	
	1000	500
Extrato Diclorometano	0	0
	0 0%	0 0%
	0	0
Fase Hidrometanólica do ext. MeOH	1	0
	1 10%	0 0%
	1	0
Fase AcOEt do ext. MeOH	1	0
	0 3.33%	0 0%
	0	0
Controle -	0	0
	0 0%	0 0%
	0	0
Controle +	10	10
	10 100%	10 100%
	10	10

5.11.2 Atividade antibacteriana de extrato e fases do micélio de *Diaporthe oculi*

Ao analisar a atividade antibacteriana do extrato diclorometano, bem como das fases hidrometanólica e acetato de etila do extrato metanólico provenientes do segundo cultivo do fungo *Diaporthe oculi*, verificou-se que não houve inibição significativa do crescimento bacteriano da maioria das bactérias. Contudo, o extrato diclorometano inibiu quase 50% do crescimento de *Escherichia coli* conforme visualizado na tabela 19.

Tabela 19. Resultado da CIM, em µg/mL, dos extratos de *Diaporthe oculi* testados frente às bactérias patogênicas humanas utilizando a técnica de microdiluição em caldo.

Amostras	AB	SA	PA	EC	KP	AH	EF	MM	SE
Extrato Diclorometano	NA	NA	1000 µg/mL (4,41) ±0,01	1000 µg/mL (49,75) ±0,05	NA	NA	NA	NA	NA
Fase Hidrometanólica do ext. MeOH	NA	1000 µg/mL (11,10) ±0,020	1000 µg/mL (20,91) ±0,05	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fase Acetato do ext. MeOH	NA	NA	1000 µg/mL (14,48) ±0,01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Oxitetraciclina	99,65 ±0,001	99,84 ±0,001	99,79 ±0,004	99,76 ±0,004	99,88 ±0,001	99,77 ±0,001	99,95 ±0,001	99,87 ±0,001	99,90 ±0,001

NA: Não houve inibição. () Dados de inibição. ± Desvio Padrão. **AB** (*Acinetobacter baumannii*), **SA** (*Staphylococcus aureus*), **PA** (*Pseudomonas aeruginosa*) **EC** (*Escherichia coli*), **KP** (*Klebsiella pneumoniae*), **AH** (*Aeromonas hydrofila*), **EF** (*Enterococcus faecium*), **MM** (*Morganella morganii*), **SE** (*Salmonella enterica*).

Ao comparar os resultados do segundo ensaio antibacteriano com o primeiro, percebeu-se uma diminuição de porcentagem de inibição frente às 3 bactérias utilizadas no primeiro ensaio (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*). Essa diminuição pode ser explicada pela sinergia de múltiplos metabólitos bioativos da primeira extração, já que os micélios foram extraídos apenas com metanol no primeiro cultivo. A literatura relata que a sinergia em uma mistura de várias substâncias pode resultar em um efeito maior sobre um determinado microrganismo do que o composto em sua forma pura (CAESAR & CECH, 2019; DOS REIS *et al.*, 2019).

O efeito sinérgico é relatado em estudos feitos com o fungo endofítico *Phomopsis Longicolla*, onde foi observada ação inibitória significativamente positiva do extrato metabólico bruto, enquanto o oposto ocorreu com as frações obtidas do mesmo (GARCIA *et al.*; 2012; FLORES *et al.*, 2013). Similarmente, a atividade antimicrobiana do extrato bruto acetato de etila do fungo endofítico *Lasiodiplodia pseudotheobromae* foi mais eficiente do que em suas frações (JALIL & IBRAHIM, 2022).

Em análises feitas por Cadelis e colaboradores (2021), observou-se que culturas fúngicas do fungo endofítico *Neofusicoccum australe*foi haviam inibido potentemente o

crescimento de *E. coli*. No entanto, essa forte inibição não persistiu após a extração dos metabólitos. Os autores justificaram que é possível que várias substâncias possam ser responsáveis pela atividade antibacteriana do fungo endofítico ou que outro(s) composto(s) não tenha sido extraído(s).

Resultados de efeito sinérgico similar também foram observados em ensaios antileishmania de extratos, fases e substâncias isoladas do endófito *Cochliobolus sativus* P2-F3. A fase hexânica de *C. sativus* P2-F3, proveniente do extrato etanólico, mostrou-se mais ativa ($CI_{50} = 2,05 \mu\text{g/mL}$) do que o extrato inicial ($CI_{50} = 3,0 \mu\text{g/mL}$). No entanto, anhidrococleoquinona A e a mistura de cocleoquinona A e isococlioquinona A, isoladas da fase hexânica, apresentaram atividade antileishmania com CI_{50} de 50,53 e 10,16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, valores menores que a fase hexânica (DO NASCIMENTO *et al.*, 2015).

