



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**KATHIANE REBOUCAS DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS**  
**DE *Vismia japurensis* (HYPERICACEAE)**

**MANAUS**

**2025**

KATHIANE REBOUCAS DE SOUZA

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS  
DE *Vismia japurensis* (HYPERICACEAE)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Cecilia Veronica Nunez

**MANAUS**

**2025**

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

---

S729a Souza, Kathiane Reboucas de  
Avaliação química e biológica de fungos endofíticos isolados de *Vismia japurensis* (Hypericaceae) / Kathiane Reboucas de Souza. - 2025.  
97 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Cecilia Veronica Nunez.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2025.

1. Fungos endofíticos . 2. Alcaloides . 3. *Diaporthe* sp.. 4. Prolina betaina. 5. Glicina betaina. I. Nunez, Cecilia Veronica. II. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título

---

**KATHIANE REBOUCAS DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS  
DE *Vismia japurensis* (HYPERICACEAE)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Aprovada em 18/06/2025**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof.(a) Dr.(a) Cecilia Veronica Nunez (Presidente)**  
**Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)**

---

**Prof.(a) Dr.(a) Patricia Melchionna Albuquerque (Membro)**  
**Universidade do Estado do Amazonas (UEA)**

---

**Prof.(a) Dr.(a) Jaine Honorata Hortalan Luiz (Membro)**  
**Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, o Autor e Consumador da minha fé, sem Ele nada do que ocorre nos céus e na terra seriam possíveis, através dEle tive forças para perseverar em meio as dificuldades e superar os desafios nesse ciclo da minha vida. Toda Honra e Glória Sejam dadas à Jesus Cristo, o Filho do Deus Vivo.

À minha mãe Lindalva que lutou bravamente para que eu tivesse uma educação de qualidade e todo o auxílio que precisei, sou muito grata à Deus por sua vida.

Ao meu pai Edson (*in memoriam*), o qual eu creio pela fé em Jesus Cristo que está nos braços do Pai. Agradeço por todos os momentos, pelo seu empenho e amor por mim.

Ao meu esposo Ivan que foi o meu apoio do início ao fim desse ciclo, sempre me incentivando com amor e carinho, encorajando-me a persistir e fazer o meu melhor, louvo ao Senhor Jesus por sua vida, ele é um verdadeiro companheiro, sempre presente e sempre cuidando de mim.

Aos meus sogros Izete e Nazareno, que me acolhem todos os dias como filha e cuidam muito bem de mim, de maneira que pude levar o mestrado de forma mais leve.

Ao meu irmão mais velho Elzo, um exemplo para mim de pessoa, meu amigo, parceiro de conversas sobre videogame, que me ensinou tantas coisas, cuidou de mim, sempre me incentivando.

Ao meu Vô Jurandir, um senhor idoso que em seus 92 anos esbanja carisma e jovialidade, cuidou de mim desde bebê, a quem amo e sou eternamente grata.

À minha orientadora, Dra. Cecilia Veronica Nunez, pela oportunidade de realizar o meu mestrado em seu laboratório, por todos os ensinamentos e toda contribuição, aprendi muito.

À minha amiga Kalynne, amiga desde 2019, me ajudou desde o processo seletivo do mestrado, além de ser alguém muito especial que compartilhei vários momentos importantes.

À minha amiga Karyne, minha super parceira de mestrado, todo nosso trabalho foi juntas, ajudando e apoiando uma à outra, sou muito grata pela sua amizade, este trabalho tem suas mãos também.

Aos meus amigos de laboratório Andrei, Weison e David por todos os ensinamentos e momentos divertidos no laboratório, muito obrigada por todo o acolhimento e por serem pessoas tão legais.

Aos técnicos da CA-LTQPN (Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais), me ajudaram muito nas etapas finais do meu projeto de mestrado.

À Universidade do Federal do Amazonas e ao PPGBiotech pela oportunidade de realização do Mestrado em Biotecnologia.

Ao INPA pelo espaço físico de trabalho e por possibilitar a realização da minha pesquisa em um lugar que almejava a muito tempo estudar e fazer pesquisa.

À FAPEAM pela concessão da bolsa, o que tornou possível a realização deste trabalho.

À todos que de alguma forma contribuíram para que este momento fosse alcançado.

*“Aquele que é a Palavra estava no mundo, e o mundo foi feito por intermédio dele, mas o mundo não o reconheceu. Veio para o que era seu, mas os seus não o receberam. Contudo, aos que o receberam, aos que creem no seu nome, deu-lhes o direito de se tornarem filhos de Deus, os quais não nasceram do sangue, nem pela vontade da carne, nem pela vontade de homem algum, mas nasceram de Deus”.*

*(João 1:10-13 - Bíblia Sagrada – Versão NVI)*

## RESUMO

Os fungos endofíticos são conhecidos por habitarem as partes aéreas e subterrâneas das plantas sem lhes causar danos aparentes. Estes microrganismos vem sendo alvo de estudos e tem demonstrado serem promissores quanto à produção de substâncias bioativas, dado ao fato de apresentarem a capacidade em produzir metabólitos secundários com atividades variadas, tal qual a sua planta hospedeira. Nesse sentido, a família Hypericaceae possui espécies que são produtoras de substâncias biologicamente ativas, como a espécie *Vismia japurensis*, que em estudos químicos e biológicos demonstrou a capacidade de produzir substâncias com atividades antimicrobiana, antioxidante, tóxica, antimalárica, dentre outras. Essa espécie, assim como outros representantes de Hypericaceae, carecem de estudos quanto aos seus fungos endofíticos associados. Portanto, este trabalho teve por objetivo avaliar química e biologicamente os fungos endofíticos de *V. japurensis*. Inicialmente, foram coletadas folhas sadias de *V. japurensis* no mini campus da UFAM e a partir de processos de desinfestação foram isolados 19 fungos dessa espécie, sendo 14 cultivados em meio líquido Sabouraud (SB) e obtidos os extratos metanólicos dos micélios. Os extratos foram analisados por CCDC, resultando na inferência das classes de metabólitos secundários. No ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*, o extrato VJ 15 ocasionou mortalidade de 66% (1000 µg/mL) e 33% (500 µg/mL), sendo considerado tóxico e moderadamente tóxico, respectivamente. No ensaio antibacteriano, o extrato VJ 15 apresentou boa atividade inibindo em 69% (1000 µg/mL) a cepa de *Staphylococcus aureus*. Os extratos VJ 10 e VJ 12 apresentaram atividade moderada inibindo em 51% e 58%, respectivamente, a cepa de *Morganella morganii*. Através dos resultados das análises por CCDC e ensaios biológicos, o extrato VJ 15 foi selecionado para identificação da espécie e cultivo em escala ampliada (5 L) nas mesmas condições de cultivo da menor escala. O micélio de VJ 15 foi submetido a identificação por ferramentas moleculares sendo identificado em nível de gênero, como *Diaporthe* sp. O extrato de VJ 15 foi submetido à partição obtendo-se duas fases (acetato de etila e hidrometanólica). A fase acetato de etila teve destaque na análise por CCDC, revelando para todos os reveladores utilizados. No ensaio de toxicidade ambas as fases de *Diaporthe* sp. não apresentaram atividade tóxica, todavia podendo serem utilizadas em outros testes biológicos. Na atividade antibacteriana, estas também não apresentaram atividade de inibição frente à *S. aureus*. Tais resultados sugerem efeito antagônico quanto a sinergia dos metabólitos secundários nos extratos quando submetidos à partição. A fase acetato de etila foi selecionada para fracionamento em coluna cromatográfica utilizando-se as fases estacionárias alumina neutra e sílica gel 60. A partir do fracionamento da fração F27-28 (F14-16) em sílica gel 60, utilizando o método de Ressonância Magnética Nuclear, foi possível isolar em mistura dois alcaloides: prolina betaína (**1**) e glicina betaína (**2**). Sendo assim, este trabalho demonstra a importância do estudo dos fungos endofíticos de *V. japurensis*, os quais podem ser produtores de substâncias com esqueletos diversos da planta mãe a partir da qual foram obtidos.

**Palavras-chaves:** Fungos Endofíticos, Alcaloides, *Diaporthe* sp., prolina betaína, glicina betaína, RMN, Ensaio de Toxicidade, Ensaio Antibacteriano.

## ABSTRACT

Endophytic fungi are known to inhabit the aerial and underground parts of plants without causing any apparent damage. These microorganisms have been the subject of studies and have shown promise in the production of bioactive substances, given that they can produce secondary metabolites with varied activities, just like their host plant. In this sense, the Hypericaceae family has species that produce biologically active substances, such as the species *Vismia japurensis*, which in chemical and biological studies demonstrated the ability to produce substances with antimicrobial, antioxidant, toxic, antimalarial activities, among others. This species, as well as other representatives of Hypericaceae, lack studies regarding their endophytic fungi. Therefore, this study aimed to evaluate the chemical and biological characteristics of the endophytic fungi of *V. japurensis*. Initially, healthy leaves of *V. japurensis* were collected at UFAM mini campus and, through disinfection processes, 19 fungi of this species were isolated, 14 of which were cultivated in Sabouraud (SB) liquid medium and methanolic extracts of the mycelia were obtained. The extracts were analyzed by TLC, resulting in the inference of secondary metabolite classes. In the toxicity test against *Artemia salina*, extract VJ15 caused mortalities of 66% (1000 µg/mL) and 33% (500 µg/mL), being considered toxic and moderately toxic, respectively. In the antibacterial test, extract VJ15 showed good activity, inhibiting the *Staphylococcus aureus* strain by 69% (1000 µg/mL). Extracts VJ10 and VJ12 showed moderate activity, inhibiting the *Morganella morganii* strain by 51% and 58%, respectively. Through the results of the analyses by CCDC and biological tests, extract VJ15 was selected for species identification and cultivation on a larger scale (5L) under the same cultivation conditions as the smaller scale. The mycelium of VJ15 was subjected to identification by molecular tools and identified at the genus level as *Diaporthe* sp. The extract of VJ15 was partitioned to obtain two phases (ethyl acetate and hydromethanol). The acetate phase stood out in the analysis by CCDC, revealing all the used developers. In the toxicity test, neither phase of *Diaporthe* sp. presented toxic activity, however, they can be used in other bioassays. In the antibacterial activity, they also did not present inhibitory activity against *S. aureus*. These results suggest an antagonistic effect regarding the synergy of the secondary metabolites in the extracts when subjected to partition. The acetate phase was chosen for fractionation in a chromatographic column utilizing neutral alumina and silica gel 60 as the stationary phases. From the fractionation of the fraction F27-28 (F14-16) in silica gel 60, using the Nuclear Magnetic Resonance method, it was possible to isolate two alkaloids in a mixture: proline betaine (**1**) and glycine betaine (**2**). Therefore, this work demonstrates the importance of studying the endophytic fungi of *V. japurensis*, which may be producers of substances with skeletons different from the mother plant from which they were obtained.

**Keywords:** Endophytic Fungi, Alkaloids, *Diaporthe* sp., proline betaine, glycine betaine, NMR, toxic activity, Antibacterial Assay.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt – acetato de etila  
BDA – Batata dextrose ágar  
BOD – *Biochemical Oxygen Demand*  
CCA – cromatografia em coluna aberta  
CCDC – cromatografia em camada delgada comparativa  
CD<sub>3</sub>OD – metanol deuterado  
CIM – concentração inibitória mínima  
CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*  
cm – centímetro  
COSY – *Correlation Spectroscopy*  
Ø – Diâmetro  
DCM – diclorometano  
FeCl<sub>3</sub> – cloreto férrico  
*h* – Altura  
HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*  
HSQC – *Heteronuclear Single-Quantum Coherence*  
DMSO – dimetilsulfóxido  
DMSO-*d*<sub>6</sub> – dimetilsulfóxido deuterado  
g – grama  
INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
MeOH – metanol  
mg – miligrama  
nm – nanômetro  
ppm – partes por milhão  
RMN – ressonância magnética nuclear  
SiO<sub>2</sub> – sílica  
UV – ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Alexander Fleming e a penicilina .....	19
<b>Figura 2.</b> Espécies produtoras de taxol® .....	20
<b>Figura 3.</b> Distribuição mundial da família Hypericaceae .....	27
<b>Figura 4.</b> Distribuição regional do gênero <i>Vismia</i> no Brasil e a espécie <i>Vismia japurensis</i> ...	27
<b>Figura 5.</b> Substâncias produzidas por <i>Vismia japurensis</i> .....	29
<b>Figura 6.</b> <i>Artemia salina</i> .....	31
<b>Figura 7.</b> Substâncias com atividade antibacteriana isoladas de fungos endofíticos .....	35
<b>Figura 8.</b> Área da coleta.....	37
<b>Figura 9.</b> <i>Vismia japurensis</i> na área de coleta .....	37
<b>Figura 10.</b> Exsicata depositada no herbário do INPA .....	38
<b>Figura 11.</b> Folhas da espécie <i>V. japurensis</i> coletadas para desinfecção.....	39
<b>Figura 12.</b> Processo de desinfecção das folhas da espécie <i>V. japurensis</i> por imersão em agentes desinfectantes.....	39
<b>Figura 13.</b> Demonstração do processo de isolamento dos endofíticos de <i>V. japurensis</i> .....	40
<b>Figura 14.</b> Etapas para obtenção dos extratos metanólicos dos fungos de <i>V. japurensis</i> .....	42
<b>Figura 15.</b> Preparo do ensaio de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> .....	44
<b>Figura 16.</b> Esquema do cultivo em escala ampliada do fungo <i>Diaporthe</i> sp. ....	47
<b>Figura 17.</b> Esquema da partição líquido-líquido e obtenção das fases AcOEt e H <sub>2</sub> O+MeOH	48
<b>Figura 18.</b> Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH do micélio de <i>Diaporthe</i> sp. ....	52
<b>Figura 19.</b> Cromatoplasmas dos extratos fúngicos de <i>V. japurensis</i> .....	60
<b>Figura 20.</b> Espectro de <sup>1</sup> H do extrato MeOH do micélio de VJ 15 ( <i>Diaporthe</i> sp.) cultivado em escala ampliada.....	63
<b>Figura 21.</b> Cromatoplasmas das fases AcOEt e hidrometanólica do extrato MeOH do micélio de <i>Diaporthe</i> sp. ....	65
<b>Figura 22.</b> Estrutura das substâncias (1) e (2) .....	65
<b>Figura 23.</b> Cromatoplasma de CCDC da F27-28 revelada em reagente de Dragendorff. Sistema: DCM/MeOH 2:8.....	66
<b>Figura 24.</b> Principais correlações de HMBC da substância (1).....	67
<b>Figura 25.</b> Correlações de HMBC da substância (2).....	68
<b>Figura 26.</b> Espectro de <sup>1</sup> H da mistura das substâncias (1) e (2) (solvente DMSO <sub>d6</sub> – padrão DMSO – 600 MHz) (3,00-1,65 ppm).....	69
<b>Figura 27.</b> Espectro de <sup>1</sup> H da mistura das substâncias (1) e (2) (solvente DMSO <sub>d6</sub> – padrão DMSO – 600 MHz) (3,90-2,50 ppm).....	70
<b>Figura 28.</b> Espectro de <sup>13</sup> C da mistura das substâncias (1) e (2) (solvente DMSO <sub>d6</sub> – padrão DMSO – 150 MHz).....	71
<b>Figura 29.</b> Mapa de correlação HMBC das substâncias (1) e (2).....	72
<b>Figura 30.</b> Mapa de correlação HSQC das substâncias (1) e (2).....	73
<b>Figura 31.</b> Mapa de correlação COSY da substância (1) .....	74

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Eluentes utilizados no fracionamento da fase AcOEt de <i>Diaporthe</i> sp.....	49
<b>Tabela 2.</b> Frações reunidas a partir do fracionamento da fase AcOEt de <i>Diaporthe</i> sp.....	49
<b>Tabela 3.</b> Eluentes utilizados no fracionamento da fase AcOEt-F7-9.....	50
<b>Tabela 4.</b> Frações reunidas a partir do fracionamento da FAcOEt-F7-9.....	50
<b>Tabela 5.</b> Eluentes utilizados no fracionamento da fase AcOEt-F27-28.....	51
<b>Tabela 6.</b> Frações reunidas a partir do fracionamento da FAcOEt-F27-28.....	51
<b>Tabela 7.</b> Características macroscópicas dos fungos endofíticos isolados de <i>Vismia japurensis</i> .....	53
<b>Tabela 8.</b> Valores das massas miceliais, extratos e rendimentos dos fungos endofíticos de <i>V. japurensis</i> .....	57
<b>Tabela 9.</b> Valores das massas miceliais, extrato e rendimento do fungo <i>Diaporthe</i> sp. em escala ampliada.....	58
<b>Tabela 10.</b> Classes de substâncias reveladas/grupos funcionais por CCDC dos extratos MeOH dos fungos endofíticos de <i>V. japurensis</i> .....	61
<b>Tabela 11.</b> Dados de RMN de <sup>13</sup> C e <sup>1</sup> H das substâncias prolina betaína ( <b>1</b> ) em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz) comparados com os dados de CHAMBERS e KUNIN (1987) realizado em metanol deuterado (CD <sub>3</sub> OD, 500 MHz) e glicina betaína ( <b>2</b> ) (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 600 MHz), comparada em água deuterada (D <sub>2</sub> O, 500 MHz) (TAKIS et al., 2015).....	68
<b>Tabela 12.</b> % de mortalidade de <i>A. salina</i> submetida aos extratos fúngicos de <i>V. japurensis</i>	77
<b>Tabela 13.</b> Classificação da toxicidade de extratos de acordo com a mortalidade de larvas de <i>A. salina</i> .....	77
<b>Tabela 14.</b> Dados da atividade antibacteriana em porcentagem de inibição dos extratos metanólicos dos fungos endofíticos de <i>V. japurensis</i> frente a bactérias patogênicas.....	80
<b>Tabela 15.</b> porcentagem de mortalidade de <i>A. salina</i> submetida ao extrato metanólico escala ampliada e fases AcOEt e hidrometanólica do fungo VJ 15 .....	82
<b>Tabela 16.</b> Atividade antibacteriana do extrato escala ampliada e da fase AcOEt de <i>Diaporthe</i> sp.....	83

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Exemplos de substâncias com atividades química e biológicas produzidas por fungos endofíticos.....	21
<b>Quadro 2.</b> Algumas substâncias bioativas isoladas do gênero <i>Diaporthe</i> .....	25
<b>Quadro 3.</b> Algumas classes de substâncias produzidas pelo gênero <i>Vismia</i> .....	28
<b>Quadro 4.</b> Principais cepas bacterianas causadoras de patologias em humanos e outros organismos.....	32
<b>Quadro 5.</b> Identificação das cepas utilizadas no ensaio antibacteriano.....	45

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
2.1. Fungos endofíticos .....	18
2.2. Metabólitos secundários de fungos endofíticos .....	19
2.3. O gênero <i>Diaporthe</i> .....	23
2.4. <i>Vismia japurensis</i> Reichardt.....	26
2.5. Atividades Biológicas .....	30
2.5.1. Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> Leach. ....	30
2.5.2. Atividade antibacteriana e a resistência a antibióticos .....	31
3. OBJETIVOS .....	36
3.1. Objetivo geral.....	36
3.2. Objetivos específicos.....	36
4. METODOLOGIA .....	37
4.1. Coleta do material vegetal .....	37
4.2. Desinfecção do material vegetal e isolamento dos fungos endofíticos .....	38
4.3. Purificação e preservação dos fungos endofíticos .....	40
4.4. Preparo e obtenção dos extratos fúngicos.....	41
4.5. Cálculo do rendimento dos extratos fúngicos .....	42
4.6. Análise cromatográfica dos extratos fúngicos .....	43
4.7. Ensaio de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> Leach.....	43
4.8. Ensaio antibacteriano .....	44
4.9. Seleção e identificação dos fungos endofíticos isolados de <i>V. japurensis</i> .....	46
4.9.1. Cultivo submerso e obtenção de extrato em escala ampliada do fungo <i>Diaporthe</i> sp.....	47
4.10. Obtenção da fase acetato de etila do extrato metanólico em escala ampliada de <i>Diaporthe</i> sp. 48	
4.11. Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt obtida do extrato em escala ampliada de <i>Diaporthe</i> sp. ....	49
4.11.1. Fracionamento cromatográfico de fAcOEt-F7-9.....	50
4.11.2. Fracionamento cromatográfico de fAcOEt-F27-28.....	51
4.12. Identificação das substâncias isoladas do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH do micélio de <i>Diaporthe</i> sp.....	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1. Isolamento dos fungos endofíticos e taxa de colonização.....	53
5.2. Rendimento dos extratos fúngicos.....	56
5.3. Identificação do fungo VJ 15 por ferramentas moleculares.....	58
5.4. Rendimento do extrato MeOH de <i>Diaporthe</i> sp. em cultivo em escala ampliada.....	58

5.5. Prospecção química.....	59
5.5.1. Análises dos extratos metanólicos fúngicos por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).....	59
5.5.2. Análise por RMN de <sup>1</sup> H do extrato MeOH de <i>Diaporthe</i> sp. cultivado em escala ampliada.....	62
5.5.3. Análise cromatográfica da fase AcOEt e fase hidrometanólica de <i>Diaporthe</i> sp. ....	64
5.5.4. Identificação das substâncias isoladas .....	65
5.5.4.1. Substância 1: prolina betaína .....	66
5.5.4.2. Substância 2: glicina betaína.....	67
5.5. Ensaio biológicos.....	76
5.5.5. Ensaio de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach. ....	76
5.5.6. Ensaio antibacteriano dos extratos metanólicos dos fungos endofíticos de <i>V. japorensis</i> ...	79
5.5.7. Análise de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> do extrato escala ampliada e fase AcOEt e hidrometanólica.....	82
5.5.8. Ensaio Antibacteriano do extrato escala ampliada e fase AcOEt.....	83
6. CONCLUSÃO .....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos estão entre os seres mais remotos e versáteis na natureza, visto a sua capacidade em habitar variados ambientes, além de desempenharem funções ecológicas importantes a partir de processos como fixação de nitrogênio no solo, degradação de matéria orgânica e capacidade de associar-se de forma mutualística a outros seres vivos, como as plantas (PETRINI, 1991). Além disso, os microrganismos contribuem para o bem-estar dos seres humanos desde as civilizações antigas, como a exemplo dos povos egípcios que utilizavam as leveduras, de forma empírica, para fabricação de bebidas e alimentos fermentados, estabelecendo estes seres como base para fabricação de produtos alimentícios (NARANJO-ORTIZ e GABALDÓN, 2019; MAPOOK et al., 2022).