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho, constatou-se que a espécie *Deguelia duckeana*, possui um alto índice de colonização fúngica, visto que foi possível o isolamento de 28 fungos endofíticos. Dentre esses, os 14 fungos selecionados para cultivo submerso apresentaram uma diversidade metabólica composta por substâncias aromáticas, terpenos e alcaloides quando analisados os perfis químicos por CCDC e RMN de ^1H . Isso indica que as condições de cultivo permitiram a produção de distintas classes químicas.

A triagem química direcionou a seleção para os fungos endofíticos codificados como BDDD14-G3, BDDD23-G5 e BDDD25-G4 que foram identificados como *Diaporthe* sp., *Colletotrichum* sp. e *Diaporthe oculi*, respectivamente. Os extratos metanólicos dos três fungos apresentaram atividade antibacteriana contra pelo menos uma bactéria patogênica de interesse clínico. O fungo *Diaporthe oculi* foi selecionado para cultivo em escala ampliada, pelo seu extrato bruto ter se mostrado ativo frente a todas as três bactérias.

O estudo químico do extrato diclorometano do fungo *D. oculi* resultou no isolamento de ergosterol e uma mistura de triacilgliceróis. A análise por CG-EM dos triacilgliceróis revelou que os ácidos graxos metilados predominantes na mistura foram o ácido palmítico (27,9%) e o ácido esteárico (16,5%).

Os extratos e fases do segundo cultivo do fungo *D. oculi* não apresentaram citotoxicidade frente a *Artemia salina*. O extrato DCM inibiu 49,75% do crescimento de *Escherichia coli* e observou-se uma diminuição de porcentagem de inibição frente as 3 bactérias do primeiro ensaio do extrato DCM e fases hidrometanólica e acetato de etila do segundo cultivo do fungo *D. oculi*, que pode estar relacionada ao sinergismo das substâncias extraídas e, que juntas são responsáveis pela bioatividade inicial observada no extrato MeOH.

Esses resultados contribuem para a caracterização química e biológica da microbiota endofítica da Amazônia. Além disso, este é o primeiro relato de estudo químico para *D. oculi*. Estudos futuros poderão continuar a explorar o potencial biotecnológico dos demais fungos de *Deguelia duckeana*, bem como identificar outras substâncias presentes nos extratos de *D. oculi* com possíveis potenciais biológicos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUSHAHEEN, M. A. *et al.* Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. **Disease-a-Month**, v. 66, n. 6, p. 100971, 2020.
- ALEXANDRE, T. R. *et al.* Ergosterol isolated from the basidiomycete *Pleurotus salmoneostramineus* affects *Trypanosoma cruzi* plasma membrane and mitochondria. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, 2017.
- AMARAL, A. O.; FERREIRA, A. F. T. A. F.; BENTES, J. L. S. Fungal endophytic community associated with *Hevea* spp.: diversity, enzymatic activity, and biocontrol potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 857-872, 2022.
- ARCIUOLO, R. *et al.* Molecular characterization of *Diaporthe* species associated with hazelnut defects. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 611655, 2020.
- ASOKAN, G. V. *et al.* WHO global priority pathogens list: a bibliometric analysis of Medline-PubMed for knowledge mobilization to infection prevention and control practices in Bahrain. **Oman medical journal**, v. 34, n. 3, p. 184, 2019.
- ATAYDE, H. M. **Aplicação de Lipases de fungos amazônicos para melhoramento biotecnológico de óleo de peixe**. Programa de pós-graduação em ciências pesqueiras nos trópicos, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil, 2017.
- ATEBA, J. E. *et al.* Antiplasmodial properties and cytotoxicity of endophytic fungi from *Symphonia globulifera* (Clusiaceae). **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 70, 2018.
- ATLI, B. *et al.* Secondary Metabolites in Fungi. **Natural Products and Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 114-138, 2022.
- BACON, C W.; WHITE, J (Ed.). **Microbial endophytes**. CRC press, 2000.
- BAMISILE, B. S. *et al.* Fungal endophytes: beyond herbivore management. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 544, 2018.
- BILOUS, S. *et al.* Antifungal Activity and Effect of Plant-Associated Bacteria on Phenolic Synthesis of *Quercus robur* L. **Plants**, v. 12, n. 6, p. 1352, 2023.
- BORMAN, A. M.; JOHNSON, E. M. Name changes for fungi of medical importance, 2018 to 2019. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 2, p. e01811-20, 2021.
- BUNGIHAN, M. E. *et al.* Bioactive metabolites of *Diaporthe* sp. P133, an endophytic fungus isolated from *Pandanus amaryllifolius*. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, p. 606-609, 2011.
- CADELIS, M. M. *et al.* Antimicrobial metabolites against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the endophytic fungus *Neofusicoccum australe*. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 1094, 2021.