Com o avanço nos estudos da microbiologia e química, evidenciou-se que os microrganismos, principalmente os fungos, são capazes de produzir uma vasta gama de moléculas com variadas atividades biológicas, conhecidas como metabólitos secundários (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). Os fungos endofíticos, são denominados como microrganismos capazes de habitar os tecidos internos das plantas sem lhes causar danos imediatos (BACON e WHITE, 2016). Estes microrganismos, são considerados uma alternativa viável para a produção de metabólitos secundários, tendo em vista a interação mutualística que possuem com sua planta hospedeira, conferindo a capacidade de produzir substâncias similares às da espécie vegetal associada. Esses fatores, relacionados as vantagens quanto ao cultivo microbiano, seu manejo simplificado em ambientes e condições controladas, bem como o fato de possuírem certa vantagem frente as plantas com relação ao tempo de cultivo, sazonalidade e menores impactos ambientais gerados, fazem dos fungos endofíticos potenciais produtores de metabólitos bioativos (KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012).

As espécies da família Hypericaceae dispõem de estudos fitoquímicos que evidenciam seu potencial como produtoras de metabólitos secundários bioativos. Dentre os diversos representantes desta família, está a espécie *Vismia japurensis*, conhecida por produzir principalmente substâncias pertencentes às classes dos terpenos e quinonas, considerados marcadores químicos do gênero *Vismia*, além de outras classes como esteroides, flavonoides, xantonas, lignanas etc. (DIEL et al., 2021). Em estudos recentes, as substâncias isoladas a partir de *V. japurensis*, demonstraram atividades química e biológicas como antibacteriana, antimalárica, de toxicidade e antioxidante (PEDROZA, 2019; OSÓRIO, 2019).

Estudos relacionados aos fungos endofíticos do gênero *Vismia* são escassos na literatura, e quanto a espécie *Vismia japurensis* são inexistentes até o momento. Devido a essas circunstâncias, faz-se necessária a investigação da microbiota fúngica, bem como a química desses microrganismos, que por possuírem capacidade de produção de substâncias similares a da sua planta hospedeira tornam-se alternativas viáveis à Biotecnologia, no que tange a produção de moléculas de origem natural e com aplicações para os diversos setores industriais. (DEVI et al., 2023).

Sendo assim, considerando o potencial dos fungos na produção de substâncias bioativas, assim como sua planta hospedeira e devido à escassez de estudos a respeito da microbiota fúngica de espécies do gênero *Vismia*, este trabalho consiste em investigar através do estudo químico e biológico os fungos endofíticos de *V. japurensis*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Fungos endofíticos

Os fungos endofíticos são conhecidos como microrganismos capazes de habitar os tecidos das plantas sem lhes causar danos aparentes. Estes seres vivem no vegetal por pelo menos parte do seu ciclo de vida sem manifestar visivelmente doenças. A relação entre microrganismo endófito e a planta hospedeira configura-se como uma associação de custo-benefício para ambos, sendo estabelecida dentro dos tecidos vivos do hospedeiro (PETRINI, 1991).

No contexto histórico, o termo “endófito” foi estabelecido primeiramente pelo fitopatologista De Bary (1866), definindo-os como “todo o organismo presente no interior das plantas”. Com o progresso dos estudos a respeito dos endófitos, este conceito foi sofrendo certas modificações, todavia, entre as diversas definições de microrganismos endofíticos a mais aceita é a proposta por Bacon e White (2016) que definem os fungos endofíticos como “microrganismos que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar prejuízos imediatos à planta hospedeira”.

Ao analisar as definições de endófitos, fica nítida a existência de uma relação entre o microrganismo endofítico e a sua planta hospedeira, entretanto, apesar do funcionamento dessa relação ainda não ser esclarecida com detalhes, sabe-se que esta pode ocorrer de duas formas, através dos mecanismos de transmissão vertical e transmissão horizontal. A transmissão vertical, consiste na transferência dos fungos endofíticos das plantas maternas para as sementes da prole no decorrer da germinação das sementes, em condições apropriadas e sendo o principal mecanismo pelo qual a prole é infectada (SHAHZAD et al., 2018). Em contrapartida, a transmissão horizontal caracteriza-se pela transferência dos fungos endofíticos entre diferentes plantas hospedeiras, podendo esta transferência ser através dos esporos, fragmentações das hifas, por agentes bióticos como exemplo, insetos e outros animais e por agentes abióticos, como chuva, ventos, solo etc. (YAN et al., 2019).

Estes mecanismos estão intimamente relacionados à produção de metabólitos secundários, tendo em vista que nesta relação, o fungo endofítico pode produzir, por exemplo, substâncias que auxiliam no combate do estresse biótico e abiótico causado nas plantas hospedeiras (EID et al., 2019; GUPTA et al., 2020). Outro fator relacionado é a transmissão dos endófitos em diferentes plantas, que pode favorecer a geração de metabólitos secundários

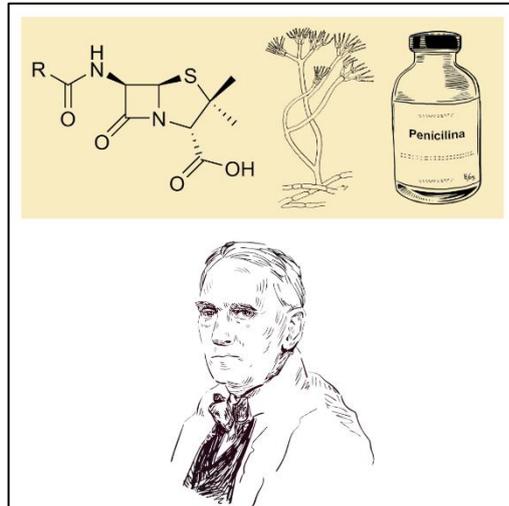
diversificados. Neste contexto, os metabólitos oriundos da relação endófito-hospedeiro podem ser considerados de grande valor para a biotecnologia, já que a partir deste processo, assim como a planta, o fungo endofítico pode produzir diferentes substâncias e contendo variadas bioatividades (ANCHEEVA; DALETOS; PROKSCH, 2020).

## 2.2. Metabólitos secundários de fungos endofíticos

Os metabólitos secundários são conhecidos como moléculas de baixo peso molecular responsáveis por diversas atividades biológicas, originadas de fontes naturais, como as plantas, fungos e bactérias. Estes metabólitos não são considerados essenciais para a vida dos seres que os produzem, no entanto, são fundamentais para a produção de substâncias com bioatividades importantes para sua adaptação ambiental, auxiliando em processos como atração de polinizadores, defesa contra herbívoros e fitopatógenos (DEVI et al., 2020). Assim como as plantas, os fungos endofíticos são responsáveis pela produção de metabólitos secundários com atividades biológicas importantes, englobando grande parte das classes de substâncias existentes. Algumas dessas classes compreendem os terpenos, alcaloides, esteroides, quinonas, policetídeos, substâncias fenólicas, cumarinas etc. (KELLER; TURNER; BENNETT, 2005).

Historicamente, o primeiro relato marcante a respeito da produção de metabólitos secundários fúngicos refere-se a penicilina, atualmente um fármaco amplamente utilizado no tratamento de infecções bacterianas. Esta substância foi acidentalmente isolada a partir do fungo *Penicillium notatum* por Alexander Fleming, em 1928 (HUTCHINGS; TRUMAN; WILKINSON, 2019).

**Figura 1.** Alexander Fleming e a penicilina



Fonte: Adaptado de Natata, (2024).

Esta descoberta foi um marco para a Ciência, demonstrando a capacidade de fungos na produção de substâncias com utilidades farmacológicas, possibilitando assim, a incorporação de substâncias sintetizadas por fungos em setores industriais.

Outro relato importante a respeito de metabólitos secundários de fungos endofíticos é a substância paclitaxel, conhecida comercialmente como taxol®, um potente anticancerígeno. Essa substância foi identificada pela primeira vez a partir da planta *Taxus brevifolia*, sendo altamente eficaz no tratamento de câncer de mama e útero. Todavia, para produção desse medicamento são necessárias grandes quantidades da espécie vegetal que a produz, tornando-se difícil a produção em larga escala (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Nesse sentido, os fungos endofíticos, conhecidos por sua capacidade em produzir substâncias similares a sua planta hospedeira são uma ótima alternativa.

Através do estudo de Stierle e Strobel (1993), foi descoberto que um fungo endofítico de *T. brevifolia* conhecido como *Taxomyces andreanae*, era capaz de produzir a mesma substância que sua hospedeira. Porém, apesar do sucesso na produção do taxol por um endófito, vale ressaltar que é necessário, dentro do contexto de produção em escala ampliada, de definir condições ideais para otimizar a produção de substâncias como paclitaxel, que possuem grande potencial farmacológico (STANIEK; WOERDENBAG; KAYSER, 2009).

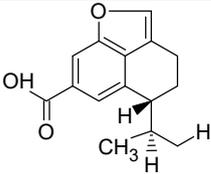
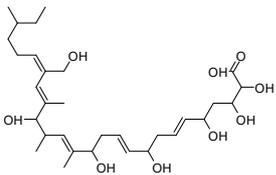
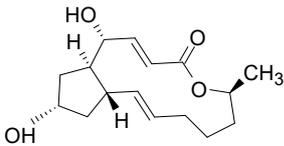
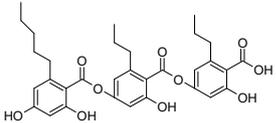
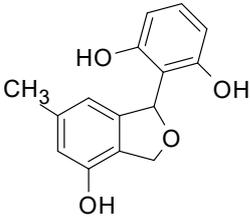
**Figura 2.** Espécies produtoras de taxol®

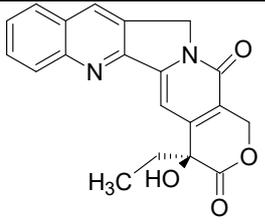
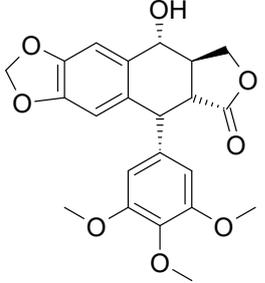
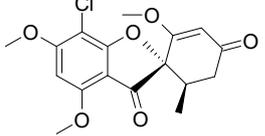
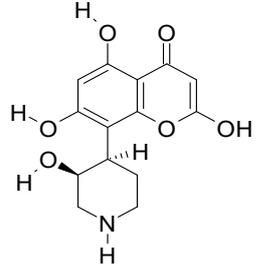
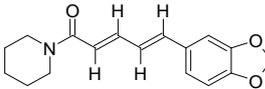
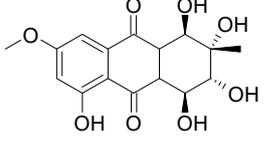


Fonte: Adaptado de Gary Strobel 2002 e Spinops, 2022.

Além da produção de substâncias anticancerígenas, os fungos endofíticos também são relatados como produtores de substâncias antimicrobianas, antifúngicas, citotóxicas, antivirais, antioxidantes e dentre outras. Algumas dessas substâncias estão descritas no Quadro 1.

**Quadro 1.** Exemplos de substâncias com atividades química e biológicas produzidas por fungos endofíticos

Substância	Atividade	Fungo endofítico	Planta hospedeira	Referência
 <p>trichocadinina B</p>	Antimicrobiana	<i>Trichoderma virens</i>	<i>Artemisia argyi</i>	SHI et al., 2019
 <p>ácido artrínico</p>	Antifúngica	<i>Arthrinium phaeospermum</i>	<i>Passiflora edulis</i>	BLOOR, 2008
 <p>brefeldina A</p>	Citotóxica	Fungo KLAR 5	<i>Knema laurina</i>	CHINWOR RUNGSEE et al., 2008
 <p>ácido citônico A</p>	Antiviral	<i>Cytonaema</i> sp.	<i>Quercus</i> sp.	GUO et al., 2000
 <p>isopestacina</p>	Antioxidante	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Terminalia morobensis</i>	STROBEL et al., 2002

 <p>camptotecina</p>	<p>Inibidora de enzima topoisomerase</p> <p>Ativa contra linhagens de células cancerígenas MCF-7 e UO-31</p>	<p><i>Aspergillus terreus</i></p>	<p><i>Catharanthus roseus</i></p>	<p>EL-SAYED et al., 2024</p>
 <p>podofiloxina</p>	<p>Ativa contra linhagens de células cancerígenas LU-1 e HepG2</p>	<p><i>Fusarium proliferatum</i></p>	<p><i>Dyosma versipellis</i></p>	<p>NGUYEN et al., 2023</p>
 <p>griseofulvina</p>	<p>Atividade antifúngica frente à <i>Colletotrichum truncatum</i> <i>Microsporium gypseum</i> <i>Trichophyton mentagrophyte</i></p>	<p><i>Nigrospora</i> sp.</p>	<p><i>Kandelia candel</i></p>	<p>ZOU et al., 2023</p>
 <p>rohitukina</p>	<p>Citotóxica contra linhagens celulares HCT-116 e MCF-7</p>	<p><i>Fusarium proliferatum</i></p>	<p><i>Dysoxylum binectariferum</i></p>	<p>MOHANA KUMARA et al., 2012</p>
 <p>piperina</p>	<p>Antimicobacteriana frente à <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e <i>M. smegmetis</i></p>	<p><i>Periconia</i> sp.</p>	<p><i>Piper longum</i></p>	<p>VERMA et al., 2011</p>
 <p>altersolanol</p>	<p>Antiangionênica utilizando células endoteliais da veia umbilical humana modelo <i>in vitro</i></p>	<p><i>Alternaria</i> sp.</p>	<p><i>Erythrina variegata</i></p>	<p>POMPENG et al., 2013</p>

Com isso, é possível observar que os fungos endofíticos possuem capacidade para produzir metabólitos de grande valor para a medicina em geral, podendo estes virem a se tornar produtos comercializáveis de origem natural. Contudo, no processo inicial de pesquisa, que consiste na bioprospecção biológica e química desses microrganismos, torna-se indispensável o conhecimento e aprofundamento acerca do gênero ou espécie do endófito, assim como a busca por relatos na literatura a respeito da sua planta hospedeira, principalmente como via de comparação quanto as substâncias que o fungo possa vir a produzir, fornecendo assim informações de interesse, tendo em vista a dinâmica da relação endófito-hospedeiro.

### 2.3. O gênero *Diaporthe*

O gênero *Diaporthe* foi estabelecido por Nitschke em 1870 e pertence à família Diaporthaceae, ordem Diaporthales e classe Sordariomycetes. Caracteriza-se por fungos pleomórficos, possuindo fase telemórfica (reprodução sexuada) e fase anamórfica denominada de *Phomopsis*. Compreende fungos geralmente isolados a partir de hospedeiros vegetais, os quais podem ser encontrados em várias partes do mundo. Esse gênero engloba endófitos não patogênicos ou saprófitos, além de patógenos em humanos, mamíferos e plantas (DISSANAYAKE; CHEN; LIU, 2020).

Esse gênero consiste em cerca de 1.312 epítetos relatados e com aproximadamente 983 pertencentes ao seu estado assexuado *Phomopsis* (INDEX FUNGORUM, 2025). Anteriormente, havia-se o entendimento de que as espécies de *Diaporthe* eram específicas do hospedeiro (*host-specific*), com isso, eram descritas principalmente com base na sua planta hospedeira e em suas características morfológicas (UDAYANGA et al., 2011), desencadeando o surgimento de vários nomes de espécies, o que justifica a grande quantidade de epítetos relatados. A partir desse cenário, evidenciou-se que muitas espécies de *Diaporthe* poderiam apresentar semelhanças morfológicas, porém, serem geneticamente distintas, além de diversos isolados anteriormente identificados com base em seus hospedeiros demonstrarem pertencer a táxons diferentes (SUN et al., 2021).

Estudos recentes têm utilizado principalmente análises filogenéticas e moleculares para diferenciar essas espécies, destacando cinco regiões genéticas como as mais adequadas para análises multigênicas: espaçadores transcritos internos (*ITS*), o fator de alongamento da tradução 1- $\alpha$  (*tefl- $\alpha$* ),  $\beta$ -tubulina (*tub2*), calmodulina (*cal*) e histona H3 (*his3*), juntamente com

características morfológicas, são utilizados para a identificação e classificação precisa das espécies de *Diaporthe* (YANG; JIANG; TIAN., 2020; GAO et al., 2021).

No âmbito da química de produtos naturais, o gênero *Diaporthe* vem sendo amplamente estudado quanto a prospecção de metabólitos secundários, tendo em vista o isolamento de substâncias inéditas com bioatividades variadas e sendo considerado um gênero de importante relevância nessa temática (LIU et al., 2019; RIGA et al., 2019). Ademais, os fungos pertencentes a esse gênero são conhecidos pela ampla quantidade de substâncias com as variadas atividades biológicas, tais como: antibacteriana, antifúngica, antioxidante, citotóxica, fitotóxica etc. Sendo estas identificadas tanto em ambientes terrestres quanto marinhos (WEI et al., 2023).

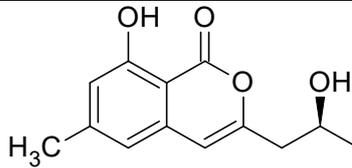
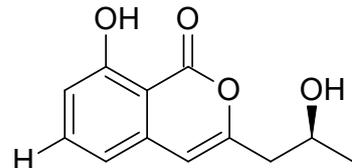
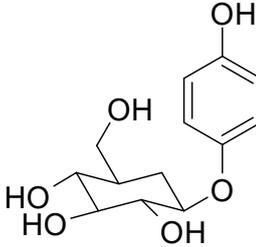
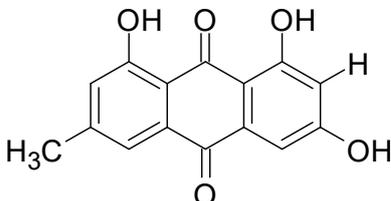
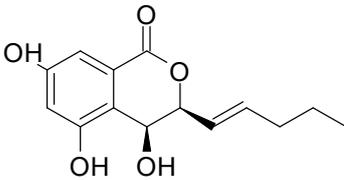
Em estudos que avaliam a atividade antioxidante de espécies do gênero *Diaporthe* tem-se o desenvolvido por Sharma e colaboradores (2018) no qual estes avaliaram a atividade antioxidante de substâncias isoladas a partir de *Diaporthe* sp. Os autores isolaram quatro substâncias sendo três delas inéditas, dentre estas a substância Diportharina A que apresentou atividade antioxidante em teste utilizando o radical livre DPPH. Outro estudo realizado para avaliação da atividade antioxidante de *Diaporthe* foi o desenvolvido por Zhai e colaboradores (2022) no qual os autores isolaram 13 substâncias a partir de *Diaporthe* sp. Dentre essas substâncias 4 eram inéditas. Dentre todas as substâncias testadas, a substância pestacina foi a que desempenhou melhor atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH.

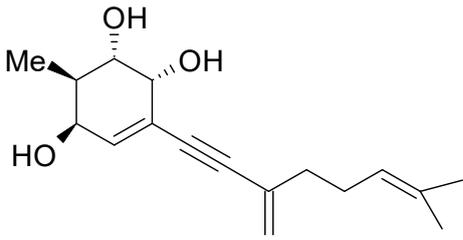
Ao avaliar atividade antibacteriana, De Medeiros e colaboradores (2018) evidenciaram que as substâncias diaportina e orthosporina, isoladas de *Diaporthe terebinthifolii* apresentaram atividade antibacteriana em teste por difusão de disco frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina e *S. aureus* resistente à meticilina. Também apresentaram atividades a estas bactérias o extrato bruto de *D. terebinthifolii*.

Quanto a atividade citotóxica, Riga e colaboradores (2019), verificaram através de ensaio citotóxico utilizando linhagens de células P-388 (leucemia) que as substâncias emodina e arbutina, isoladas a partir de *Diaporthe lithocarpus* desempenharam atividade citotóxica significativa. Referente a atividade fitotóxica, Cimmino e colaboradores (2013) relatam em seu trabalho, a substância phometrioloxina como uma substância tóxica frente a planta daninha *Carthamus lanatus* L.

Os nomes das espécies de *Diaporthe* relatadas, bem como plantas hospedeiras, substâncias isoladas e bioatividades estão listadas no quadro 2.

**Quadro 2.** Algumas substâncias bioativas isoladas do gênero *Diaporthe*

Fungo Endofítico	Planta Hospedeira	Atividade Biológica	Substância Isolada	Referência
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Atividade antibacteriana	 <p>diaportina</p>	MEDEIROS et al., 2016.
<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	<i>Schinus terebinthifolius</i>	Atividade antibacteriana	 <p>ortosporina</p>	MEDEIROS et al., 2016.
<i>Diaporthe lithocarpus</i>	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Atividade citotóxica	 <p>arbustina</p>	RIGA et al., 2019.
<i>Diaporthe lithocarpus</i>	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Atividade citotóxica	 <p>emodina</p>	RIGA et al., 2019.
<i>Diaporthe</i> sp.	<i>Datura innoxia</i> Mill.	Atividade antioxidante	 <p>diaportharina A</p>	SHARMA et al., 2018

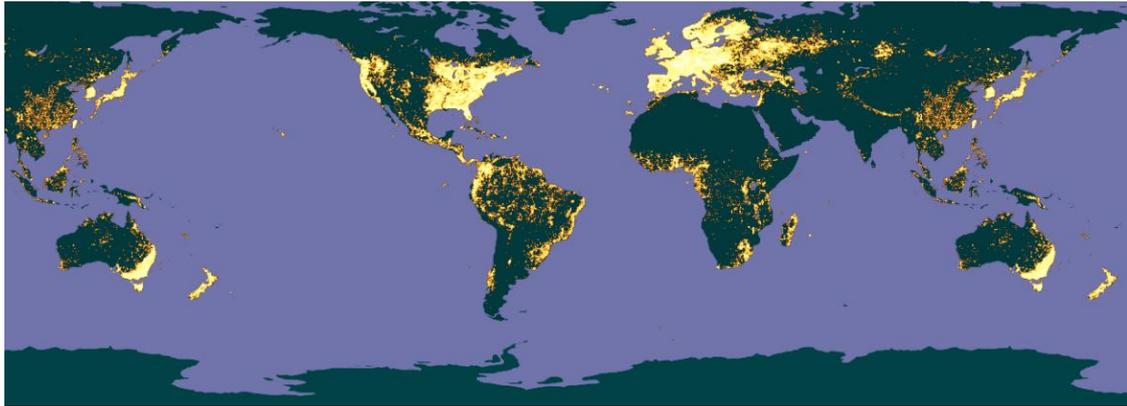
<i>Diaporthe gulyae</i>	<i>Carthamus lunatus</i>	Atividade fitotóxica	 <p>phomentrioloxina</p>	CIMMINO et al., 2013.
-------------------------	--------------------------	----------------------	--	-----------------------

Os estudos mostrados no Quadro 2, assim como outros já realizados com espécies pertencentes ao gênero *Diaporthe* evidenciam a importância desse gênero na prospecção de substâncias bioativas, sendo estas de grande valor para a Biotecnologia, de modo geral. A busca por novas espécies de plantas hospedeiras, bem como a prospecção de novas substâncias de *Diaporthe*, faz-se importante à medida que contribui para a investigação de compostos ativos para os diversos setores industriais, além de contribuir para a ampliação do conhecimento químico e biológico desse gênero.

#### 2.4. *Vismia japurensis* Reichardt.

A espécie *Vismia japurensis* pertence à família Hypericaceae. Anteriormente, fazia parte da família Clusiaceae, e após estudos filogenéticos, moleculares e morfológicos, pesquisadores da área consideraram que a família Hypericaceae possuía características suficientes para diferenciá-las da família Clusiaceae, sendo assim reconhecida como uma família independente (APG IV, 2016). A família Hypericaceae possui distribuição do tipo cosmopolita (figura 03), possuindo em sua totalidade, 6 gêneros taxonomicamente aceitos (*Cratoxylum*, *Eliea*, *Harungana*, *Hypericum*, *Psorospermum* e *Vismia*) e aproximadamente 628 espécies registradas pertencentes a essa família (WFO, 2023; POWO, 2023).

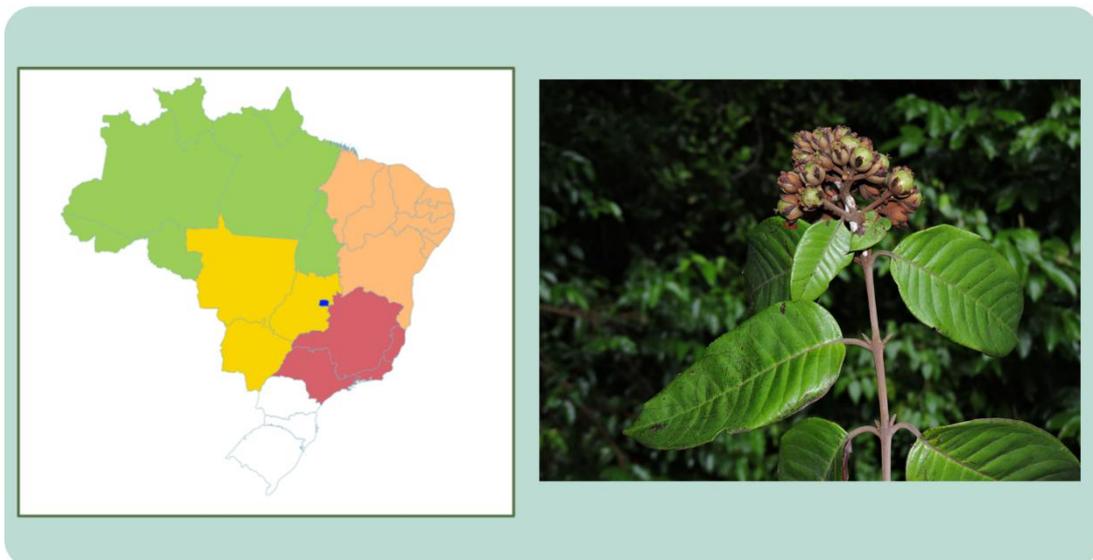
**Figura 3.** Distribuição mundial da família Hypericaceae



Legenda: amarelo – ocorrência de indivíduos pertencentes a Hypericaceae; Fonte: GBIF, 2024.

No Brasil, ocorrem dois gêneros da família Hypericaceae, sendo eles: *Hypericum* e *Vismia*. O gênero *Vismia* possui mundialmente em torno de 50 espécies aceitas, sendo que destas, 30 ocorrem no Brasil (WFO, 2023; FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2023). Os representantes deste gênero encontram-se em regiões tropicais e subtropicais da América do sul e América Central. No Brasil, estão presentes nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (figura 4), já no Estado do Amazonas existem até o momento 18 espécies do gênero *Vismia* (MARTINS; SHIMIZU; BITTRICH, 2018).

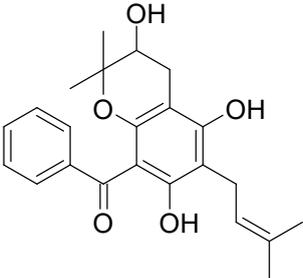
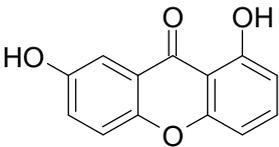
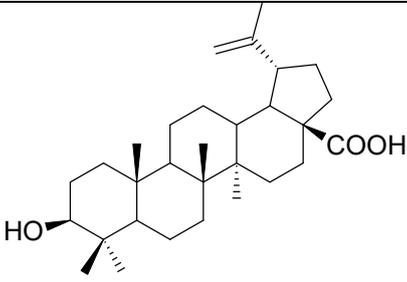
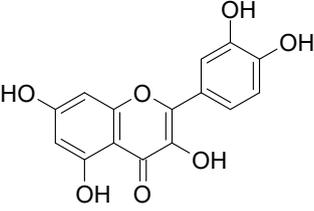
**Figura 4.** Distribuição regional do gênero *Vismia* no Brasil e a espécie *Vismia japurensis*

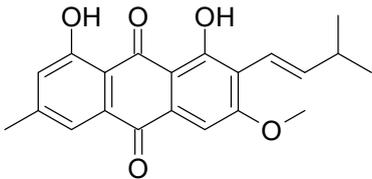


Fonte: Flora e Funga do Brasil, 2023; Shimizu 2018.

Do ponto de vista fitoquímico, o gênero *Vismia* tem como principais características a produção de duas classes de metabólitos secundários que são as quinonas e os terpenos. Apesar disso, outras classes de substâncias também são relatadas em espécies deste gênero, como antraquinonas, benzofenonas, flavonoides, triterpenos, xantonas etc. No quadro 3 estão descritas algumas substâncias das diferentes classes de metabólitos produzidas por espécies de *Vismia*.

**Quadro 3.** Algumas classes de substâncias produzidas pelo gênero *Vismia*

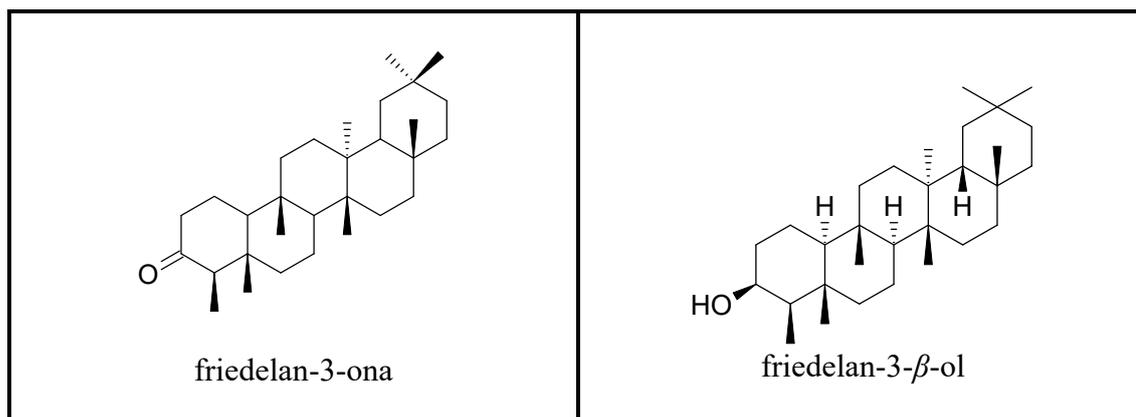
Espécie produtora	Substância	Classe	Referência
<i>Vismia guianensis</i>	 <p>vismiaguianona A</p>	benzofenonas	SEO et al., 2000
<i>Vismia laurentii</i>	 <p>1,7-dihidroxixantona</p>	xantonas	NGUEMEVING et al., 2006
<i>Vismia parviflora</i>	 <p>ácido betulínico</p>	triterpenos	NAGEM e OLIVEIRA, 1997
	 <p>quercetina</p>	flavonoides	

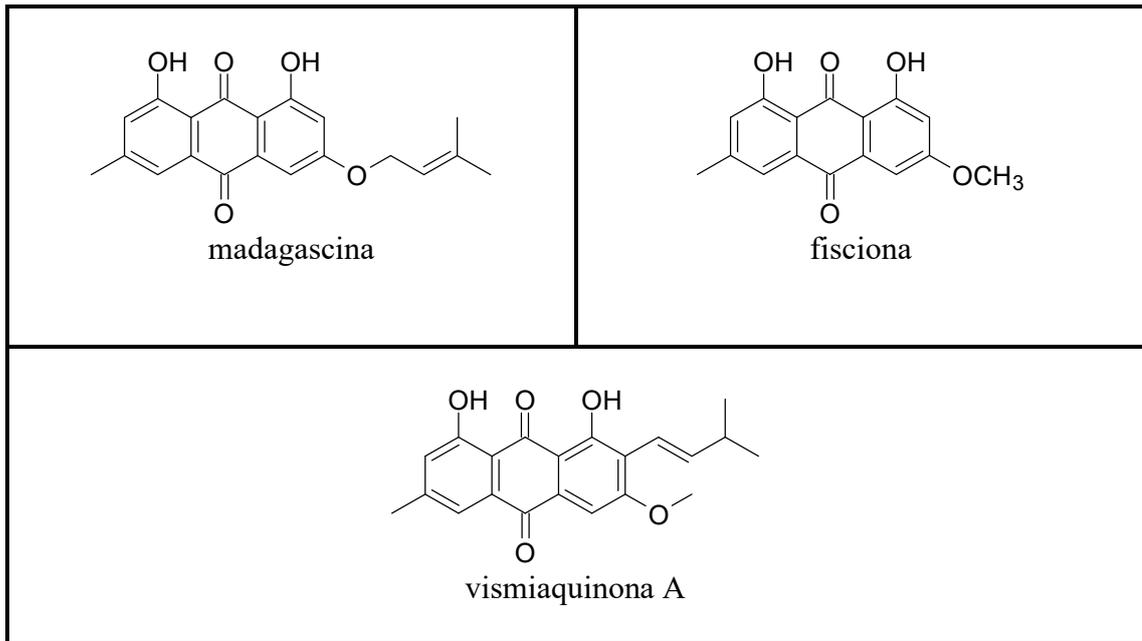
<i>Vismia reichardtiana</i>		antraquinonas	GONÇALVES E MORS, 1981
	vismiaquinona A		

Dentre os diversos representantes do gênero *Vismia*, a espécie *Vismia japurensis* tem-se mostrado promissora quanto à produção de substâncias bioativas. Assim, como outras espécies deste gênero, *V. japurensis* apresenta uma variedade de substâncias identificadas pertencentes a diferentes classes de metabólitos secundários. Historicamente, o primeiro estudo fitoquímico de *V. japurensis* foi realizado por Do Carmo e colaboradores (1981). Nesse estudo, os autores realizaram o fracionamento do extrato benzênico da madeira desta espécie, e a partir deste fracionamento foi possível isolar antraquinonas, triterpenos e um esteroide.

Trabalhos mais recentes a respeito dessa espécie incluem, o estudo químico e biológico dos extratos foliares de espécies do gênero *Vismia*, incluindo *Vismia japurensis*, desenvolvido por Pedroza (2019). Neste estudo foram isoladas cinco substâncias, sendo elas friedelan-3-ona e friedelan-3- $\beta$ -ol, ambos triterpenos e três antraquinonas (madagascina, fisciona e vismiaquinona A) (figura 5). Outro trabalho recente, foi o desenvolvido por Osório (2019), que consistiu no estudo químico e biológico de ramos de espécies de *Vismia*, também incluindo *V. japurensis*. Nesse trabalho foram isoladas as substâncias friedelina (triterpeno) e as antraquinonas madagascina, fisciona e vismiaquinona A (figura 5).

**Figura 5.** Substâncias produzidas por *Vismia japurensis*





Fonte: Adaptado de Pedroza (2019); Osório (2019).

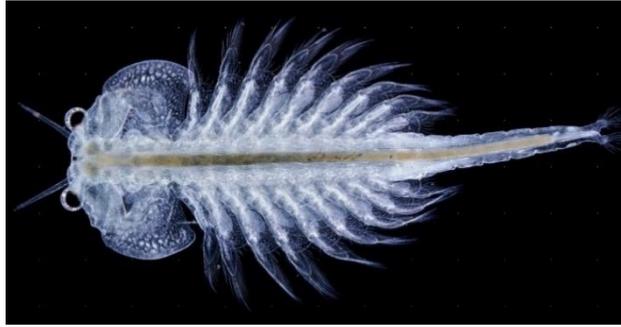
As substâncias produzidas por *V. japurensis* e outras espécies do gênero *Vismia* tem demonstrado resultados promissores quanto seu potencial em atividades química e biológicas variadas, como: citotóxica (LIZCANO et al., 2014), antioxidante, antimicrobiana, antidiabética, anti-inflamatória (OLIVEIRA et al., 2017), dentre outras. Sendo assim, observa-se a importância do estudo de fungos endofíticos de espécies do gênero *Vismia*, como *V. japurensis*, considerando a ausência de estudos a respeito de seus endófitos e a capacidade desses microrganismos em produzir substâncias bioativas assim como sua planta hospedeira.

## 2.5. Atividades Biológicas

### 2.5.1. Toxicidade frente a *Artemia salina* Leach.

A *Artemia salina* é um pequeno crustáceo habitante de água salgada que pertence ao filo Arthropoda e subfilo Crustacea. É um crustáceo de grande importância para os ecossistemas aquáticos e marinhos salinos. No contexto econômico, é utilizado na aquicultura e aquarismo, podendo também ser utilizado como alimentação de peixes, pássaros, outros representantes de crustáceos e invertebrados (NTUNGWEN et al., 2020).

**Figura 6.** *Artemia salina*



Fonte: Centeraquarismo, 2015.

A avaliação da toxicidade utilizando *A. salina* trata-se de um ensaio biológico preliminar para avaliação de extratos e substâncias oriundas de fontes naturais. É considerado um ensaio rápido, conveniente e de baixo custo, sendo utilizado como substituto do ensaio de citotoxicidade com células humanas. O ensaio de toxicidade com *A. salina* consiste na determinação da toxicidade através da concentração letal de 50% (CL<sub>50</sub>) de extratos vegetais e de microrganismos em meio salino, sendo o ensaio de toxicidade preliminar ao avaliar tal atividade presente em extratos e substâncias (MEYER et al., 1982).

O fato de apresentar correlação entre outros ensaios de atividade citotóxica, como a utilizada para teste contra tumores humanos e toxicidade oral em camundongos faz com que o ensaio utilizando *A. salina* seja considerado um bom teste preliminar para avaliação da toxicidade de extratos, além de ser uma boa ferramenta para análise preliminar frente a outras atividades, como a atividade pesticida. Este ensaio possui várias vantagens, principalmente no contexto de estudos preliminares e de triagem, quando se tem uma grande quantidade de amostras a serem testadas, torna-se então uma alternativa de teste de toxicidade acessível, rápido, de baixo custo e avalia poucos parâmetros, além de ser seguro e prático (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

### **2.5.2. Atividade antibacteriana e a resistência a antibióticos**

Por vários séculos, a população vem sendo alvo de infecções causadas por microrganismos patogênicos, dentre estes, as bactérias estão entre os mais preocupantes. Com o progresso das pesquisas, fármacos foram desenvolvidos como forma de combater as variadas infecções microbianas, todavia, com o avançar dos tempos estes seres se mostram cada vez mais adaptados para resistir aos medicamentos administrados (DHINGRA et al., 2020). Na literatura, é possível encontrar diversos estudos sobre microrganismos patogênicos de

importância médica, as patologias que acometem tanto humanos quanto animais, os fármacos mais utilizados para tratamento e a quais antibióticos estes microrganismos são atualmente resistentes (quadro 4) (BORCHARDT et al., 2003; FEINER, 2006; KIM et al., 2007; SAMONIS et al., 2009; JAMES, 2011; BUCKLE, 2015; GELBERG, 2017; BARER e SWANN, 2018; GLOSSOP et al., 2018; JENKINS, 2018; KILIAN, 2018; ÜNUVAR, 2018; VT NAIR et al., 2018; HARRIS e BROOKS, 2020; LEE e ANJUM, 2020; REYNOLDS e KOLLEF 2021; VERMA et al., 2022). Com o progresso da resistência bacteriana, vem crescendo a preocupação por parte da medicina a respeito do uso dos fármacos disponíveis no mercado e até quando estes ainda irão desempenhar com eficácia o papel que lhes é cabido (UDDIN et al., 2021).