- CAESAR, Lindsay K.; CECH, Nadja B. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1+1 does not equal 2. **Natural product reports**, v. 36, n. 6, p. 869-888, 2019.
- CALCUL, L. *et al.* Screening mangrove endophytic fungi for antimalarial natural products. **Marine drugs**, v. 11, n. 12, p. 5036-5050, 2013.
- CAMARGO, R. A.; TOZZI, M. G. A. A synopsis of the genus *Deguelia* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae) in Brazil. **Brittonia**, v 66, p. 12-32, 2014.
- CAMPOS, J. L. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Indicators of conservation priorities for medicinal plants from seasonal dry forests of northeastern Brazil. **Ecological Indicators**, v. 121, p. 106993, 2021.
- CARRION, L. L. *et al.* Antimycobacterial activity of Brazilian Amazon plants extracts. **International Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 4, p. 479, 2013.
- CARROLL, G. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology**, v. 69, n. 1, p. 2-9, 1988.
- CARUSO, D. J. *et al.* Exploring the promise of endophytic fungi: a review of novel antimicrobial compounds. **Microorganisms**, v. 10, n. 10, p. 1990, 2022.
- CHAISIRI, C. *et al.* Morphology characterization, molecular phylogeny, and pathogenicity of *Diaporthe passifloricola* on *Citrus reticulata* cv. Nanfengmiju in Jiangxi province, China. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 218, 2021.
- CHANG, F. R. *et al.* Natural products from *Diaporthe arecae* with anti-angiogenic activity. **Israel Journal of Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 439-445, 2019.
- CHEN, C. J. *et al.* Sesquiterpenoids isolated from an endophyte fungus *Diaporthe* sp. **RSC advances**, v. 5, n. 23, p. 17559-17565, 2015.
- CHEN, X. L. *et al.* Transcriptomic and metabolomic approaches deepen our knowledge of plant–endophyte interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 3339, 2022.
- CHEN, Z. *et al.* Fungal endophyte improves survival of *Lolium perenne* in low fertility soils by increasing root growth, metabolic activity and absorption of nutrients. **Plant and Soil**, v. 452, p. 185-206, 2020.
- CHITHRA, S. *et al.* Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 534-540, 2014.
- COMBÈS, A. *et al.* Chemical communication between the endophytic fungus *Paraconiothyrium variabile* and the phytopathogen *Fusarium oxysporum*. 2012.
- CONRADO, R. *et al.* Overview of bioactive fungal secondary metabolites: cytotoxic and antimicrobial compounds. **Antibiotics**, v. 11, n. 11, p. 1604, 2022.

- CURSINO, L. M. *et al.* Isolation of flavonoids from *Deguelia duckeana* and their effect on cellular viability, AMPK, eEF2, eIF2 and eIF4E. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 192, 2016.
- DA SILVA, S. S. *et al.* Isolation and identification of endophytic fungi of *Passovia stelis* (Loranthaceae). **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 3, p. 1262-1270, 2020.
- DELAUX, P. M.; SCHORNACK, S. Plant evolution driven by interactions with symbiotic and pathogenic microbes. **Science**, v. 371, n. 6531, p. eaba6605, 2021.
- DING, X. *et al.* Isolation and characterization of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 1831-1838, 2013.
- DINIZ, F. V. *et al.* Cultivable endophytic fungi associated with the murumuru Amazon palm (*Astrocaryum ulei* Burret). **Scientia Vitae**, v. 12, n. 34, p. 23-32, 2021.
- DINIZ, F. V. *et al.* Isolation and identification of endophytic fungi from the Amazonian palm *Oenocarpus bataua* Mart. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 8, n. 1, p. 139-153, 2021.
- DISSANAYAKE, A. J.; CHEN, Y. Y.; LIU, J. K. Unravelling *Diaporthe* species associated with woody hosts from karst formations (Guizhou) in China. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 251, 2020.
- DO NASCIMENTO, A. M. *et al.* Antileishmanial activity of compounds produced by endophytic fungi derived from medicinal plant *Vernonia polyanthes* and their potential as source of bioactive substances. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1793-1800, 2015.
- DONG, Z. *et al.* Ergosterol ameliorates diabetic nephropathy by attenuating mesangial cell proliferation and extracellular matrix deposition via the TGF- β 1/Smad2 signaling pathway. **Nutrients**, v. 11, n. 2, p. 483, 2019.
- DOS REIS, C. M. *et al.* Antifungal and antibacterial activity of extracts produced from *Diaporthe schini*. **Journal of biotechnology**, v. 294, p. 30-37, 2019.
- DOS REIS, J. B. A.; LORENZI, A. S.; DO VALE, H. M. M. Methods used for the study of endophytic fungi: a review on methodologies and challenges, and associated tips. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 11, p. 675, 2022.
- DUTTA, D. *et al.* Endophytes: Exploitation as a Tool in Plant Protection. **Agriculture, Agribusiness and Biotechnology**, v. 57, n. 5, p. 621-629, 2014.
- ELFITA, E. *et al.* Triacylglycerols produced by biomass of endophytic fungus *Neopestalotiopsis surinamensis* from the *Scurrula atropurpurea*. **Indonesian Journal of Fundamental and Applied Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 95-100, 2020.