**Quadro 4.** Principais cepas bacterianas causadoras de patologias em humanos e outros organismos

Nome científico	Patologias causadas	Observações	Referências
<i>Acinetobacter baumannii</i> (-)	<b>Em humanos:</b> Infecções graves, como pneumonia associada ao ventilador, infecções de feridas e bacteremias em pacientes hospitalares em estado crítico.	Resistência a carbapenem, colistina e tigeciclina.	JAMES, 2011
<i>Aeromonas hydrophila</i> (-)	<b>Em humanos:</b> Gastroenterite. <b>Em peixes e anfíbios:</b> ulceração dérmica, septicemia hemorrágica, condição de ferida vermelha, infecção por podridão vermelha.	Em humanos não é considerado um agente patológico pois está apenas envolvido no processo de gastroenterite, mas não é considerado o principal agente causador da patologia em si. As cepas de <i>A. hydrophila</i> são resistentes à maioria dos β-lactâmicos, incluindo ceftazidima, cefepima, imipeném e piperacilina-tazobactam.	BORCHARDT et al., 2003; FEINER, 2006; ÜNUVAR, 2018; VERMA et al., 2022
<i>Citrobacter freundii</i> 0702 (-)	<b>Em humanos e outros animais:</b> Hemorragias sistêmicas e gastroenterite (principalmente em cães).	Crianças e pacientes imunossuprimidos podem ser mais suscetíveis a infecção por <i>C. freundii</i> . Este microrganismo é intrinsecamente resistente a ampicilina-	SAMONIS et al., 2009; GELBERG, 2017

		subbactam e cefalosporinas.	
<i>Enterobacter cloacae</i> (-)	<b>Em humanos:</b> <i>Enterobacter cloacae</i> causa infecções de feridas, infecções respiratórias e do trato urinário.	<i>Enterobacter</i> spp. são quase sempre altamente resistentes às penicilinas e muitas cefalosporinas. Muitos também são resistentes a tetraciclinas, cloranfenicol e estreptomicina.	BARER e SWANN, 2018
<i>Enterococcus faecalis</i> (+)	<b>Em humanos:</b> Infecção do trato urinário, endocardite infecciosa, infecções do trato biliar, lesões abdominais supurativas e peritonite.	<i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> são causas importantes de feridas e infecção do trato urinário em pacientes hospitalizados e podem causar surtos esporádicos.	KILIAN, 2018
<i>Enterococcus faecium</i> (+)	<b>Em humanos:</b> Infecção do trato urinário, endocardite infecciosa, infecções do trato biliar, lesões abdominais supurativas e peritonite.	<i>E. faecalis</i> e <i>E. faecium</i> são causas importantes de feridas e infecções do trato urinário em pacientes hospitalizados e podendo causar surtos esporádicos.	KILIAN, 2018
<i>Escherichia coli</i> (-)	<b>Em humanos:</b> gastroenterite, infecção urinária, pielonefrite, apendicite, meningite	Caso a infecção por <i>Escherichia coli</i> não seja devidamente tratada, é possível que esse microrganismo atinja a corrente sanguínea, causando septicemia.	JENKINS, 2018
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)	<b>Em humanos</b> Infecções envolvendo o trato urinário, podendo causar também infecções de tecidos moles, endocardite, infecções do sistema nervoso central e casos de broncopneumonia grave, às vezes com lesões destrutivas crônicas e formação de múltiplos abscessos nos pulmões (pneumonia de Friedlander) e no fígado. Em muitos casos também há bacteremia e a taxa de mortalidade é alta.	As cepas de <i>Klebsiella</i> spp. são resistentes a ampicilina e amoxicilina.	KILIAN, 2018
<i>Morganella morganii</i> (-)	<b>Em humanos</b> Infecções oportunistas no trato respiratório, no trato	As cepas de <i>Morganella morganii</i> podem apresentar resistência à	KIM et al., 2007

	urinário e em infecções de feridas.	ampicilina, cefalotina e trimetoprima/sulfametoxazol.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	<b>Em humanos:</b> Infecções nosocomiais, manifestando-se como pneumonia, infecções de sítio cirúrgico, infecções do trato urinário e bacteremia.	Possui resistência a carbapenema.	REYNOLDS e KOLLEF, 2021
<i>Salmonella enterica</i> (-)	<b>Em humanos</b> Salmonelose não tifoide e febre tifoide.	Resistência a ampicilina, estreptomicina, sulfisoxazol e tetraciclina.	VT NAIR et al., 2018; HARRIS e BROOKS, 2020
<i>Serratia marcescens</i> (-)	<b>Em humanos</b> Infecções urinárias e respiratórias, endocardite, osteomielite, septicemia, infecções de feridas, infecções oculares e meningite (BUCKLE, 2015).	Resistência a penicilinas (cefalosporinas de primeira e segunda geração, resistência a carbapenem mediada por $\beta$ -lactamase), aminoglicosídeos e polimixinas.	BUCKLE, 2015
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	<b>Em humanos</b> Infecções potencialmente fatais, como pneumonia adquirida no hospital, síndrome do choque tóxico, sepse e endocardite aguda ou do lado direito.	Possui resistência a meticilina e penicilina.	GLOSSOP et al., 2018
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (+)	<b>Em humanos</b> Infecções de cateteres intravasculares, endocardite infecciosa.	Apresenta resistência ao antibiótico meticilina.	LEE e ANJUM, 2020

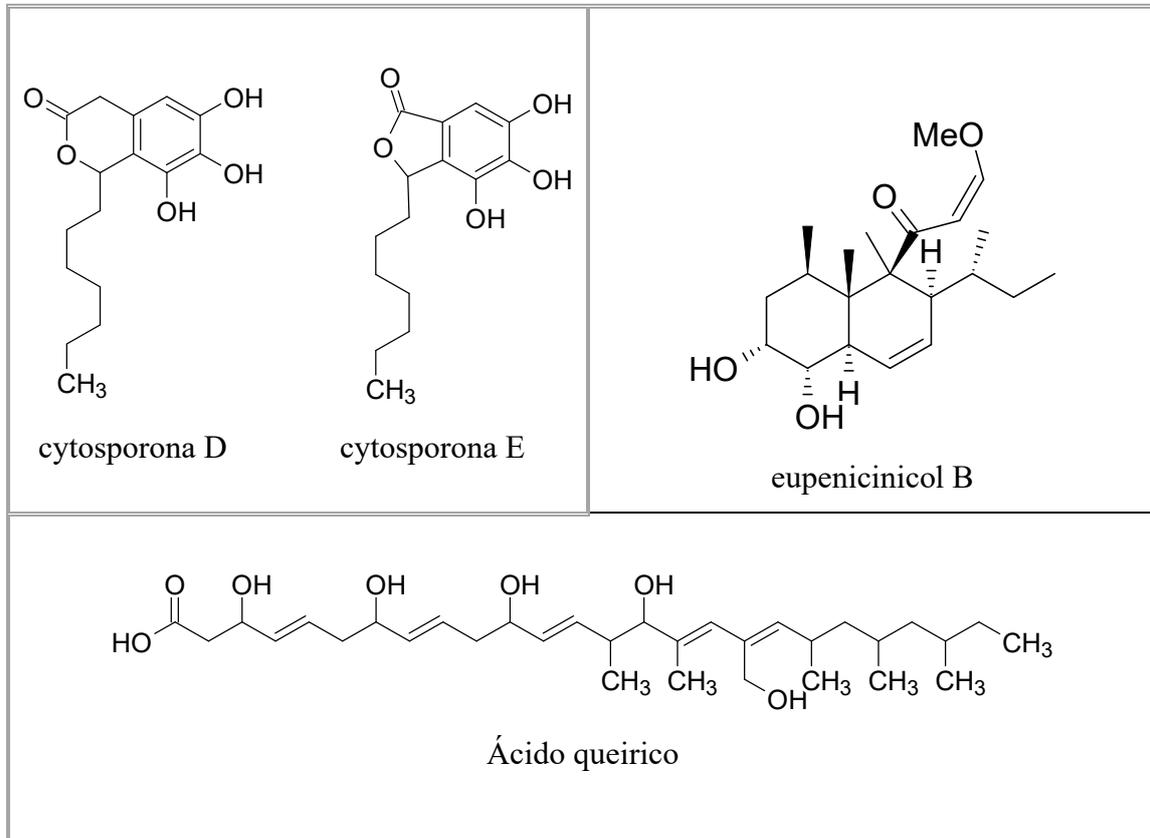
Legenda: (+) – Bactérias gram-positivas; (-) – Bactérias gram-negativas.

Ao observar o cenário de resistência bacteriana, a biotecnologia e aqueles que trabalham nessa área buscam incansavelmente prospectar substâncias de origem natural que possam ser empregadas como fármacos antimicrobianos. Nesse sentido, os fungos endofíticos são uma ótima alternativa, considerando a vasta gama de metabólitos secundários com diversas atividades biológicas produzidas por estes, incluindo a atividade antibacteriana (JHA et al., 2023).

Os estudos com fungos endofíticos para essa finalidade têm obtido avanços, podendo citar como exemplos, as substâncias cytosporona D e E, isoladas a partir dos fungos endofíticos *Cytospora* sp. e *Diaporthe* sp, que apresentaram atividade antimicrobiana, frente as cepas de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRADY et al., 2000). Outro exemplo, é a substância ácido queirico, isolada do fungo endofítico

*Curvularia papendorffii*, que exibiu atividade antibacteriana frente a uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (KHIRALLA et al., 2020). A substância eupenicinicol B, isolada a partir do fungo endofítico *Eupenicillium* sp., apresentou atividade antibacteriana potente frente a *Staphylococcus aureus* (LI et al., 2014). As estruturas químicas de cada substância estão ilustradas na figura 7.

**Figura 7.** Substâncias com atividade antibacteriana isoladas de fungos endofíticos



Fonte: Adaptado de BRADY et al., 2000; KHIRALLA et al., 2020; LI et al., 2014

Dados como esses demonstram a importância da bioprospecção de substâncias antibacterianas, principalmente oriundas de fontes naturais, com cultivo facilitado e ampla disponibilidade, como os fungos endofíticos, sendo dessa forma considerados uma boa alternativa para essa atividade.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Realizar o estudo químico e biológico dos extratos de fungos endofíticos de *Vismia japurensis*.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Isolar os fungos endofíticos de *Vismia japurensis*;
- Preparar extratos de fungos endofíticos e analisá-los quimicamente;
- Avaliar os extratos quanto à atividade tóxica a *Artemia salina* e antibacteriana;
- Fracionar o extrato metanólico do fungo endofítico que se mostrar mais ativo e que mostrar indícios de produção de metabólitos secundários;
- Identificar as substâncias isoladas do extrato do fungo selecionado.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Coleta do material vegetal

A coleta do material vegetal de *Vismia japurensis* foi realizada em 11 de janeiro de 2023, na Área Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas, localizada na Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 1200 – Bairro Coroado I, Manaus – AM (3°06'10" S, 59°58'51" W Alt: 61m). Foi realizada a coleta de folhas com aspecto sadio, além de alguns ramos contendo folhas e frutos para confecção de exsicata.

O material vegetal foi então transportado para o Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) a fim de se realizar o processamento do material coletado. Os ramos foram submetidos aos procedimentos padrões para confecção de exsicatas, sendo estas depositadas no herbário do INPA sob o número de depósito 297199.

**Figura 8.** Área da coleta



Fonte: Google Maps, 2023.

**Figura 9.** *Vismia japurensis* na área de coleta



Fonte: Kathiane Reboucas, 2023.

**Figura 10.** Exsicata depositada no herbário do INPA



Fonte: Kathiane Reboucas, 2023.

#### 4.2. Desinfecção do material vegetal e isolamento dos fungos endofíticos

Para esta etapa, foi utilizada a metodologia de isolamento estabelecida por Souza e colaboradores (2004) com adaptações. Primeiramente, todos os materiais necessários foram previamente esterilizados em autoclave vertical a 121°C por 15 minutos e submetidos a radiação UV em câmara de fluxo laminar por 20 minutos para possível descontaminação.

Dando início ao procedimento de pré-desinfecção, primeiramente, um total de três folhas sadias coletadas foram limpas superficialmente com esponja e sabão líquido neutro. Este procedimento foi feito de forma não abrasiva somente nas partes abaxial e adaxial das folhas a fim de remover possíveis microrganismos epifíticos, sendo logo em seguida lavadas com água corrente e colocadas sobre o papel toalha (figura 11).

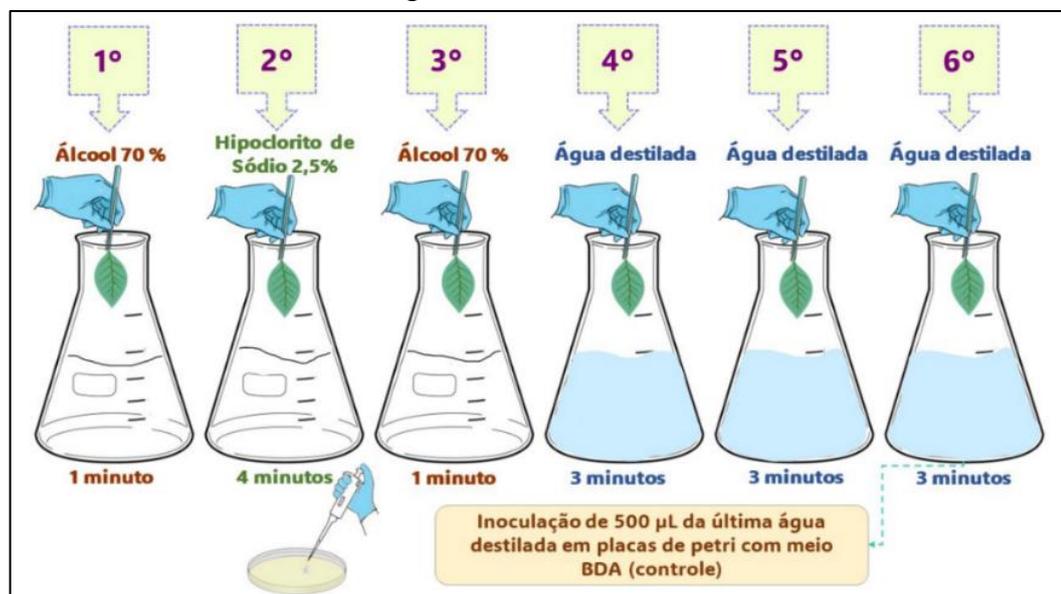
**Figura 11.** Folhas da espécie *V. japurensis* coletadas para desinfecção



Fonte: Kathiane Reboucas, 2023.

Após a pré-desinfecção, as folhas foram levadas até a câmara de fluxo laminar e então submetidas ao processo de desinfecção, submergindo-as em agentes desinfectantes: álcool a 70%, hipoclorito de sódio a 2,5% e água destilada autoclavada em seqüências e tempos determinados conforme ilustrado na figura 12.

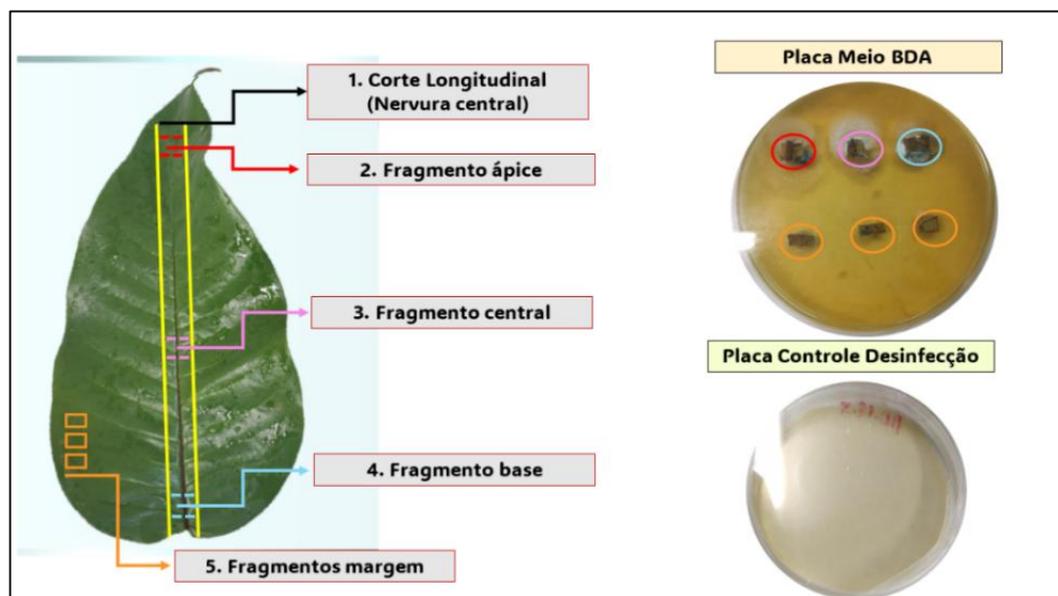
**Figura 12.** Processo de desinfecção das folhas da espécie *V. japurensis* por imersão em agentes desinfectantes.



Fonte: Kathiane Reboucas, 2023.

Posteriormente, as folhas foram dispostas sobre uma placa de vidro e com auxílio de bisturi, seccionadas primeiramente na nervura central e em seguida em pequenos fragmentos retangulares no ápice, meio e base da folha, totalizando três fragmentos (figura 13). Foram feitos outros cortes de três fragmentos localizados na margem da folha. Todos os seis fragmentos foram inoculados com auxílio de pinça em placas de petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Ao final do processo obteve-se três placas de petri com meio BDA (1 placa/folha), totalizando 18 fragmentos, sendo destes, inoculados 6 fragmentos em cada placa. Como forma de verificar se o processo de desinfecção foi efetivo, foram coletados 500  $\mu$ L da última água destilada na qual a folha foi submersa e inoculados em placa de petri contendo meio BDA. Todas as placas foram acondicionadas em incubadora BOD a 30° C por 5 dias.

**Figura 13.** Demonstração do processo de isolamento dos endofíticos de *V. japurensis*



Fonte: Kathiane Reboucas, 2023.

### 4.3. Purificação e preservação dos fungos endofíticos

Após o período de isolamento, os fungos crescidos a partir dos fragmentos foliares foram etiquetados no verso da placa com numerações distintas a fim de separar e demarcar os diferentes fungos crescidos, para isto foram avaliados aspectos macroscópicos de cada colônia, levando em consideração principalmente a coloração do micélio. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, foi realizada a purificação por repique em meio BDA de cada fungo identificado por este sistema (SOUZA et al., 2004), sendo posteriormente registrados com código “VJ”

(*Vismia japurensis*) seguido de numeração. Estes foram então levados a incubadora BOD a 30° C por 7 dias.

Para mensurar o padrão taxa de colonização (TC), esta foi calculada conforme (AZEVEDO, 1998), considerando a seguinte equação:

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

Durante o processo de cultivo dos fungos, estes foram analisados quanto as suas características macromorfológicas (coloração, textura, tipo de borda, perfil de crescimento) sendo então selecionados 14 fungos com aspectos diferentes dos 19 isolados das folhas de *V. japurensis* para prosseguimento dos estudos.

Com o crescimento isolado das colônias, elas foram submetidas ao processo de criopreservação. Tubos criogênicos contendo solução de meio líquido sabouraud + glicerol a 20% foram levados a autoclave para esterilização. Após este processo, o material foi levado ao fluxo laminar e pequenos fragmentos (2 x 2 mm) do micélio foram inoculados na solução. Os tubos criogênicos contendo os fragmentos preservados foram devidamente identificados e levados ao ultrafreezer a -80°C (Ultrafreezer: *Sanyo*) sendo armazenados para procedimentos futuros (OLIVEIRA, 2018).

#### 4.4. Preparo e obtenção dos extratos fúngicos

Para o preparo e obtenção dos extratos fúngicos foi utilizada a metodologia de Oliveira (2018) com adaptações. Os 14 fungos selecionados foram reativados em meio BDA e cultivados em incubadora BOD a 30°C por 7 dias. Durante o processo de crescimento, foi preparado o material necessário para o cultivo submerso, também conhecido como cultivo líquido. Para esta etapa foi selecionado o meio *Sabouraud Broth* (SB) acrescido de extrato de levedura a 0,2 % em erlenmeyers de 500 mL contendo 250 mL do meio de cultura líquido, em seguida foram levados a autoclave para esterilização. Após o crescimento dos fungos reativados, quatro fragmentos (5 x 5 mm) de cada micélio foram inoculados no meio líquido e acondicionados em incubadora *shaker* sob agitação constante de 120 rpm, 30 °C por 21 dias.

Posteriormente, os fungos crescidos em meio líquido foram submetidos à filtração a vácuo, a fim de separar o caldo do micélio fúngico. Para este estudo, optou-se por trabalhar apenas com o micélio fúngico. O micélio foi seco utilizando papel filtro e em seguida extraído

utilizando o solvente orgânico metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) em proporção de a cada 1 g de micélio 5 mL de solvente, por um período de 24 horas. Em seguida, o micélio foi levado ao banho de ultrassom (*Unique*) por 20 minutos e por 3 vezes para a extração do líquido metabólico utilizando metanol. Após este procedimento foi feita a concentração das amostras em evaporador rotativo (*Fusion*) a 40 rpm e banho de aquecimento a  $40^\circ\text{C}$ , com a finalidade de remover resíduos de solvente e obter os extratos fúngicos concentrados (figura 14).

**Figura 14.** Etapas para obtenção dos extratos metanólicos dos fungos de *V. japorensis*



Fonte: Kathiane Reboucas, 2023.

#### 4.5. Cálculo do rendimento dos extratos fúngicos

Para o cálculo para obtenção dos valores de rendimento de cada extrato fúngico, foram obtidos em porcentagem, a partir da seguinte equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato}}{\text{Massa do micélio}} \times 100$$

#### 4.6. Análise cromatográfica dos extratos fúngicos

Os extratos fúngicos foram submetidos a análise por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). Para dar início ao método, os extratos foram solubilizados em solventes orgânicos de diferentes polaridades e em seguida levados ao banho de ultrassom, auxiliando o processo de solubilização. Para aplicação das amostras (20 mg/mL), foram utilizadas cromatoplasmas de alumínio impregnadas com sílica 60 (Merck, Germany) e com auxílio de capilares cada amostra foi aplicada em formato *spot*. Após a aplicação das amostras, as cromatoplasmas foram eluídas em cuba cromatográfica utilizando como fase móvel sistemas apropriados de acordo com a polaridade das amostras (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Para a identificação das classes de metabólitos foram utilizados reveladores físicos (UV 254 e 365 nm) e reveladores químicos como: vapores de iodo, para detectar a presença de substâncias com duplas ligações, anisaldeído, utilizado como revelador de terpenos e esteroides, reagente de Dragendorff para detecção de alcaloides, substâncias nitrogenadas e aminas quaternárias, cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) para inferir a presença de substâncias fenólicas, cloreto de alumínio  $\text{AlCl}_3$  para confirmar a presença de substâncias fenólicas e sulfato cérico  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  para detecção de terpenos (WAGNER e BLADT, 1996).

#### 4.7. Ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach.

O ensaio de toxicidade foi realizado utilizando-se como base a metodologia desenvolvida por Meyer e colaboradores (1982) contendo adaptações. Para este ensaio, foram utilizados todos extratos obtidos do cultivo submerso, sendo estes testados nas concentrações de 1000 e 500  $\mu\text{g/mL}$ . Primeiramente, foram pesados 10 mg de cada extrato e 20 mg de cistos de *Artemia salina*, ambos em balança analítica. Em seguida, foram pesados 38 g de sal marinho em balança semianalítica. Após a pesagem, foi preparado o sistema para eclosão dos cistos, no qual foi utilizado um béquer (1L) acrescido de 1 litro de água destilada, sal marinho e os cistos de *A. salina*, sendo todos solubilizados no sistema.

Após o preparo da solução, os cistos foram submetidos a aeração e iluminação artificial por um período de 48 horas a 25 °C. Ao ocorrer a eclosão dos cistos, foi realizado o preparo dos extratos para aplicação em placa de 24 poços em formato de triplicata. Para isso, cada extrato foi solubilizado em 250  $\mu\text{L}$  de DMSO puro e em seguida diluído em 750  $\mu\text{L}$  de água salina, totalizando uma solução com concentração final de 1 mL (1000 $\mu\text{g/mL}$ ). Como controle

negativo foi utilizada uma solução de água salina e DMSO, para o controle positivo foi utilizado o dicromato de potássio 1% ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Para aplicação nos poços, foram pipetados 900  $\mu$ L de água salina (200  $\mu$ L contendo 10 cistos de *A. salina* e 700  $\mu$ L de água salina) e 100  $\mu$ L dos extratos solubilizados, para concentração de 1000  $\mu$ g/mL Para a concentração de 500  $\mu$ g/mL foram pipetados 950  $\mu$ L de água salina (200  $\mu$ L contendo 10 cistos de *A. salina* e 750  $\mu$ L de água salina) e 50  $\mu$ L dos extratos solubilizados (figura 15).

Ao final do processo, as placas foram submetidas a iluminação artificial por um período de 24 horas a 25 °C. Após as 24 h, foi feita a contagem dos crustáceos mortos e realizou-se a determinação da porcentagem de mortalidade deles frente aos extratos testados. Este cálculo foi realizado no programa Microsoft Excel 2021.

**Figura 15.** Preparo do ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*



Fonte: Kathiane Reboucas, 2023.

#### 4.8. Ensaio antibacteriano

Para avaliar a atividade antibacteriana dos extratos obtidos foi empregado o método de microdiluição, determinando-se a porcentagem de inibição a partir de padrões estabelecidos pelo manual M07-A10 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE [CLSI], 2015). Neste ensaio, as cepas utilizadas foram cedidas pela Coleção de Bactérias da Amazônia – CBAM do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ – Manaus, AM. Como forma de avaliar os extratos, foi utilizada a concentração de 1000  $\mu$ g/mL. Para dar início ao método, foram pesados 10 mg de cada extrato em balança analítica. Em seguida, foram reativadas as cepas bacterianas utilizadas no ensaio em meio de cultura ágar Mueller Hinton e

encubadas em BOD a 37 °C por 24 horas. A identificação de cada cepa utilizada no ensaio pode ser observada no quadro 5.

**Quadro 5.** Identificação das cepas utilizadas no ensaio antibacteriano

Número da linhagem	Identificação das cepas
0664	AB – <i>Acinetobacter baumannii</i> (-)
0162	AH – <i>Aeromonas hydrophila</i> (-)
0006	EC – <i>Escherichia coli</i> (-)
0621	EF – <i>Enterococcus faecalis</i> (+)
0051	KP – <i>Klebsiella pneumoniae</i> (-)
0138	MM – <i>Morganella morganii</i> (-)
0519	PA – <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)
0026	SA – <i>Staphylococcus aureus</i> (+)
0209	SE – <i>Salmonella enterica</i> (-)
0069	SM – <i>Serratia marcescens</i> (-)

**Legenda:** (+) – gram positiva; (-) – gram negativa

Após o período de incubação das cepas, as amostras foram preparadas para aplicação, sendo cada extrato solubilizado em 250 µL de DMSO a 5% e em seguida, essa solução diluída em 4,750 mL de água destilada autoclavada. Também foi realizado o ajuste do inóculo bacteriano em espectrofotômetro Cirrus através de alçadas das colônias bacterianas em frascos contendo 5 mL de água destilada autoclavada. O ajuste foi feito até a obtenção de valores de absorvância entre 0,08 e 0,1 no comprimento de onda de 625 nm (correspondendo à 0,5 na escala de McFarland,  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia UFC/mL). Após o ajuste, 500 µL dessa solução foram transferidos para frascos contendo 9,5 mL de água destilada autoclavada, obtendo-se assim o inóculo bacteriano pronto para aplicação.

Na placa de 96 poços, em triplicata, foram primeiramente pipetados 90 µL de caldo Mueller Hinton autoclavado em todos os poços. Em seguida, foram pipetados 100 µL de cada extrato e 10 µL de cada inóculo bacteriano em todos os poços, exceto aqueles contendo o branco (apenas caldo Mueller Hinton). Os controles utilizados foram: tetraciclina 125 µg/mL como controle positivo e DMSO a 5% + água destilada autoclavada como controle negativo. Assim como os extratos, os controles também foram pipetados em mesma quantidade, sendo 100 µL em cada poço.

Após a finalização das pipetagens, as placas foram submetidas à leitura espectrofotométrica no equipamento *Thermo Scientific Multiskan Go* em 625 nm, armazenadas em BOD a 37 °C por 24 horas e em seguida realizada uma segunda leitura no mesmo comprimento de onda. Para o tratamento dos dados obtidos foi utilizado o programa Microsoft Excel 2021.

#### **4.9. Seleção e identificação dos fungos endofíticos isolados de *V. japurensis***

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade e antibacteriano, foi selecionado para identificação molecular o fungo VJ 15. Amostras do micélio fúngico foram enviadas ao Instituto Leônidas e Maria Deane da fundação Osvaldo Cruz – ILMD/FIOCRUZ – Manaus, AM. O processo de identificação consistiu nas etapas de extração do DNA genômico, amplificação da região de interesse, purificação do produto amplificado e sequenciamento dessa região. A extração do DNA genômico foi realizada a partir das culturas do fungo utilizando o kit *DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen), conforme as recomendações do fabricante. A amplificação ocorreu por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com primers direcionados à região 3' do gene 18S rRNA até a região 5' do gene 28S rRNA, que inclui o espaçador interno transcrito (ITS) ITS1 – 5,8S – ITS2. Essa região foi selecionada devido à sua ampla utilização na caracterização de espécies fúngicas.

O protocolo de termociclagem para a amplificação da região ITS consistiu nas seguintes etapas: 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, com uma etapa final de extensão a 72 °C por 2 minutos. Os primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') foram utilizados para esse processo. A confirmação das amplificações foi realizada a partir de eletroforese em gel de agarose, corado com *GelRed* (Biotium). Os fragmentos amplificados correspondentes à região *ITS* completa (*ITS1* – 5,8S – *ITS2*) foram purificados com PEG 20% a fim de remover reagentes residuais e em seguida submetidos ao sequenciamento nucleotídico pela técnica de Sanger na plataforma de genômica do ILMD.

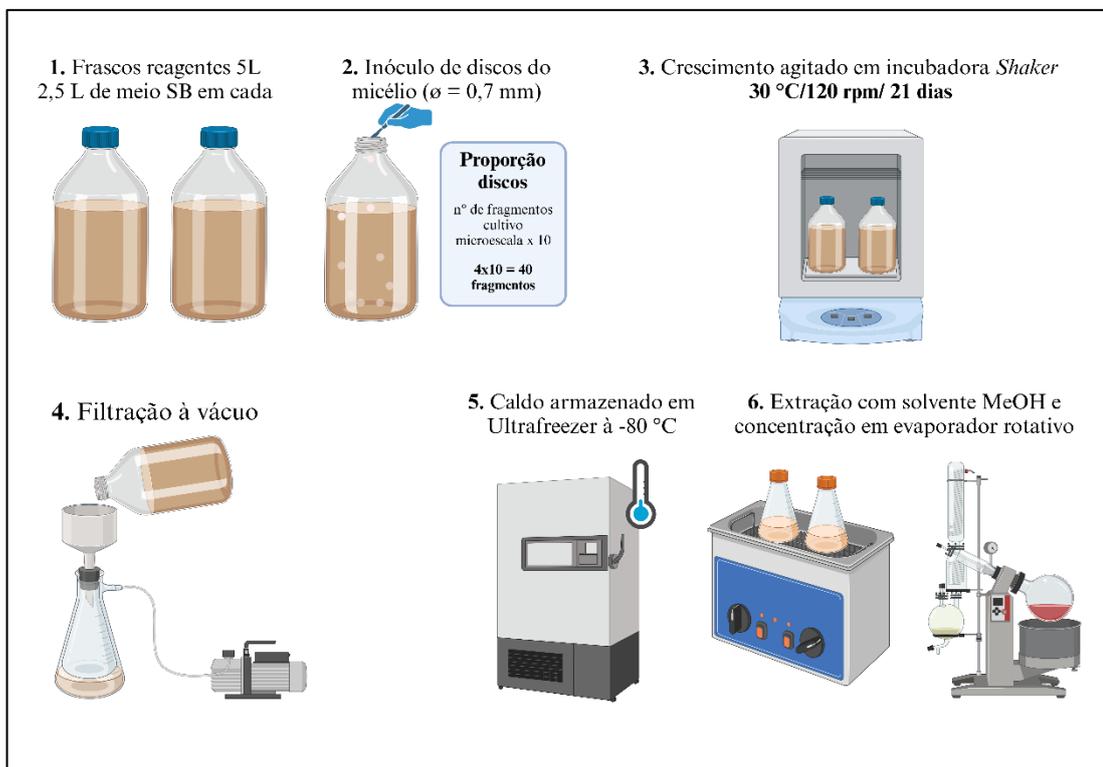
Os eletroferogramas gerados foram utilizados para a construção de *contigs* e montagem final das sequências, com o auxílio de softwares de bioinformática, seguidos de revisão manual.

As sequências obtidas foram então comparadas com aquelas disponíveis no banco de dados GenBank para identificação a nível de espécie.

#### 4.9.1. Cultivo submerso e obtenção de extrato em escala ampliada do fungo *Diaporthe* sp.

O fungo identificado como *Diaporthe* sp. foi submetido ao cultivo em escala ampliada. Para realização dessa etapa, utilizaram-se dois frascos de 5 litros cada. Foram preparados 2,5 litros de meio de cultura *Sabouraud Broth* em cada frasco. Após o preparo do meio, foram inoculados 40 discos (quantidade de fragmentos x 10 em relação ao cultivo em menor escala) de 0,7 mm de diâmetro em cada um dos frascos e em seguida, acondicionados em incubadora *Shaker* sob agitação constante a 30 °C por 21 dias. Após o período fermentativo, o fungo crescido foi submetido à filtração a vácuo, separando-se micélio e caldo. O caldo foi transferido para garrafas e acondicionado em ultrafreezer à -80 °C a fim de se preservar o material para trabalhos futuros. O micélio foi extraído com solvente orgânico metanol. As demais etapas também seguiram os mesmos padrões utilizados no primeiro cultivo do fungo. Todo o processo está resumido e ilustrado na figura 16.

**Figura 16.** Esquema do cultivo em escala ampliada do fungo *Diaporthe* sp.

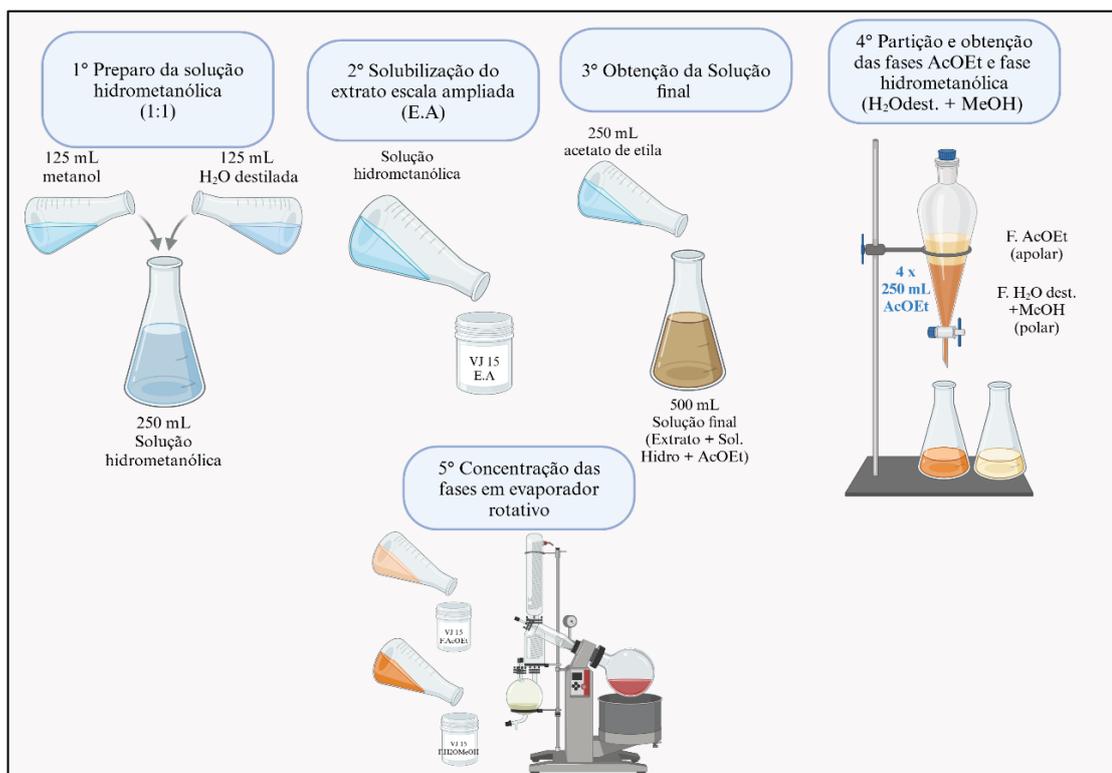


Fonte: Kathiane Reboucas, 2025.

#### 4.10. Obtenção da fase acetato de etila do extrato metanólico em escala ampliada de *Diaporthe* sp.

Para obtenção da fase acetato de etila (fase AcOEt) foi realizada uma partição líquido-líquido do extrato MeOH do micélio de *Diaporthe* sp. em funil de separação utilizando-se o solvente acetato de etila (figura 20). Primeiramente, foi preparada a fase hidrometanólica em proporção de 1:1 contendo 250 mL de uma solução de metanol e água destilada (125 ml de MeOH + 125 H<sub>2</sub>O destilada). Após o preparo da solução hidrometanólica, esta foi adicionada ao extrato fúngico para solubilização e em seguida transferida para um funil de separação de 1000 mL. Para finalizar a preparação do sistema acrescentou-se 250 mL de solvente acetato de etila. Formaram-se então duas fases sendo a superior a fase acetato de etila (apolar) e a fase inferior a fase hidrometanólica (polar). A partição foi feita 4 vezes acrescentando-se a cada partição 250 mL de acetato de etila, sendo coletadas ambas as fases. Ao final do procedimento obteve-se separadamente a fase AcOEt e a fase hidrometanólica, sendo ambas concentradas em evaporador rotativo. O procedimento está resumido e esquematizado na figura 17.

**Figura 17.** Esquema da partição líquido-líquido e obtenção das fases AcOEt e H<sub>2</sub>O+MeOH



Fonte: Kathiane Reboucas, 2025

#### 4.11. Fracionamento cromatográfico da fase AcOEt obtida do extrato em escala ampliada de *Diaporthe* sp.

A fase AcOEt (539,4 mg) foi fracionada a partir da técnica de cromatografia em coluna aberta ( $h=40$  cm,  $\varnothing=1,5$  cm) com o objetivo de isolar e caracterizar as possíveis substâncias presentes na fase. O adsorvente selecionado foi alumina neutra (53,94 g) e os eluentes utilizados para o fracionamento foram: diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), puros ou em misturas, aplicados em ordem crescente de polaridade (tabela 1). O volume de cada sistema de eluição adicionado a coluna foi de aproximadamente 100 mL. Um total de 28 frações foram coletadas e após análises por CCDC as frações semelhantes foram reunidas (tabela 2). Um resumo do processo completo de fracionamento foi exemplificado em fluxograma (figura 18, p. 49).

**Tabela 1.** Eluentes utilizados no fracionamento da fase AcOEt de *Diaporthe* sp.

Frações	Eluentes
01-04	DCM 100%
05-10	DCM/MeOH 95:5
11-12	DCM/MeOH 9:1
13-16	DCM/MeOH 8:2
17-20	DCM/MeOH 7:3
21-26	DCM/MeOH 1:1
27-28	MeOH 100%

**Tabela 2.** Frações reunidas a partir do fracionamento da fase AcOEt de *Diaporthe* sp.

Frações reunidas FAcOEt – CC alumina neutra	Massa (mg)
01-04	51,5
05-06	7,8
07-09	26,9
10-11	2,5
12-13	1,5
14-15	6
16-17	25,7
18-19	6,4
20	2,3
21-23	24,7
24-26	3,4
27-28	168,1

#### 4.11.1. Fracionamento cromatográfico de fAcOEt-F7-9

O fracionamento da amostra F7-9 (26,9 mg) ocorreu em CC (h = 26 cm, Ø = 1,3 cm) utilizando 3 g sílica gel 60 (230-400 *mesh*). Para a eluição foram utilizados os solventes: DCM e MeOH, puros ou em misturas com ordem crescente de polaridade (tabela 3). O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de 10 mL. Obtiveram-se através desse fracionamento um total de 18 frações. Essas frações foram analisadas por CCDC e em seguida reunidas conforme a similaridade entre elas (tabela 4).

**Tabela 3.** Eluentes utilizados no fracionamento da fase AcOEt-F7-9

Frações	Eluentes
01-04	DCM/MeOH 98:2
05-09	DCM/MeOH 95:5
10-11	DCM/MeOH 9:1
12-15	DCM/MeOH 85:15
16	DCM/MeOH 8:2
17	DCM/MeOH 7:3
18	MeOH 100%

**Tabela 4.** Frações reunidas a partir do fracionamento da FAcOEt-F7-9

Frações reunidas FAcOEt-F7-9 – CC SiO <sub>2</sub>	Massa (mg)
01	1,3
02	0,6
03	10,6
04	0,7
05	6,3
06	2,9
07	3,8
08	1,9
09	0,2
10-11	1
12	1
13	0
14	1
15	0,4
16	0,3
17	0,2
18	1

#### 4.11.2. Fracionamento cromatográfico de fAcOEt-F27-28

O fracionamento da amostra F27-28 (126,5 mg) ocorreu em CC (h = 26 cm, Ø = 0,8 cm) utilizando 12,5 g de sílica gel 60 (230-400 *mesh*). Para a eluição foram utilizados os solventes: DCM e MeOH, puros ou em misturas com ordem decrescente de polaridade (tabela 5) com o objetivo de obter substâncias nitrogenadas, como alcaloides. O volume de cada sistema de eluição adicionado à CC foi de 10 mL. Obtiveram-se através desse fracionamento um total de 20 frações. Essas frações foram analisadas por CCDC e em seguida reunidas conforme a similaridade entre elas (tabela 6).

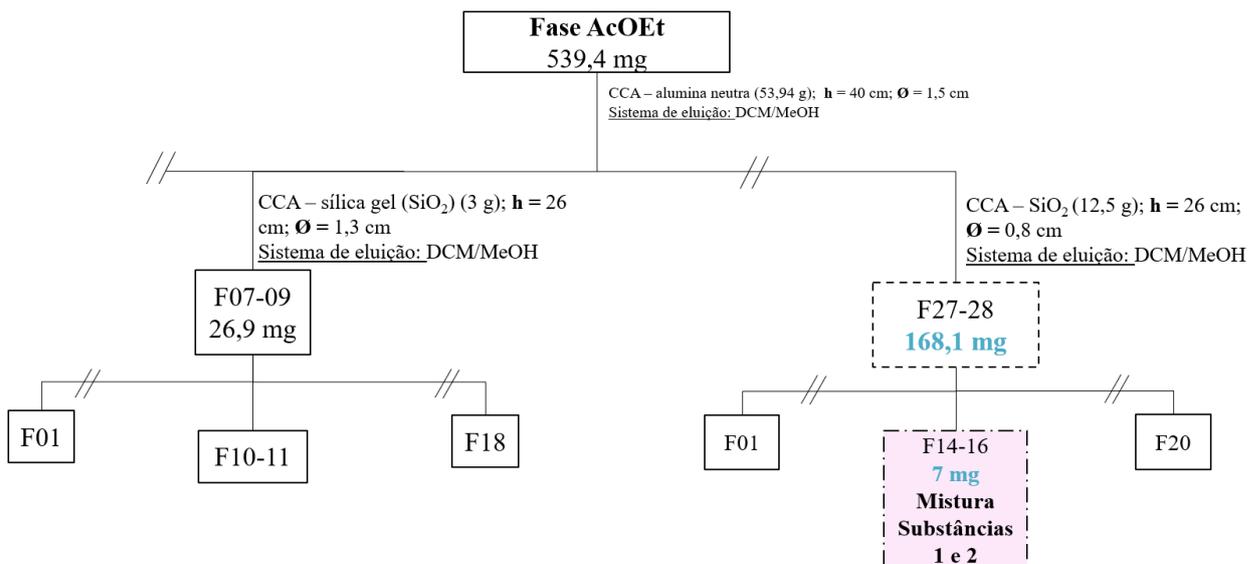
**Tabela 5.** Eluentes utilizados no fracionamento da fase AcOEt-F27-28

Frações	Eluentes
01-04	DCM/MeOH 1:1
05-08	DCM/MeOH 4:6
09-12	DCM/MeOH 3:7
13-14	DCM/MeOH 2:8
15-18	DCM/MeOH 1:9
19-20	MeOH 100%

**Tabela 6.** Frações reunidas a partir do fracionamento da FAcOEt-F27-28

Frações reunidas FAcOEt-F27-28 – CC SiO <sub>2</sub>	Massa (mg)
01	4,2
02	1,3
03	0,5
04	2,7
05	3,9
06	3,5
07	0,4
08	3,3
09	17,1
10	2,1
11	0
12	0,1
13	1,6
14-16	7
17	0,2
18	0,5
19	0,4
20	4

**Figura 18.** Fluxograma do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH do micélio de *Diaporthe sp.*



#### 4.12. Identificação das substâncias isoladas do fracionamento da fase AcOEt do extrato MeOH do micélio de *Diaporthe sp.*

Para o processo de elucidação estrutural das substâncias isoladas foi utilizada a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). As análises espectroscópicas foram realizadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) do INPA. Na técnica de RMN, os espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  uni e bidimensionais foram gerados em espectrômetro Bruker Fourier 600, com operação ocorrendo a 600 MHz para o núcleo de  $^1\text{H}$  e a 150 MHz para o núcleo de  $^{13}\text{C}$ . A solubilização das amostras foi feita utilizando-se os solventes deuterados acetona e DMSO. Todos os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em ppm relativos ao sinal padrão do solvente deuterado utilizado e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz). O processamento dos dados e análises dos espectros foi realizada a partir do software *TopSpin* versão 4.4.1 (*Bruker*).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento dos fungos endofíticos e taxa de colonização

Um total de 19 fungos endofíticos foram isolados e purificados a partir de 18 fragmentos foliares da espécie *Vismia japurensis*, resultando em uma taxa de colonização de 90%. Os isolados foram separados e reunidos em quatro grupos considerando, principalmente o aspecto coloração do micélio. Na tabela 7 é possível observar as características macroscópicas de cada fungo isolado.