- EL-HAWARY, S. S. *et al.* Solamargine production by a fungal endophyte of *Solanum nigrum*. **Journal of applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 900-911, 2016.
- ERB, M.; KLIEBENSTEIN, D. J. Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. **Plant physiology**, v. 184, n. 1, p. 39-52, 2020.
- ESHBOEV, F. *et al.* Antimicrobial and Cytotoxic Activities of the Secondary Metabolites of Endophytic Fungi Isolated from the Medicinal Plant *Hyssopus officinalis*. **Antibiotics**, v. 12, n. 7, p. 1201, 2023.
- Fabaceae in Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB83028>, acessado em 14 de novembro de 2022
- FERNANDES, E. G. *et al.* Diversity of endophytic fungi in Glycine max. **Microbiological Research**, v. 181, p. 84-92, 2015.
- FERREIRA, M. C. *et al.* Antimycobacterial and antimalarial activities of endophytic fungi associated with the ancient and narrowly endemic neotropical plant *Vellozia gigantea* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, p. 692-697, 2017.
- FLORES, A. C. *et al.* Production of 3-nitropropionic acid by endophytic fungus *Phomopsis longicolla* isolated from *Trichilia elegans* A. JUSS ssp. *elegans* and evaluation of biological activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 923-932, 2013.
- FLORES-RESÉNDIZ, M. *et al.* Mitochondrial damage produced by phytotoxic chromenone and chromanone derivatives from endophytic fungus *Daldinia eschscholtzii* strain GsE13. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 10, p. 4225-4239, 2021.
- FOUDA, A. H. *et al.* Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 1, p. 95-104, 2015.
- GAJARDO, G. M.; BEARDMORE, J. A. The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical life conditions. **Frontiers in physiology**, p. 185, 2012.
- GAKUUBI, M. M. *et al.* Fungal endophytes: A promising frontier for discovery of novel bioactive compounds. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 786, 2021.
- GALINDO-SOLÍS, J. M.; FERNÁNDEZ, F. J. Endophytic fungal terpenoids: Natural role and bioactivities. **Microorganisms**, v. 10, n. 2, p. 339, 2022.
- GARCIA, A. *et al.* Antimicrobial activity of crude extracts of endophytic fungi isolated from medicinal plant *Sapindus saponaria* L. **Journal of applied pharmaceutical science**, v. 2, n. 10, p. 035-040, 2012.

- GARYALI, S.; KUMAR, A.; REDDY, M. S. Enhancement of taxol production from endophytic fungus *Fusarium redolens*. **Biotechnology and bioprocess engineering**, v. 19, p. 908-915, 2014.
- GOUDA, S. *et al.* Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. **Front. Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1538, 2016.
- GU, H. *et al.* Antimicrobial Potential of Endophytic Fungi From *Artemisia argyi* and Bioactive Metabolites From *Diaporthe* sp. AC1. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.
- GUO, L. *et al.* Diaporone A, a new antibacterial secondary metabolite from the plant endophytic fungus *Diaporthe* sp. **The Journal of Antibiotics**, v. 73, n. 2, p. 116-119, 2020.
- GUOCHANG, B. *et al.* Influence of temperature on colony growth of ectomycorrhizal fungi in pure culture. **林业科学研究**, v. 2, n. 3, p. 247-253, 2012.
- GUPTA, A. *et al.* Fungal endophytes: microfactories of Novel Bioactive Compounds with therapeutic interventions; a Comprehensive Review on the Biotechnological Developments in the field of Fungal Endophytic Biology over the last decade. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1038, 2023.
- GUPTA, S. *et al.* A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology Advances**, v. 39, p. 107462, 2020.
- HALLMANN, J. *et al.* Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.
- HAMIDI, M. R.; JOVANOVA, B.; PANOVSKA, T. K. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. **Macedonian pharmaceutical bulletin**, v. 60, n. 1, 2014.
- HAWKSWORTH, D. L.; LÜCKING, R. Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 4, p. 5.4, 2017.
- HEINIG, U.; SCHOLZ, S.; JENNEWEIN, S. Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi. **Fungal diversity**, v. 60, p. 161-170, 2013.
- HU, X. Y. *et al.* Three new sesquiterpenoids from the algal-derived fungus *Penicillium chermesinum* EN-480. **Marine Drugs**, v. 18, n. 4, p. 194, 2020.
- HUANG, J. X. *et al.* *Mucor fragilis* as a novel source of the key pharmaceutical agents podophyllotoxin and kaempferol. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 10, p. 1237-1243, 2014.
- HUSSAIN, H. *et al.* Antimicrobial constituents from endophytic fungus *Fusarium* sp. Asian Pacific. **Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 3, p. 186-189, 2015.

- HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity.**, v. 33, n. 163, p. e173, 2008.
- INÁCIO, I. A. *et al.* Characterization of cultivable endophytic fungi from the medicinal plant *Senna reticulata* (Willd.) HS Irwin & Barneby. **Revista Cereus**, v. 13, n. 2, p. 42-58, 2021.
- JALIL, M. T. M.; IBRAHIM, D. Volatile Bioactive Compounds from *Lasiodiplodia pseudotheobromae* IBRL OS-64, an Endophytic Fungus Residing in the Leaf of *Ocimum sanctum*. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 29, n. 5, p. 570-585, 2022.
- JIMOH, M. *et al.* Toxicidade e atividade antimicrobiana de *Amaranthus caudatus* L. (Amaranthaceae) colhida de solos formulados em diferentes estádios fenológicos. **Revista de Medicina Integrativa Baseada em Evidências**, v. 25, p. 2515690X20971578, 2020.
- JORDÁ, T.; PUIG, S. Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, v. 11, n. 7, p. 795, 2020.
- JOUDA, J. B. *et al.* Penialidins A–C with strong antibacterial activities from *Penicillium* sp., an endophytic fungus harboring leaves of *Garcinia nobilis*. **Fitoterapia**, v. 98, p. 209-214, 2014.
- KAANICHE, F. *et al.* Bioactive secondary metabolites from new endophytic fungus *Curvularia* sp isolated from *Rauwolfia macrophylla*. **PloS one**, v. 14, n. 6, p. e0217627, 2019.
- KAUSHIK, N. *et al.* Chemical composition of an aphid antifeedant extract from an endophytic fungus, *Trichoderma* sp. EFI671. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 420, 2020.
- KHAMENEH, B. *et al.* Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. **Microbial pathogenesis**, v. 95, p. 32-42, 2016.
- KUMARA, P. M. *et al.* Rohitukine, a chromone alkaloid and a precursor of flavopiridol, is produced by endophytic fungi isolated from *Dysoxylum binectariferum* Hook. f and *Amoora rohituka* (Roxb). Wight & Arn. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 541-546, 2014.
- LEITE, L. C. C.; FALCÃO-BÜCKER, N. C.; NUNEZ, C. V. Atividade antiangiogênica de *Deguelia duckeana* AMG Azevedo: 3, 5, 4'-trimetoxiestilbeno e 4-metoxilonchocarpina. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 7, p. 72450-72458, 2021.
- LI, G. *et al.* Endophytic *Diaporthe* sp. LG23 produces a potent antibacterial tetracyclic triterpenoid. **Journal of Natural Products**, v. 78, 2128–2132, 2015.
- LI, L. *et al.* Synergistic plant–microbe interactions between endophytic bacterial communities and the medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis* F. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 111, p. 1735-1748, 2018.

- LI, X. *et al.* Ergosterol purified from medicinal mushroom *Amauroderma rude* inhibits cancer growth in vitro and in vivo by up-regulating multiple tumor suppressors. **Oncotarget**, v. 6, n. 19, p. 17832, 2015.
- LI, X. B. *et al.* A new biphenyl derivative from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis longicolla* HL-2232. **Natural product research**, v. 31, n. 19, p. 2264-2267, 2017.
- LI, X. *et al.* *Phoma glomerata* D14: An endophytic fungus from *Salvia miltiorrhiza* that produces salvianolic acid C. **Current Microbiology**, v. 73, p. 31-37, 2016.
- LI, Z. J. *et al.* Isopentylated diphenyl ether derivatives from the fermentation products of an endophytic fungus *Phomopsis fukushii*. **The Journal of antibiotics**, v. 71, n. 3, p. 359-362, 2018.
- LIEBERMAN, T. D. *et al.* Genetic variation of a bacterial pathogen within individuals with cystic fibrosis provides a record of selective pressures. **Nature genetics**, v. 46, n. 1, p. 82-87, 2014.
- LIMA, N. M. *et al.* Chemical profile and biological activities of *Deguelia duckeana* AMG Azevedo (Fabaceae). **Natural product research**, v. 27, n. 4-5, p. 425-432, 2013.
- LIMA, N. M. *et al.* Genus *Deguelia*: chemistry, chemotaxonomy, ethnopharmacology and pharmacological characteristics—a review. **The Pharmaceutical and Chemical Journal**, v. 4, n. 5, p. 13-26, 2017.
- LIMA, N. M. *et al.* Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Deguelia duckeana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 697-702, 2018.
- LIU, P. *et al.* Bioactive secondary metabolites from endophytic strains of *Neocamarosporium betae* collected from desert plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1142212, 2023.
- LIU, Z. *et al.* Fungi: outstanding source of novel chemical scaffolds. **Journal of Asian natural products research**, v. 22, n. 2, p. 99-120, 2020.
- LIU, Z. *et al.* Dothiorelone derivatives from an endophyte *Diaporthe pseudomangiferaea* inhibit the activation of human lung fibroblasts MRC-5 cells. **Fitoterapia**, v. 127, p. 7-14, 2018.
- LÜCKING, R. L. *et al.* Fungal taxonomy and sequence-based nomenclature. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 540-548, 2021.
- LUO, M. *et al.* Endophytic *Diaporthe* Associated with *Morinda officinalis* in China. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 8, p. 806, 2022.
- MA, L. *et al.* Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 503-508, 2013.