**Tabela 7.** Características macroscópicas dos fungos endofíticos isolados de *Vismia japurensis*

GRUPOS	Macroscopia		
Grupo Branco (GB)			
			
	VJ 01	VJ 04	VJ 05
			
	VJ 06	VJ 07	VJ 08
			
	VJ 14		

---

Grupo Marrom (GM)



VJ 02



VJ 09



VJ 12



VJ 18



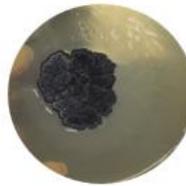
VJ 15



VJ 16

---

Grupo Preto (GP)



VJ 03



VJ 10



VJ 13



VJ 17



VJ 19

---

Grupo Verde (GV)



VJ 11

---

Foi possível observar a predominância de fungos endofíticos com coloração branca (GB), além de fungos com cores em marrom (GM) e preta (GP), e apenas um fungo com coloração distinta das demais, como esverdeada (GV), esta, presente no fungo codificado como VJ 11. É importante ressaltar, a existência de linhas de pesquisas que se dedicam ao estudo da diversidade macro e micromorfológica de fungos endofíticos, além da relevância dessa diversidade para a natureza em geral, principalmente, levando em consideração aspectos ecológicos. Por se tratar, de um primeiro relato de fungos endofíticos isolados a partir desta espécie vegetal, será descrito a seguir alguns trabalhos referentes a fungos isolados de espécies pertencentes a família Hypericaceae.

Em um estudo desenvolvido por Samaga e Rai (2016), ao avaliarem a diversidade de fungos endofíticos nas espécies *Nothapodytes foetida*, *Hypericum mysorense* e *Hypericum japonicum*, sendo os dois últimos representantes da família Hypericaceae, foi possível observar entre os resultados dos isolamentos uma ampla presença de fungos endofíticos nas folhas e caules dessas duas espécies. Além disso, os autores ressaltam a riqueza de fungos endofíticos presentes nas folhas de *H. mysorense*, sendo estes parâmetros de diversidade calculados a partir do cálculo de frequência de isolamento (FI). Quanto a identificação taxonômica dessas espécies, os autores descrevem que por meio de análises microscópicas e moleculares foi possível identificar que todos os isolados pertenciam ao filo Ascomycota, um dos filos mais abundantes em número de indivíduos do Reino Fungi. Os autores também discutem a respeito de fatores que podem influenciar na quantidade e diversidade de fungos endofíticos isolados a partir de uma planta hospedeira, considerando fatores como: número de segmentos de tecido utilizados no isolamento, tempo de processamento e a capacidade inerente de crescimento dos isolados.

Henzelyová e colaboradores (2020) realizaram um estudo com 14 espécies diferentes pertencentes ao gênero *Hypericum* oriundas de sementes cultivadas em condições *in vitro* e posteriormente aclimatadas a condições externas. Neste estudo, os autores obtiveram 37 fungos isolados a partir de órgãos aéreos e subterrâneos das plantas, todavia relataram que dentre folhas, caules e raízes, nas folhas obtiveram-se maiores quantidades de fungos endofíticos isolados, sendo dos 37 isolados, 15 presentes nas folhas, equivalendo a 40.5% do total de endófitos isolados.

No estudo desenvolvido por Casella e colaboradores (2013), estes fizeram a coleta de várias plantas oriundas da Guiana Francesa com o objetivo de isolar fungos endofíticos a partir das folhas e testar as suas atividades antimicrobianas e citotóxicas. Quanto ao isolamento, neste

trabalho, os autores realizaram a coleta de 24 espécies vegetais e a partir destas isolaram um total de 138 fungos endofíticos. Os autores relatam que dentre todas as espécies vegetais coletadas a espécie *Vismia latifolia* foi a espécie com o maior número de fungos endofíticos isolados, sendo esse valor de 23 endófitos fúngicos isolados. Outras espécies de *Vismia* também foram trabalhadas, obtendo valores significativos de isolados, como: *Vismia cayennensis* e *Vismia guianensis*, com aproximadamente 9 e 11 fungos endofíticos isolados, respectivamente.

A taxa de colonização é um importante indicativo para a compreensão da riqueza e diversidade dos fungos endofíticos associados às suas plantas hospedeiras. O estudo desenvolvido por Selim e colaboradores (2011) teve por objetivo avaliar a biodiversidade e atividade antimicrobiana de fungos endofíticos associados a plantas medicinais do Egito. Nesse estudo, os autores coletaram amostras de folhas e caules de 18 plantas medicinais, incluindo a espécie *Hypericum sinaicum*. A partir dos resultados obtidos das taxas de colonização, os autores verificaram que a espécie em questão se destacou pela alta taxa de colonização de 95% sendo a quarta espécie com maior quantidade de isolados dentre as espécies vegetais trabalhadas e a segunda espécie com maior taxa de colonização.

O entendimento desse indicativo torna-se importante, pois, altas taxas de colonização remetem a características benéficas oriundas da interação endófito-hospedeiro, como estímulo do crescimento vegetal, resistência a estresses bióticos e abióticos e produção de metabólitos ativos, além da possibilidade da existência de fungos cultiváveis ou não cultiváveis (GOWTHAM et al., 2024).

## **5.2. Rendimento dos extratos fúngicos**

As extrações dos fungos endofíticos de *V. japurensis* utilizando solvente MeOH resultaram em valores de massa micelial variados (tabela 8). Todos os fungos obtiveram valores de massa muito expressivos, tendo como destaque os fungos VJ 02, VJ 12, VJ 15, VJ 16, VJ 17, VJ 18 e VJ 19 que obtiveram os maiores valores de massa micelial, sendo dentre estes o fungo VJ 12 o com maior quantidade de massa micelial dentre todos os outros fungos, com 32.2 g. Ao observar os valores de massa de todos os extratos e tomando como base o trabalho de Gomes (2024) que realizou o cultivo de fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Diaporthe* a partir de folhas de *Deguelia duckeana* em condições de cultivo similares, foi possível observar que as porcentagens de rendimento aqui obtidas foram baixas. Utilizando como comparativo os rendimentos obtidos no trabalho da autora, no qual, a menor porcentagem obtida foi de 13,22%

de rendimento, no presente trabalho apenas os fungos VJ 07 e VJ 12 apresentaram valores mais expressivos com 6,8 e 5,1%, de rendimento, respectivamente.

**Tabela 8.** Valores das massas miceliais, extratos e rendimentos dos fungos endofíticos de *V. japorensis*

<b>Fungo</b>	<b>Massa micelial (g)</b>	<b>Massa do extrato metanólico (g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
VJ 01	9,81	0,3551	3,6
VJ 02	18,82	0,4945	2,6
VJ 05	5,40	0,2035	3,7
VJ 07	5,06	0,3449	6,8
VJ 08	2,21	0,1135	5,1
VJ 10	9,60	0,1622	1,6
VJ 11	6,46	0,1739	2,6
VJ 12	32,22	0,4934	1,5
VJ 13	4,40	0,17	3,8
VJ 15	23,77	0,4865	2
VJ 16	22,62	0,3592	1,5
VJ 17	21,54	0,366	1,6
VJ 18	13,48	0,4407	3,2
VJ 19	21,52	0,2069	0,9

Um fator que pode ser determinante no rendimento desses extratos pode estar associado a fonte de carbono e nitrogênio, bem como as condições de cultivo nas quais esses fungos são submetidos, considerando assim como possibilidade a utilização de meios de cultura alternativos com o objetivo de aumentar as porcentagens de rendimento. Uma alternativa que possibilitaria o alcance desse objetivo seria a utilização da técnica de OSMAC (*one strain many compounds*), a qual consiste na ativação de diversos genes biossintéticos silenciosos em microrganismos com a finalidade de produzir metabólitos secundários variados através da manipulação das condições de cultivo como: composição do meio de cultura, temperatura, pH, aeração, iluminação etc. (XIE et al., 2021).

### 5.3. Identificação do fungo VJ 15 por ferramentas moleculares

A partir do processo de análises por ferramentas moleculares, utilizando as sequências de DNA obtidas, estas foram analisadas na plataforma *GenBank* (figura 22), através da parceria dos colaboradores da ILMD/FioCruz. Os resultados possibilitaram a identificação do fungo VJ 15 a nível de gênero como *Diaporthe* sp. Este fungo possui porcentagem de identidade de 100%, confirmando assim a identificação para este gênero.

### 5.4. Rendimento do extrato MeOH de *Diaporthe* sp. em cultivo em escala ampliada

A partir do cultivo do fungo *Diaporthe* sp. em escala ampliada foi possível obter os seguintes valores de rendimento, exemplificados na tabela 9.

**Tabela 9.** Valores das massas miceliais, extrato e rendimento do fungo *Diaporthe* sp. em escala ampliada

Fungo	Massa micelial (g)	Massa do extrato metanólico (g)	Rendimento (%)
VJ 15 (E.A) <i>Diaporthe</i> sp	155,23	5,51	3,5%

Através dos resultados obtidos do extrato em escala ampliada de *Diaporthe* sp., observou-se um rendimento de 3,5% que ao ser comparado ao rendimento em microescala desse fungo obteve-se então um aumento na porcentagem de rendimento em 1,5%. O aumento observado no rendimento da escala ampliada, pode estar relacionado ao volume do frasco utilizado que possibilitou uma maior área para oxigenação e aeração, auxiliando no processo de produção de massa micelial do fungo e conseqüentemente refletindo no aumento desse índice. Bose e colaboradores (2019), ressaltaram a importância das condições de cultivo e da cultura fúngica como mecanismos para otimização tanto do crescimento fúngico quanto da produção de metabólitos bioativos, o que conseqüentemente pode vir a influenciar no rendimento dos fungos.

## 5.5. Prospecção química

### 5.5.1. Análises dos extratos metanólicos fúngicos por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC)

Os extratos obtidos a partir da extração dos micélios com metanol (MeOH) foram submetidos à eluição utilizando os solventes acetato de etila e acetona em proporção de 1:1 (sistema AcOEt/acetona 1:1). Os resultados foram registrados na figura 19 e tabela 10. Através das análises, foi possível observar no ponto de aplicação das cromatoplasmanchas alaranjadas demonstrando indícios de alcaloides em todos os extratos quando revelados com reagente de Dragendorff, também apresentando fluorescência no comprimento de onda UV 254 nm como ocorre na maioria dos alcaloides (WAGNER e BLADT, 1996). Além disso, todos os extratos também exibiram fluorescência na faixa UV 365 nm, o que pode inferir a presença de grupos cromóforos.

Ao serem reveladas com cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), as amostras 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, e 11 apresentaram coloração marrom na origem das cromatoplasmanchas. Neste revelador, obtiveram destaque as amostras 10, 12, 13 e 14 que apresentaram manchas variando de marrom para tons mais escuros e dentre estas, a amostra 13 (VJ 15) apresentou manchas mais intensas e escuras. Estes resultados podem indicar a presença de substâncias fenólicas, como flavonoides e taninos. Ao utilizar o revelador cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), pôde-se então confirmar a presença de substâncias fenólicas nas amostras 1, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 e 14, devido à incidência de fluorescências intensas em luz UV 365 nm.

Observou-se que os extratos revelados com sulfato cérico ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ) exibiram colorações em tons de marrom (amostras 12 e 13) e nas demais amostras apresentaram colorações mais escuras. Quando revelados com anisalaldeído sulfúrico pôde-se observar a presença de manchas em tons de roxo e rosa. Para ambos os reveladores, estes resultados inferem a presença de terpenos ou esteroides.

As amostras reveladas com vapores de iodo apresentaram manchas marrons intensas, que podem indicar presença de substâncias com insaturações e ligações duplas conjugadas.



**Tabela 10.** Classes de substâncias reveladas/grupos funcionais por CCDC dos extratos MeOH dos fungos endofíticos de *V. japurensis*

Classes de substâncias reveladas/grupos funcionais						
Nº amostra	Fungos	alcaloides	flavonoides	ligações duplas	substâncias fenólicas	terpenoides
1	VJ 01	+	+	+	+	+
2	VJ 02	+	-	+	+	+
3	VJ 07	+	-	+	-	+
4	VJ 08	+	-	+	-	+
5	VJ 10	+	+	+	+	+
6	VJ 13	+	+	+	+	+
7	VJ 17	+	+	+	+	+
8	VJ 18	+	-	+	+	+
9	VJ 19	+	+	+	+	+
10	VJ 05	+	+	+	+	+
11	VJ 11	+	+	+	+	+
12	VJ 12	+	+	+	+	+
13	VJ 15	+	+	+	+	+
14	VJ 16	+	+	+	+	+

Legendas: + Presença; - Ausência.

Os resultados apresentados corroboram com os resultados obtidos por Pedroza (2019) que realizou o estudo fitoquímico das folhas de espécies do gênero *Vismia*, incluindo *Vismia japurensis*. Neste trabalho, a autora submeteu os extratos hexânicos das folhas de *V. japurensis* à análise por CCDC utilizando como sistema de eluição hexano/acetona 9:1.

Ao analisar os extratos utilizando o revelador sulfato cérico, foi observado pela autora a presença de manchas de coloração marrom, assim como as manchas presentes nos extratos dos fungos endofíticos de *V. japurensis*. A autora também identificou ao revelar com anisaldeído sulfúrico, manchas com colorações variando entre roxo, lilás e rosa, dando o indicativo em ambos os reveladores a presença de terpenos. Ao revelar as amostras com cloreto férrico foi observada a presença de manchas escuras com coloração marrom mais clara e colorações escuras, assim como nos extratos fúngicos, podendo inferir a presença de substâncias fenólicas.

Também foi observado pela autora a possível presença de cromóforos, ao revelar o extrato em luz UV 365 nm. E por fim, foi inferido a presença de flavonoides ao utilizar o revelador NP/PEG, um revelador com finalidade similar ao cloreto de alumínio, que ao analisar na faixa de absorção de 365 nm infere a presença desta classe de substância através da intensificação das fluorescências.

No trabalho de Gomes (2024), ao isolar fungos endofíticos a partir da planta *Deguelia duckeana*, e dentre estes a espécie *Diaporthe oculi*, foi possível observar através da CCDC do extrato diclorometano do micélio desse fungo em sistema de eluição DCM/MeOH 9:1, revelando para UV 254 e 365 nm, reagente de Dragendorff, anisaldeído, sulfato cérico e cloreto férrico. Ao analisar os resultados obtidos a partir das análises por CCDC do fungo VJ 15 (*Diaporthe* sp.) (figura 19 e tabela 10) pode-se comparar com os resultados obtidos por Gomes (2024), evidenciando assim, a similaridade entre as classes reveladas através da CCDC.

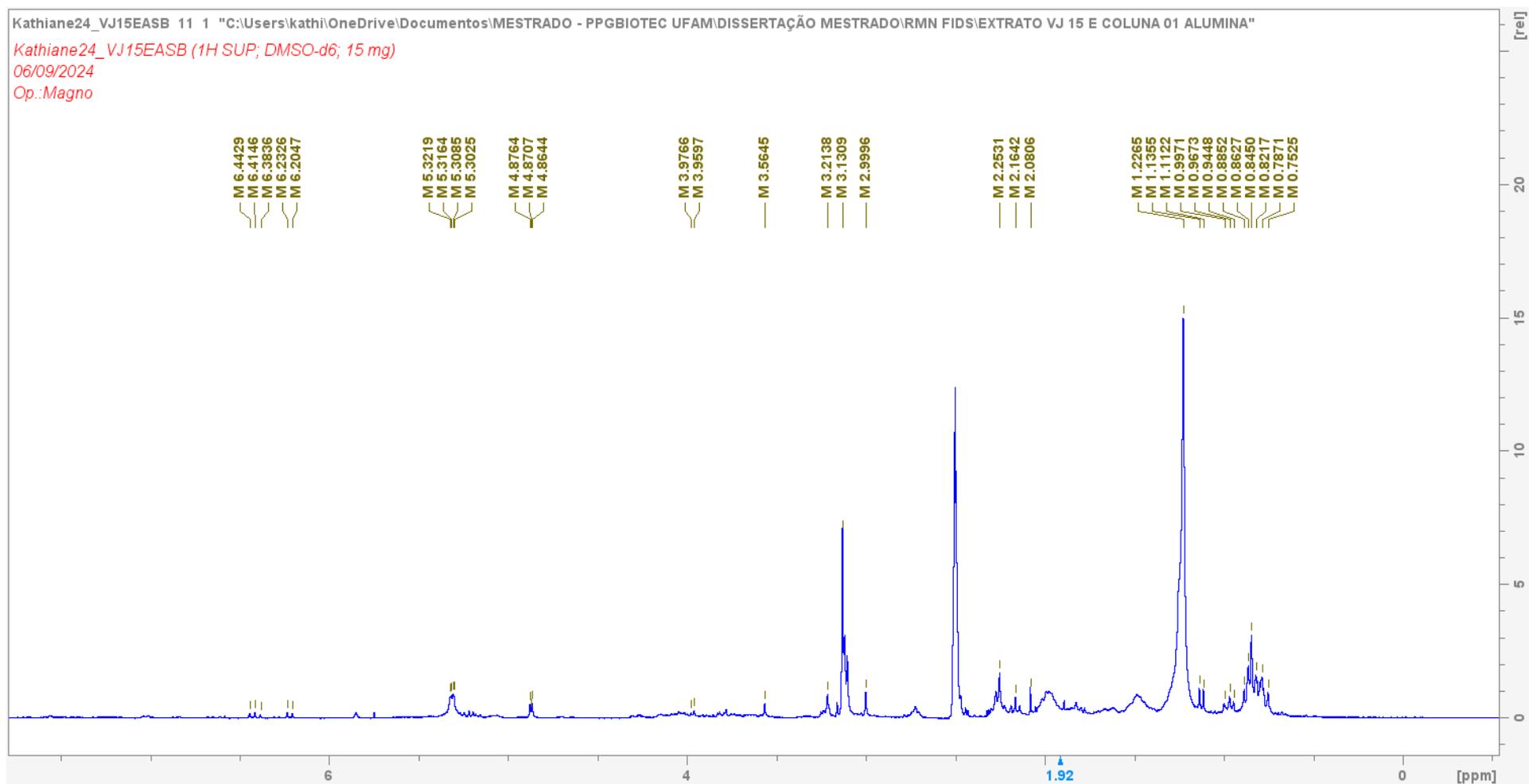
Jiang e colaboradores (2023), em seu estudo de revisão quanto aos metabólitos secundários produzidos por *Diaporthe*, ressaltam as principais classes presentes nesse gênero, sendo: alcaloides, terpenoides, quinonas, pironas, policetídeos, fenilcetonas, éteres difenílicos e compostos não esteroidais. Com isso, foi possível inferir através da CCDC a presença de classes de substâncias características de *Diaporthe* em VJ 15 (*Diaporthe* sp.).

Ademais, os resultados presentes nos outros extratos demonstram grande similaridade entre as classes de substâncias reveladas tanto no extrato da planta hospedeira quanto no extrato dos fungos endofíticos, reforçando a capacidade do endófito e hospedeiro de produzirem substâncias similares.

### **5.5.2. Análise por RMN de $^1\text{H}$ do extrato MeOH de *Diaporthe* sp. cultivado em escala ampliada**

Ao analisar o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato em escala ampliada do fungo *Diaporthe* sp. (figura 20), foi possível observar sinais característicos de hidrogênios metílicos na faixa de 0,5 a 1,2 ppm. Também foi possível observar sinais hidrogênios de anéis aromáticos (6 a 8,5 ppm). Observou-se na região dos deslocamentos de 3 a 4,5 ppm, sinais característicos de hidrogênios de carbonos ligados a heteroátomos e na região entre 5 a 5,5 ppm sinais de carbonos de ligações duplas.