- MA, Y. M. *et al.* A new isoquinolone alkaloid from an endophytic fungus R22 of *Nerium indicum*. **Natural product research**, v. 31, n. 8, p. 951-958, 2017.
- MANAWASINGHE, I. S. *et al.* High genetic diversity and species complexity of *Diaporthe* associated with grapevine dieback in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1936, 2019.
- MBAMBO, B.; ODHAV, B.; MOHANLALL, V. Antifungal activity of stigmasterol, sitosterol and ergosterol from *Bulbine natalensis* Baker (Asphodelaceae). **Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 38, p. 5135-5141, 2012.
- MBEKOU, M. I. K. *et al.* Antibacterial and mode of action of extracts from endophytic fungi derived from *Terminalia mantaly*, *Terminalia catappa*, and *Cananga odorata*. **Biomed Research International**, v. 2021, 2021.
- MENDES, R. *et al.* The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, 5 ed., p. 634-663, 2013.
- MIKAIL, H. G. *et al.* Secondary metabolites: The natural remedies. 2022. in VIJAYAKUMAR; Raja R. S. S. S. (eds.). Secondary Metabolites - **Trends and Reviews**, IntechOpen, London. 10.5772/intechopen.101791.
- MWANGA, Z.; MVUNGI, E.; TIBUHWA, D. Antimicrobial activities of endophytic fungi secondary metabolites from *Moringa oleifera* (Lam). **Tanzania Journal of Science**, v. 45, n. 3, p. 463-476, 2019.
- NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- NARANJO-ORTIZ, M. A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: cellular, genomic and metabolic complexity. **Biological Reviews**, v. 95, n. 5, p. 1198-1232, 2020.
- NISA, H. *et al.* Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. **Microbial pathogenesis**, v. 82, p. 50-59, 2015.
- NORILER, S. A. *et al.* Vochysiamides A and B: Two new bioactive carboxamides produced by the new species *Diaporthe vochysiae*. **Fitoterapia**, v. 138, p. 104273, 2019.
- NORPHANPHOUN, C. *et al.* *Diaporthe*: formalizing the species-group concept. **Mycosphere**, v. 13, n. 1, p. 752-819, 2022.
- NURHAIDA, N.; MURNIANA, M.; AMRINA, B. S. Isolation and screening of endophytic fungi isolated from *Annona muricata* leaves for antimicrobial activity. **Journal of Carbazon**, v. 1, n. 1, p. 27-32, 2023.
- NURUNNABI, T. R. *et al.* Antimicrobial activity of kojic acid from endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Sonneratia apetala*, a mangrove plant of the Sundarbans. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 11, n. 5, p. 350, 2018.

- OHIKHENA, F. U.; WINTOLA, O. A.; AFOLAYAN, A. J. Research article toxicity assessment of different solvent extracts of the medicinal plant, *Phragmanthera capitata* (Sprengel) Balle on Brine Shrimp (*Artemia salina*). **Int. J. Pharmacol**, v. 12, p. 701-710, 2016.
- OKUMU, Mitchel Otieno *et al.* *Artemia salina* as an animal model for the preliminary evaluation of snake venom-induced toxicity. **Toxicon**: **X**, v. 12, p. 100082, 2021.
- OLA, A. R.B. *et al.* Dihydroanthracenone metabolites from the endophytic fungus *Diaporthe melonis* isolated from *Annona squamosa*. **Tetrahedron Letters**, v. 55, n. 20, p. 3147-3150, 2014.
- OLIVEIRA, K. K. C. D. Atividade antibacteriana de recursos naturais contra *Staphylococcus aureus*. Tese de doutorado, **Programa de Pós-graduação em Biotecnologia**, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil, 2019.
- OMS, Organização Mundial da Saúde. **Novo relatório pede ação urgente para evitar crise de resistência antimicrobiana**. Disponível em <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- OMS, Organização Mundial da Saúde. **Lista de patógenos prioritários da OMS para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos**. Disponível em <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> acessado em 03 de agosto de 2021.
- ORTEGA, H. E. *et al.* Structurally uncommon secondary metabolites derived from endophytic fungi. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 7, p. 570, 2021.
- ORTIZ-OJEDA, C. P.; DE ANDRADE S. L.; PROCÓPIO R. E. L. Antifungal activity of endophytic microorganisms isolated from *Acmella ciliata*. **Genetics and Molecular Research**, v. 19 (2): gmr185702020.
- OZAWA, K. *et al.* Identification and antifungal sensitivity of two new species of *Diaporthe* isolated. **Journal of infection and chemotherapy**, v. 25, n. 2, p. 96-103, 2019.
- PADHI, L. *et al.* Endophytic fungi with great promises: a review. **Journal of Advanced Pharmacy Education & Research**, v. 3, n. 3, 2013.
- PANACCIONE, D. G.; BEAULIEU, W. T.; COOK, D. Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes. **Functional Ecology**, v. 28, n. 2, p. 299-314, 2014.
- PANG, X. J. *et al.* Emericellins A and B: Two sesquiterpenoids with an unprecedented tricyclo [4, 4, 2, 1] hendecane scaffold from the liquid cultures of endophytic fungus *Emericella* sp. XL 029. **Fitoterapia**, v. 131, p. 55-58, 2018.
- PAPHITOU, N. I. Antimicrobial resistance: Action to combat the rising microbial challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, p. S25-S28, 2013.