**Figura 20.** Espectro de  $^1\text{H}$  do extrato MeOH do micélio de VJ 15 (*Diaporthe* sp.) cultivado em escala ampliada



### 5.5.3. Análise cromatográfica da fase AcOEt e fase hidrometanólica de *Diaporthe* sp.

As fases acetato de etila e hidrometanólica foram eluídas em sistema DCM/MeOH 94:6 e MeOH 100% (reagente de Dragendorff) e seus resultados estão registrados na figura 21. Ao analisar as cromatoplasas nos reveladores físicos UV 254 e 365 nm observou-se na fase AcOEt (**amostra 1**) a presença de fluorescências em ambos os comprimentos de onda. Relacionando esses resultados com os observados no revelador químico reagente de Dragendorff, o qual apresentou mancha intensa laranja pode-se inferir a possível presença de alcaloides nessa amostra. Em contrapartida, a fase hidrometanólica (**amostra 2**) apresentou manchas na origem nos reveladores físicos e não apresentou manchas no reagente de Dragendorff.

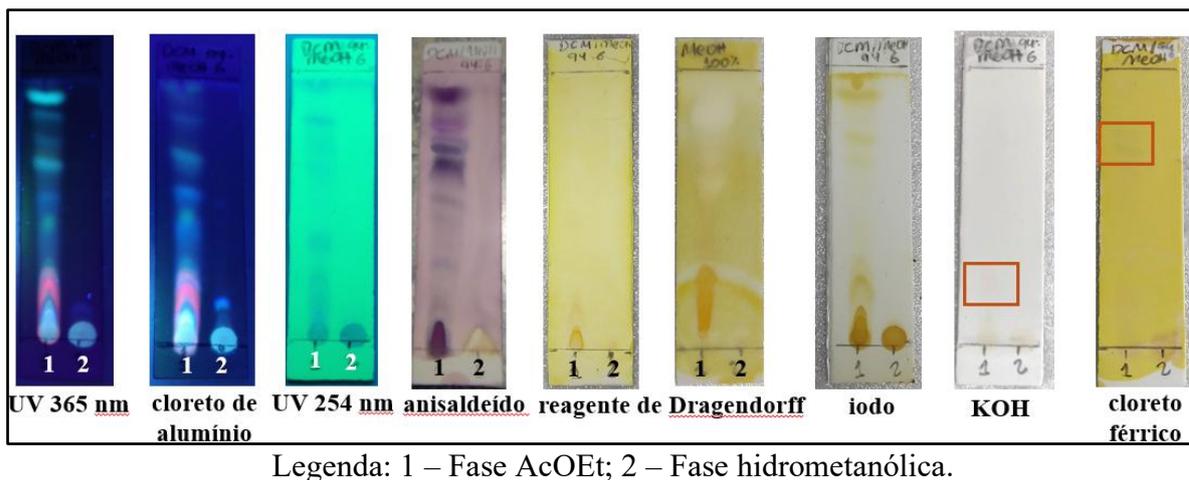
No revelador cloreto férrico, a fase AcOEt apresentou uma leve mancha marrom. A fase hidrometanólica exibiu mancha similar, porém, no ponto de origem. Esses resultados levam a inferir a presença de substâncias fenólicas, como flavonoides e taninos nas fases. Quando reveladas com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), pôde-se então confirmar a presença de substâncias fenólicas nas fases, com destaque para a fase AcOEt que apresentou maior diversidade de possíveis classes de substâncias.

Ao serem reveladas com anisaldeído, a fase AcOEt apresentou uma ampla quantidade de manchas variando de intensidade com coloração roxa. Estes resultados inferem a presença de terpenos ou esteroides. A fase hidrometanólica apresentou manchas leves de coloração roxa.

Ao serem analisadas com revelador KOH foi possível observar uma mancha levemente rosada, podendo inferir a presença de antraquinonas nessa amostra. A fase hidrometanólica não apresentou manchas similares a fase AcOEt.

No revelador vapor de iodo, a fase AcOEt apresentou manchas marrons intensas, formando várias bandas que podem indicar a presença de substâncias com insaturações e duplas ligações conjugadas. A fase hidrometanólica apresentou mancha marrom intensa na origem da cromatoplasa.

**Figura 21.** Cromatoplas das fases AcOEt e hidrometanólica do extrato MeOH do micélio de *Diaporthe* sp.



#### 5.5.4. Identificação das substâncias isoladas

A partir do fracionamento da fase AcOEt de *Diaporthe* sp. foi possível isolar as substâncias (1) e (2) (figura 22) em mistura da fração F27-28 (F14-16) (7 mg) (figura 22). Ao ser analisada por CCDC revelou manchas alaranjadas em reagente de Dragendorff, apresentando características de substâncias nitrogenadas (figura 23). Os dados acerca das análises espectroscópicas por Ressonância Magnética Nuclear de ambas as substâncias estão listados na tabela 11, p. 65.

**Figura 22.** Estrutura das substâncias (1) e (2)



**Figura 23.** Cromatoplaça de CCDC da F27-28 revelada em reagente de Dragendorff.  
Sistema: DCM/MeOH 2:8



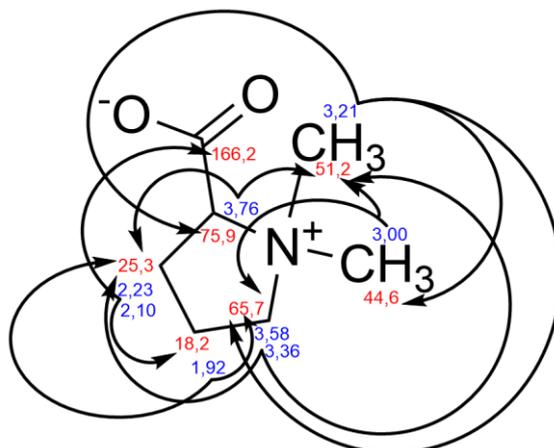
Fonte: Kathiane Reboucas, 2024.

#### 5.5.4.1. Substância 1: prolina betaína

Para a substância **(1)**, o mapa de correlação HSQC (figura 30) mostrou que o sinal do H em  $\delta$  3,76 correlaciona diretamente com o sinal do C em  $\delta$  75,9. O H em  $\delta$  3,58 e  $\delta$  3,36 correlacionam com o C em  $\delta$  65,7. O H em  $\delta$  3,21 correlaciona com o C em  $\delta$  51,2. O H em  $\delta$  3,00 correlaciona com o C em  $\delta$  44,6. O sinal de H em  $\delta$  2,23 e  $\delta$  2,10 correlacionam diretamente com o sinal de C em  $\delta$  25,3, e o H em  $\delta$  1,92 correlaciona com o C em  $\delta$  18,2.

O mapa de correlação HMBC (figura 29) mostrou correlação a distância do sinal de H em  $\delta$  3,76 com os sinais de C em  $\delta$  25,3,  $\delta$  44,6,  $\delta$  51,2 e  $\delta$  166,2. O sinal de H em  $\delta$  3,58 correlaciona com os sinais de C em  $\delta$  18,2,  $\delta$  25,3,  $\delta$  44,6,  $\delta$  51,2,  $\delta$  75,9 e  $\delta$  166,2. O sinal de H em  $\delta$  3,36 correlaciona com os sinais de C em  $\delta$  18,2,  $\delta$  44,6 e  $\delta$  51,2. O sinal de H em  $\delta$  3,21 correlaciona com os sinais de C em  $\delta$  44,6,  $\delta$  65,7 e  $\delta$  75,9. O sinal de H em  $\delta$  3,00 correlaciona com os sinais de C em  $\delta$  51,2,  $\delta$  65,7 e  $\delta$  75,9. O sinais de H em  $\delta$  2,23 e  $\delta$  2,10 correlacionam com os sinais de C em  $\delta$  18,2,  $\delta$  65,7,  $\delta$  75,9 e  $\delta$  166,2. O sinal de H em  $\delta$  1,92 correlaciona com os sinais de C em  $\delta$  25,3,  $\delta$  65,7 e  $\delta$  75,9. As principais correlações por HMBC da substância **(1)** estão ilustradas na figura 24.

**Figura 24.** Principais correlações de HMBC da substância (1)



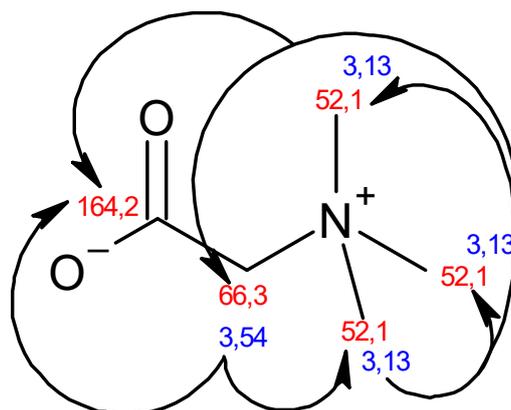
O mapa de correlação COSY mostrou que o sinal do H em  $\delta$  3,76 correlaciona com os sinais de H em  $\delta$  2,23 e  $\delta$  2,10. O sinal de H em  $\delta$  3,58 correlaciona com os sinais de H em  $\delta$  1,92 e  $\delta$  3,36. O sinal de H em  $\delta$  2,10 correlaciona com o sinal de H em  $\delta$  1,92, e o sinal de H em  $\delta$  1,92 correlaciona com os sinais de H em  $\delta$  3,36,  $\delta$  2,23 e  $\delta$  3,58. Sendo assim, de acordo com a literatura científica consultada, a substância pôde ser identificada como prolina betaina (1).

#### 5.5.4.2. Substância 2: glicina betaina

Para a substância (2), o mapa de correlação HSQC (figura 30) mostra que o sinal do H em  $\delta$  3,54 correlaciona diretamente com o sinal do C em  $\delta$  66,3, e o H em  $\delta$  3,13 correlaciona com o C em  $\delta$  52,1.

As correlações por HMBC (figura 25) mostram que o sinal do H em  $\delta$  3,54 correlaciona com os sinais de C em  $\delta$  52,1 e  $\delta$  164,2. E o sinal de H em  $\delta$  3,13 correlaciona com os sinais de C em  $\delta$  52,1,  $\delta$  66,3 e  $\delta$  164,2.

Figura 25. Correlações de HMBC da substância (2)



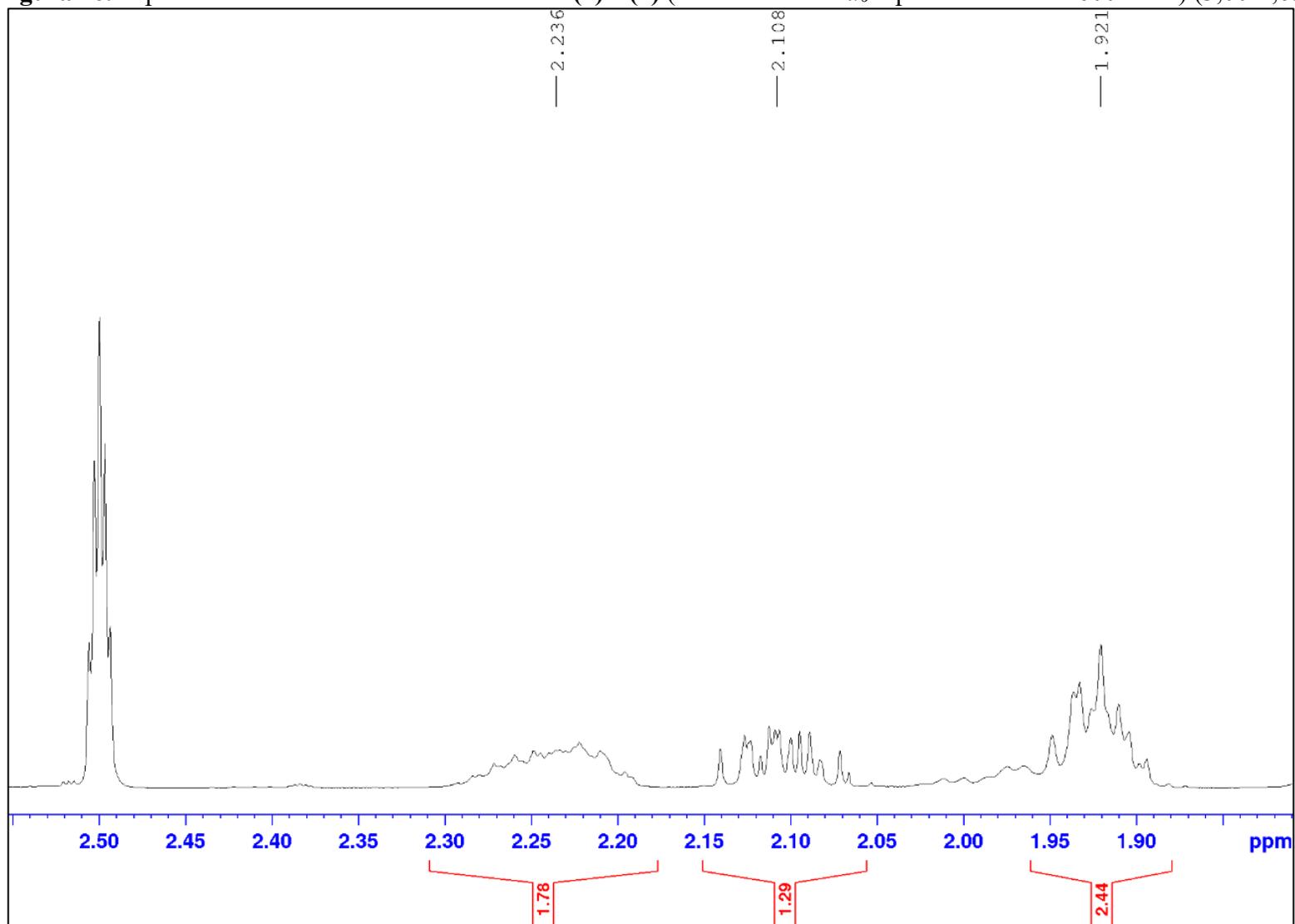
Não houve correlações de COSY para a substância (2), devido à ausência de hidrogênios vizinhos próximos. Sendo assim, de acordo com a literatura científica consultada, a substância pôde ser identificada como glicina betaína (2).

**Tabela 11.** Dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  das substâncias prolina betaína (1) em dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ , 600 MHz) comparados com os dados de CHAMBERS e KUNIN (1987) realizado em metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz) e glicina betaína (2) (DMSO- $d_6$ , 600 MHz), comparada em água deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) (TAKIS et al., 2015).

P	prolina betaína				glicina betaína			
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$ (lit)	$^1\text{H}$ (lit)	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$ (lit)	$^1\text{H}$ (lit)
1	166,2	-	170,76	-	164,2	-	171,84	-
2	75,9	3,76 ( <i>dd</i> ) ( $J = 10,5$ ; 8,8 Hz)	77,9	4,00 ( <i>dd</i> ) ( $J = 8,85$ ; 8,78 Hz)	66,3	3,54 ( <i>s</i> )	68,93	3,89 ( <i>s</i> )
3	25,3	2,23 ( <i>m</i> ) 2,10 ( <i>m</i> )	26,65	2,25 ( <i>m</i> ) 2,55 ( <i>m</i> )	-	-	-	-
4	18,2	1,92 ( <i>m</i> )	19,84	2,10 ( <i>m</i> ) 2,20 ( <i>m</i> )	-	-	-	-
5	65,7	3,58 ( <i>m</i> ) 3,36 ( <i>m</i> )	68,05	3,45 ( <i>m</i> ) 3,55 ( <i>m</i> )	-	-	-	-
CH <sub>3</sub>	51,2	3,21 ( <i>s</i> )	52,77	3, 35 ( <i>s</i> )	52,1	3,13 ( <i>s,9H</i> )	56,08	3,25 ( <i>s</i> )
CH <sub>3</sub>	44,6	3,00 ( <i>s</i> )	46,41	3, 15 ( <i>s</i> )	52,1	3,13 ( <i>s,9H</i> )	56,08	3,25 ( <i>s</i> )
CH <sub>3</sub>	-	-	-	-	52,1	3,13 ( <i>s,9H</i> )	56,08	3,25 ( <i>s</i> )

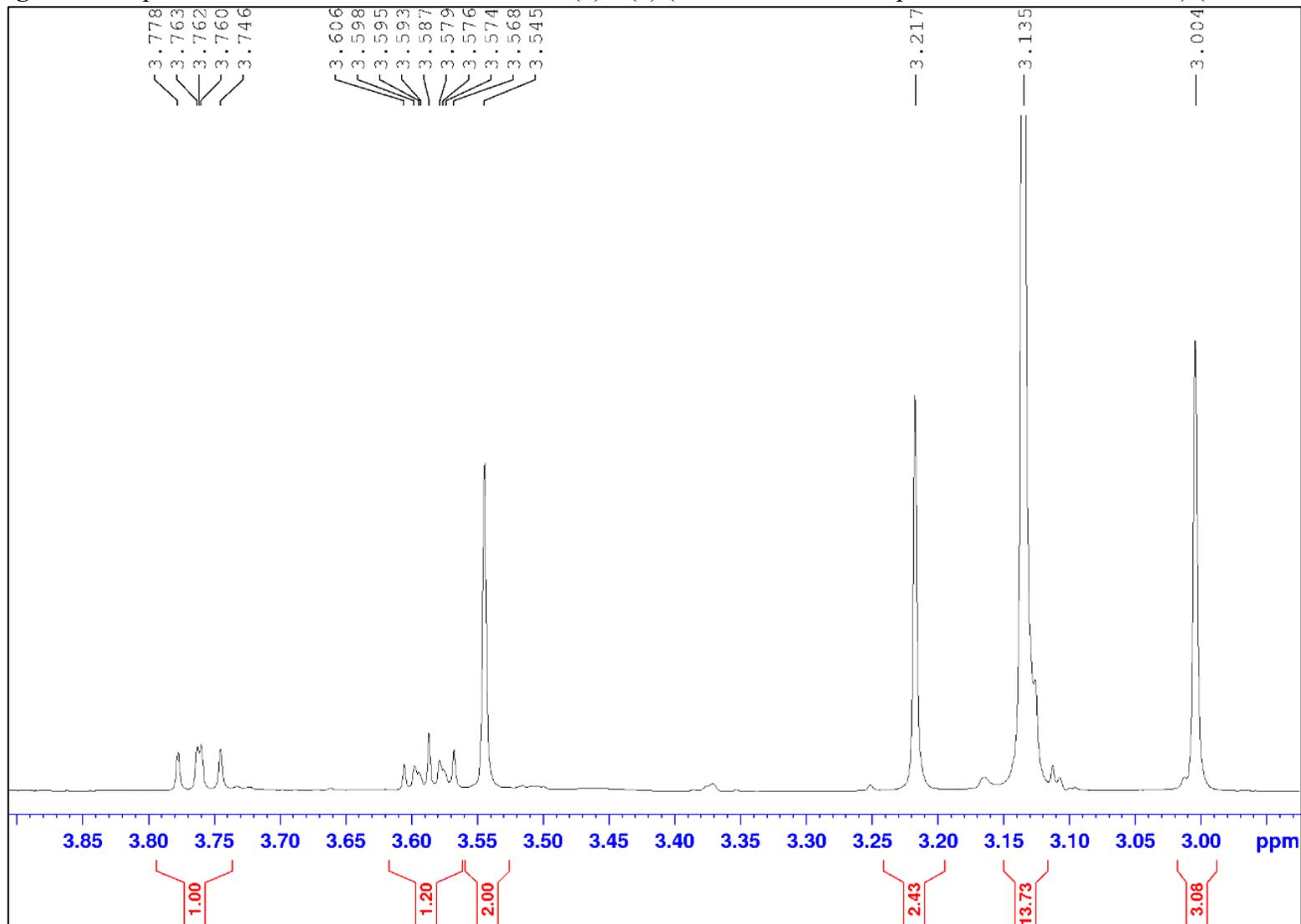
Legenda: **P**: posição; (*dd*) duplo duplete; (*m*): multiplete; (*s*): singlete; -: ausência.