- PARTHASARATHY, R.; SATHIYABAMA, M. Gymnemagenin-producing endophytic fungus isolated from a medicinal plant *Gymnema sylvestre* R. Br. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 3141-3152, 2014.
- PENG, Y. *et al.* Ergosterol is the active compound of cultured mycelium *Cordyceps sinensis* on antiliver fibrosis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial ecology of leaves. **Springer New York**, 1991. p. 179-197.
- PFANNENSTIEL, B. T.; KELLER, N. P. On top of biosynthetic gene clusters: How epigenetic machinery influences secondary metabolism in fungi. **Biotechnology advances**, v. 37, n. 6, p. 107345, 2019.
- RAJABI, S. *et al.* *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, p. 1-6, 2015.
- RASHMI, M.; KUSHVEER, J. S.; SARMA, V. V. A worldwide list of endophytic fungi with notes on ecology and diversity. **Mycosphere**, v. 10, n. 1, p. 798-1079, 2019.
- REYGAERT, W.C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS microbiology**, v. 4, n. 3, p. 482, 2018.
- SANTOS, C. *et al.* Fungal endophytic community associated with guarana (*Paullinia cupana* var. *Sorbilis*): diversity driver by genotypes in the centre of origin. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 123, 2020
- SANTOYO, G. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological research**, v. 183, p. 92-99, 2016.
- SEBASTIANES, F. L. S. *et al.* 3-Hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Current microbiology**, v. 65, p. 622-632, 2012.
- SENA, I. S. *et al.* *Euterpe oleracea* Mart (Açaizeiro) from the Brazilian Amazon: A Novel Font of Fungi for Lipase Production. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2394, 2022.
- SEGARAN, G.; SATHIAVELU, M. Fungal endophytes: A potent biocontrol agent and a bioactive metabolites reservoir. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, p. 101284, 2019.
- SHARAF, M.H. *et al.* Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities and phytochemical analysis of fungal endophytes isolated from *Ocimum basilicum*. **Applied biochemistry and biotechnology**, p. 1-19, 2022.
- SHARMA, M. *et al.* Diversity, Antimicrobial, Antioxidant, and Anticancer Activity of Culturable Fungal Endophyte Communities in *Cordia dichotoma*. **Molecules**, v. 28, n. 19, p. 6926, 2023.

- SHEN, Z. *et al.* The temporal and spatial endophytic fungal community of *Huperzia serrata*: diversity and relevance to huperzine A production by the host. **BMC Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 281, 2022.
- SHI, X. S. *et al.* Trichocadinins B–G: Antimicrobial cadinane sesquiterpenes from *Trichoderma virens* QA-8, an endophytic fungus obtained from the medicinal plant *Artemisia argyi*. **Journal of natural products**, v. 82, n. 9, p. 2470-2476, 2019.
- SHI, X. S. *et al.* Isolation and Characterization of antibacterial carotane sesquiterpenes from *Artemisia argyi* associated endophytic *Trichoderma virens* QA-8. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, p. 213, 2021.
- SHUBHA, J.; SRINIVAS, C. Diversity and extracellular enzymes of endophytic fungi associated with *Cymbidium aloifolium* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 48, p. 2248-2258, 2017.
- SILVA, F. A. *et al.* Diversity of cultivable fungal endophytes in *Paullinia cupana* (Mart.) Ducke and bioactivity of their secondary metabolites. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195874, 2018.
- SINGH, R.; DUBEY, A. K. Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1767, 2018.
- SMITHEE, S. *et al.* A novel, broadly applicable approach to isolation of fungi in diverse growth media. **Journal of Microbiological Methods**, v. 105, p. 155-161, 2014.
- SOARES, D. A. *et al.* A review of bioactive compounds produced by endophytic fungi associated with medicinal plants. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi-Ciências Naturais**, v. 12, n. 3, p. 331-352, 2017.
- SONG, X. Y. *et al.* An endophytic *Diaporthe apiculatum* produces monoterpenes with inhibitory activity against phytopathogenic fungi. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 231, 2019.
- SPECIAN, V. *et al.* Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus *Diaporthe helianthi* isolated from *Luehea divaricata*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1174-1182, 2012.
- SUN, X.; GUO, L. D. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. **Mycology**, v. 3, n. 1, p. 65-76, 2012.
- PAUL, S. *et al.* Characterization of oleaginous endophytic fungi of biodiesel plants as potential biofuel minifactories. **Biomass and Bioenergy**, v. 142, p. 105750, 2020.
- POTSHANGBAM, M. *et al.* Functional characterization of endophytic fungal community associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 325, 2017.

- TANAPICHATSAKUL, C. *et al.* Antibacterial and antioxidant metabolites of *Diaporthe* spp. isolated from flowers of *Melodorum fruticosum*. **Current microbiology**, v. 75, p. 476-483, 2018.
- TANG, Z. *et al.* Diversity, chemical constituents, and biological activities of endophytic fungi isolated from *Ligusticum chuanxiong* Hort. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 771000, 2021.
- TEIMOORI-BOGHSANI, Y. *et al.* Endophytic fungi of native *Salvia abrotanoides* plants reveal high taxonomic diversity and unique profiles of secondary metabolites. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 3013, 2020.
- TRIPATHI, A. *et al.* Perspectives and potential applications of endophytic microorganisms in cultivation of medicinal and aromatic plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 2022.
- UDDIN, T. M. *et al.* Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of infection and public health**, v. 14, n. 12, p. 1750-1766, 2021.
- UKWATTA, K. M.; LAWRENCE, J. L.; WIJAYARATHNE, C. D. Antimicrobial, anti-cancer, anti-filarial and anti-inflammatory activities of Cowabenzophenone A extracted from the endophytic fungus *Aspergillus terreus* isolated from a mangrove plant *Bruguiera gymnorrhiza*. **Mycology**, v. 11, n. 4, p. 297-305, 2020.
- VIVEK-ANANTH, R. P. *et al.* MeFSAT: a curated natural product database specific to secondary metabolites of medicinal fungi. **RSC advances**, v. 11, n. 5, p. 2596-2607, 2021.
- WANG, A. *et al.* Two new anisic acid derivatives from endophytic fungus *Rhizopycnis vagum* Nitaf22 and their antibacterial activity. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 591, 2018.
- WANG, S. Y. *et al.* Taxonomy and Multigene Phylogeny of Diaporthales in Guizhou Province, China. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 12, p. 1301, 2022.
- WANG, X. J. *et al.* An endophytic sanguinarine-producing fungus from *Macleaya cordata*, *Fusarium proliferatum* BLH51. **Current microbiology**, v. 68, p. 336-341, 2014.
- WANG, W. X. *et al.* Antibacterial azaphilones from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. BS4. **Journal of natural products**, v. 79, n. 4, p. 704-710, 2016.
- WEN, J. *et al.* Endophytic fungi: an effective alternative source of plant-derived bioactive compounds for pharmacological studies. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 205, 2022.
- WHITE, J. F. *et al.* Endophytic microbes and their potential applications in crop management. **Pest Management Science**, v. 75, n. 10, p. 2558-2565, 2019.
- WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, p. 274-276, 1995.

- WU, L. S. *et al.* Endophytic fungi, host genotype, and their interaction influence the growth and production of key chemical components of *Dendrobium catenatum*. **Fungal biology**, v. 124, n. 10, p. 864-876, 2020.
- YANG, J. H. *et al.* Effect of isolation conditions on Diversity of endolichenic fungal communities from a foliose lichen, *Parmotrema tinctorum*. **Journal of Fungi**, v 7, 335. 2021.
- YANG, L. *et al.* Response of plant secondary metabolites to environmental factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018.
- YAO, Z. *et al.* Precipitation and temperature regulate species diversity, plant coverage and aboveground biomass through opposing mechanisms in large-scale grasslands. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 999636, 2022.
- YE, Bingzhu *et al.* Beneficial effects of endophytic fungi from the *Anoectochilus* and *Ludisia* species on the growth and secondary metabolism of *Anoectochilus roxburghii*. **ACS omega**, v. 5, n. 7, p. 3487-3497, 2020
- YE, H. T. *et al.* Endophytic fungi stimulate the concentration of medicinal secondary metabolites in *Houttuynia cordata* thunb. **Plant Signaling & Behavior**, v. 16, n. 9, p. 1929731, 2021.
- YE, J. X. *et al.* Evaluation of antibacterial and antibiofilm properties of kojic acid against *Aeromonas sobria* and *Staphylococcus saprophyticus*. **Journal of Food Quality**, v. 2023, 2023.
- YEDUKONDALU, N. *et al.* Diapolic acid A–B from an endophytic fungus, *Diaporthe terebinthifolii* depicting antimicrobial and cytotoxic activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 2, p. 212-215, 2017.
- YUAN, L. *et al.* Isolation of Xanthones from the Fermentation Products of the Endophytic Fungus of *Phomopsis amygdali*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, p. 460-463, 2015.
- ZHANG, W. *et al.* Phomopsidone A, a novel depsidone metabolite from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. A123. **Fitoterapia**, v. 96, p. 146-151, 2014.
- ZHANG, J.; ZHU, Y.; SI, J.; WU, L. Metabolites of medicine food homology-derived endophytic fungi and their activities. **Current Research in Food Science**, 2022.
- ZHAO, T. *et al.* Three new α -pyrone derivatives from the plant endophytic fungus *Penicillium ochrochloronthe* and their antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 21, n. 9, p. 851-858, 2019.