**Figura 26.** Espectro de  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias **(1)** e **(2)** (solvente  $\text{DMSO}d_6$  – padrão DMSO – 600 MHz) (3,00-1,65 ppm)



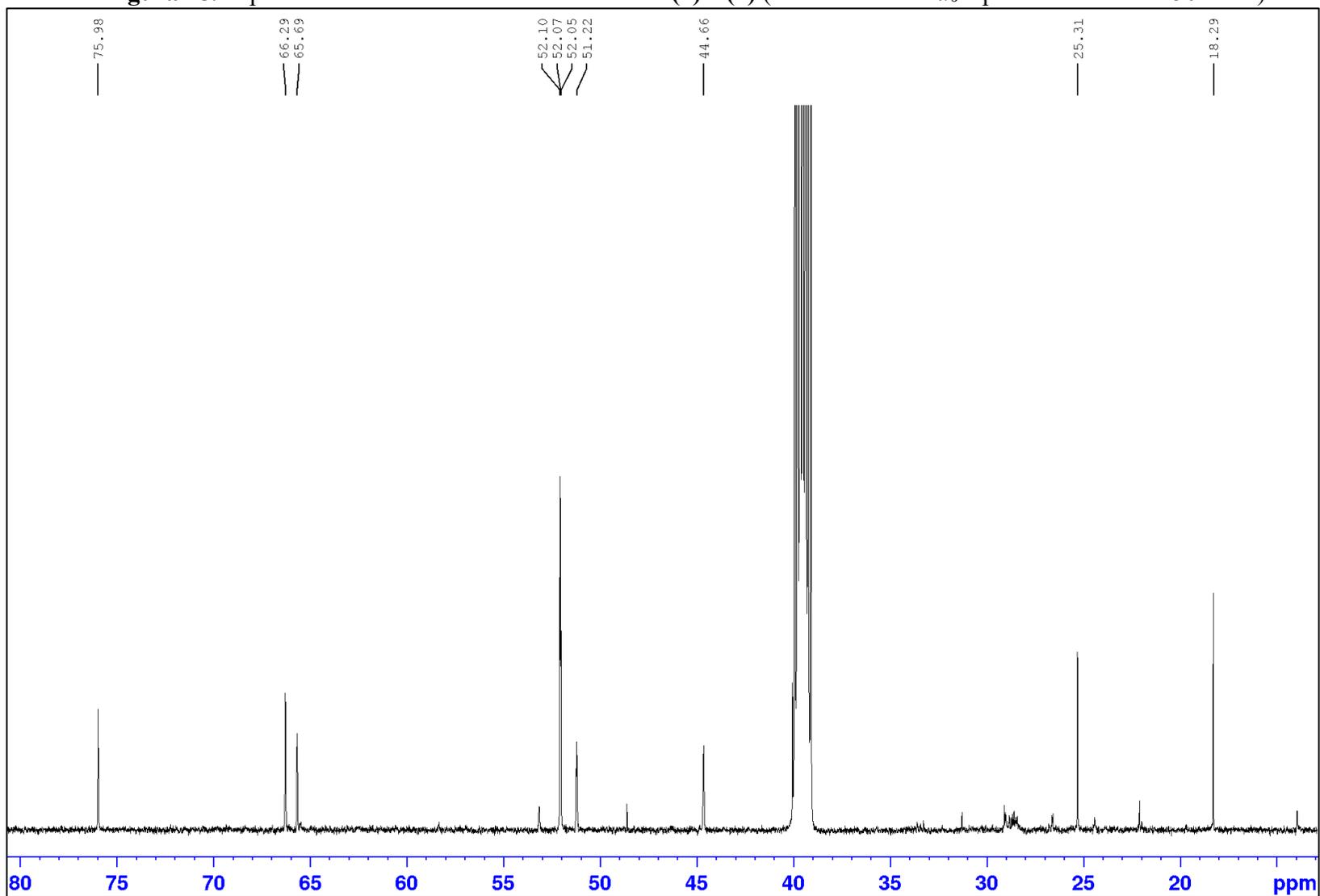
Fonte: Software *TopSpin* 4.4.1, 2025.

Figura 27. Espectro de  $^1\text{H}$  da mistura das substâncias (1) e (2) (solvente  $\text{DMSO-d}_6$  – padrão DMSO – 600 MHz) (3,90-2,50 ppm)



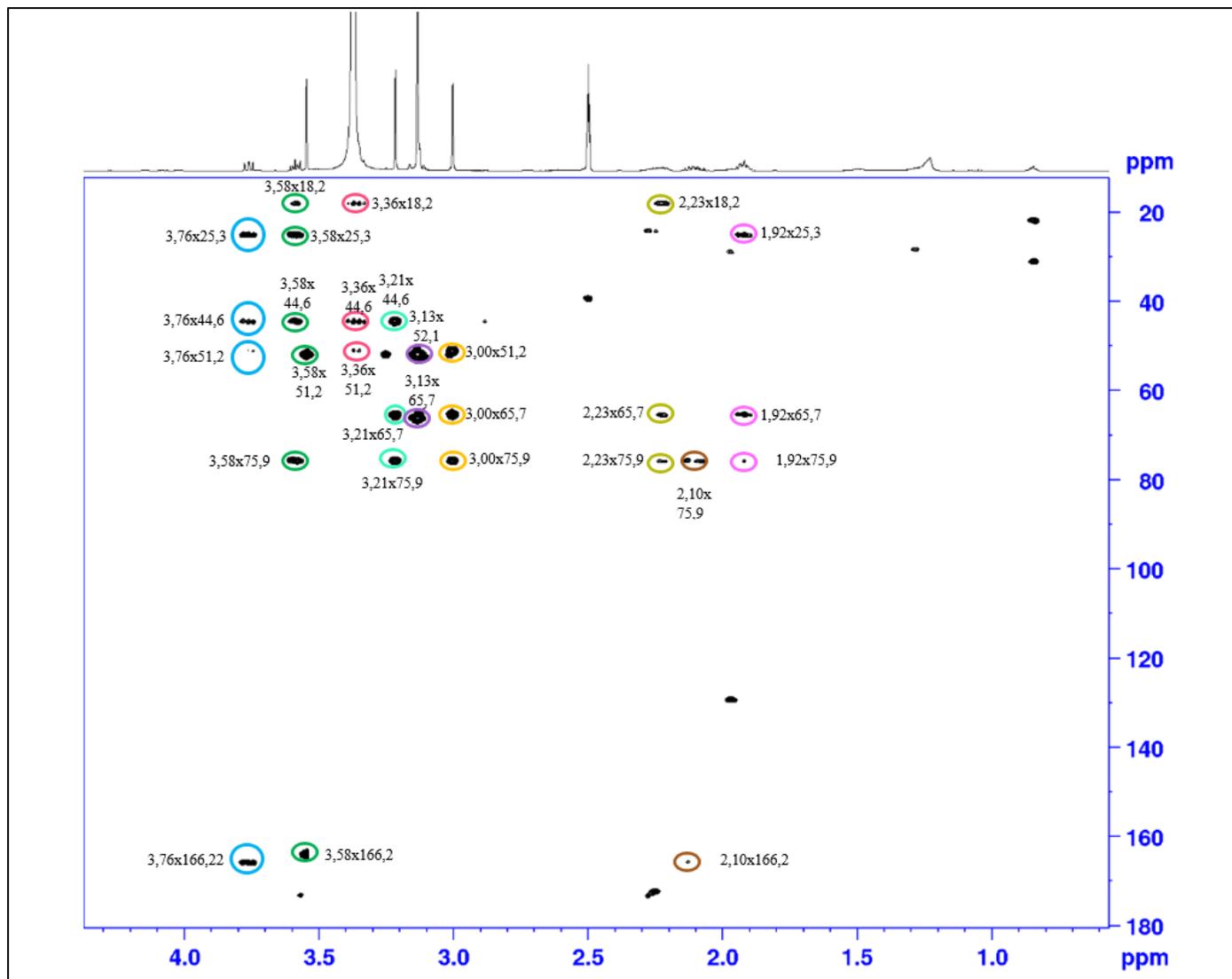
Fonte: Software *TopSpin* 4.4.1, 2025.

**Figura 28.** Espectro de  $^{13}\text{C}$  da mistura das substâncias **(1)** e **(2)** (solvente  $\text{DMSO}d_6$  – padrão DMSO – 150 MHz)

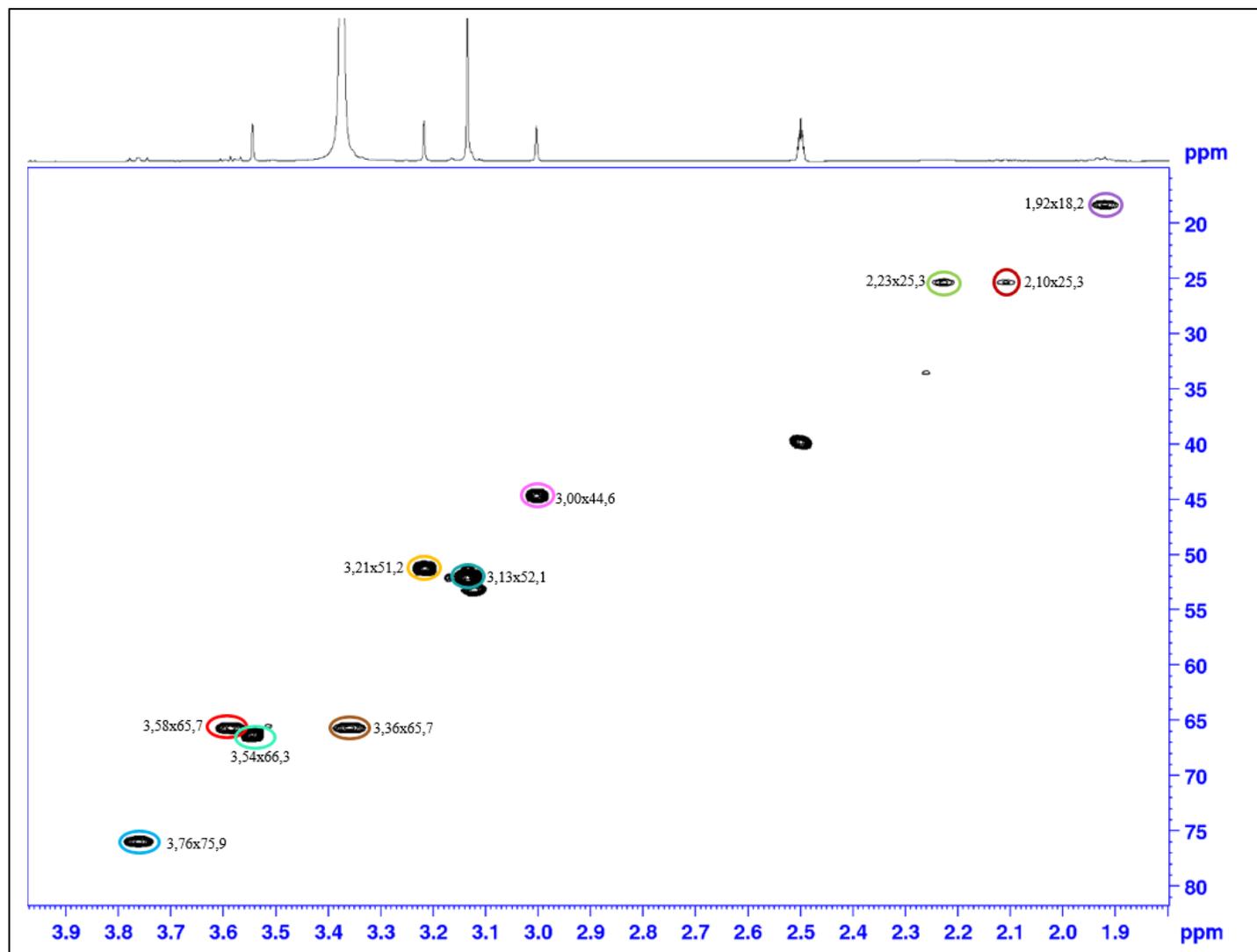


Fonte: Software *TopSpin* 4.4.1, 2025.

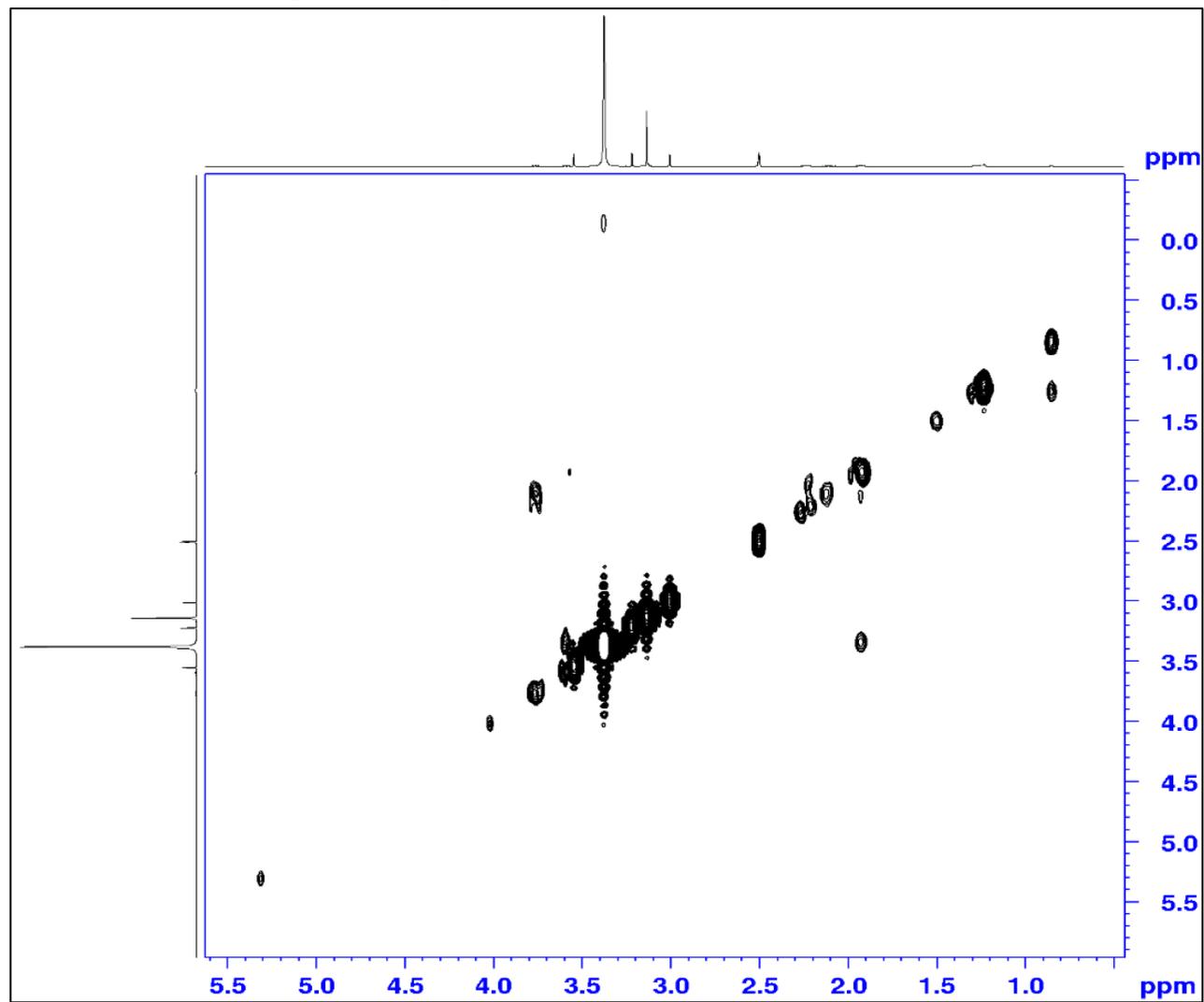
**Figura 29.** Mapa de correlação HMBC das substâncias (1) e (2)



Fonte: Software *TopSpin* 4.4.1, 2025.

**Figura 30.** Mapa de correlação HSQC das substâncias (1) e (2)

Fonte: Software *TopSpin* 4.4.1, 2025.

**Figura 31.** Mapa de correlação COSY da substância (1)

Fonte: Software *TopSpin* 4.4.1, 2025.

As substâncias prolina betaína (1) e glicina betaína (2) pertencem aos compostos osmoprotetores conhecidos como betaínas, sendo descobertas pela primeira vez na beterraba e posteriormente encontradas em diversos microrganismos, invertebrados marinhos, plantas e animais. A betaína foi descoberta e isolada por Scheibler em 1866 a partir da beterraba (*Beta vulgaris*) e nomeada “betaína”. No contexto de produção desses compostos por plantas, algumas espécies distintas podem sintetizá-los quando expostas a condições de estresse abiótico como: seca, salinidade e baixas temperaturas, todavia, o fato de não serem produzidos por grande parte das plantas não inutiliza a capacidade de outras espécies vegetais em assimilar tais compostos, como por exemplo, através de suplementação (RHODES e HANSON, 1993).

Do ponto de vista químico, as betaínas, são definidas como moléculas derivadas a partir de aminoácidos existentes na forma zwitteriônica (forma dipolar) em pH neutro, contendo uma carga positiva permanente do grupo amino e uma carga negativa derivada de um grupo carboxílico. Porém, existem algumas betaínas que são classificadas como alcaloides, sendo compostos sintetizados geralmente a partir de aminoácidos com nitrogênio heterocíclico. Alguns exemplos são: prolina betaína, que é um alcaloide pirrolidínico, e a trigonelina, um alcaloide piridínico (SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ; MARINA ALEGRE; CREGO NAVAZO, 2015).

A betaína também pode ser encontrada em microrganismos incluindo bactérias e fungos. Isso se deu a partir da descoberta de Galinski e Truper (1982), onde estes relataram a utilização da betaína na bactéria *Halorhodospira halochloris*. Esse estudo gerou desdobramentos e incentivou a pesquisa a respeito da biossíntese e utilização de betaína em outras espécies de microrganismos, o que levou a identificação da produção dessa substância em bactérias, tais como: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Arthrobacter globiformis*. (SAKAMOTO et al., 2000; OREN et al., 2013). Grande parte dos microrganismos produtores e assimiladores da betaína, o fazem com a finalidade de se protegerem contra estresses abióticos e para sua nutrição, estando o último provavelmente relacionado as funções que a betaína possui quanto a um nutriente de crescimento para os microrganismos (ZOU et al., 2016).

Quanto a aplicabilidade biotecnológica dessas substâncias, a betaína pode ser utilizada na indústria através do melhoramento do desempenho de cepas microbianas industriais, através de suplementação. Como exemplo tem-se a utilização de betaína em lactobacilos como forma de melhorar a taxa de sobrevivência desse microrganismo quando submetidos a processos de desidratação, armazenamento e reidratação (SELMER-OLSEN et al., 1999).

Relacionado aos fungos, estes vem sendo estudados quanto a produção e utilização da betaína, sendo a sua via de biossíntese recentemente encontrada nesses microrganismos. Além disso, estudos bioquímicos e moleculares como o desenvolvido por Lambou e colaboradores (2013), indicaram que a betaína nos fungos, não está envolvida na regulação de estresse, mas desempenha uma função exclusiva auxiliando como nutriente para os fungos.

Estudos recentes com fungos endofíticos, vem relatando a presença de substâncias relacionadas a via biossintética da betaína, desencadeando no descobrimento de substâncias inéditas, como é o caso do estudo desenvolvido por Singh e colaboradores (2021) que isolaram uma substância inédita denominada serina-glicina-betaina a partir do fungo endofítico *Macrophomina phaseolina*. A substância em questão, foi testada frente a quatro linhagens de células cancerígenas, apresentando potente atividade anticâncer frente as linhagens de células MIA PaCa-2 (câncer de pâncreas) e HCT-116 (câncer de colón) com valores de IC<sub>50</sub> de 8.9 e 15.16  $\mu\text{mol l}^{-1}$ .

Portanto, evidencia-se que substâncias pertencentes as betaínas podem se tornar de grande valor para a biotecnologia de modo geral, podendo ser aplicáveis como produtos farmacológicos e como suplementos em bioprocessos. Por se tratar de substâncias não tão comuns em fungos, é necessário maiores investigações a respeito de seus mecanismos de ação nesses microrganismos em específico, todavia, mostram-se como substâncias promissoras e possíveis de serem obtidas e estudadas a partir de fungos endofíticos, como relatado no presente trabalho.

## **5.5. Ensaio biológicos**

### **5.5.5. Ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* Leach.**

Através da análise dos resultados obtidos do ensaio de toxicidade, foi possível observar que os extratos dos fungos VJ 01, VJ 05, VJ 07, VJ 08 e VJ 15 apresentaram porcentagens elevadas de mortalidade na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (tabela 12). Nesse ensaio, o extrato VJ 15 teve destaque quanto a sua toxicidade, já que na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  apresentou mortalidade de 66% e em 500  $\mu\text{g/mL}$  de 33%, sendo entre todos os extratos aquele que manteve porcentagem de mortalidade moderada em concentração menor que 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 12.** % de mortalidade de *A. salina* submetida aos extratos fúngicos de *V. jاپurensis*

<b>Código do Fungo</b>	<b>Mortalidade (%) 1000 μg/mL</b>	<b>Mortalidade (%) 500 μg/mL</b>
VJ 01	53%	3%
VJ 02	10%	3%
<b>VJ 05</b>	<b>96%</b>	<b>6%</b>
VJ 07	53%	0
VJ 08	43%	0
VJ 10	6%	3%
VJ 11	0	0
VJ 12	0	0
VJ 13	13%	0
<b>VJ 15</b>	<b>66%</b>	<b>33%</b>
VJ 16	0	0
VJ 17	3%	0
VJ 18	13%	0
VJ 19	10%	3%
<b>C+</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>C-</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Neste ensaio, para determinação da atividade tóxica foi considerado o padrão estabelecido por Harwig e Scott (1971), que classificam a toxicidade frente as larvas de *A. salina* como: não tóxico (NT), ligeiramente tóxico (LT), tóxico (T) e altamente tóxico (AT) seguindo diferentes valores de mortalidade em porcentagem (tabela 13).

**Tabela 13.** Classificação da toxicidade de extratos de acordo com a mortalidade de larvas de *A. salina*.

<b>Mortalidade (em %)</b>	<b>Classificação (sigla)</b>
0 – 9%	Não tóxico (NT)
10 – 49%	Ligeiramente tóxico (LT)
50 – 89%	Tóxico (T)
90 – 100%	Altamente tóxico (AT)

Fonte: Adaptado de Harwig e Scott, 1971.

Ao comparar os resultados obtidos do ensaio com a classificação de toxicidade de Harwig e Scott (tabela 13), é possível observar que o extrato VJ 05 por apresentar porcentagem de mortalidade de 96% na concentração de 1000 μg/mL, enquadra-se como altamente tóxico, porém, em 500 μg/mL este mesmo extrato é considerado não tóxico devido a mortalidade de 6%. O extrato VJ 07 por apresentar mortalidade de 53% é considerado tóxico. O extrato VJ 08

é classificado como ligeiramente tóxico devido sua porcentagem de mortalidade de 43%. O destaque da classificação de toxicidade pode ser atribuído ao extrato VJ 15, que é classificado como tóxico em concentração de 1000 µg/mL, com porcentagem de mortalidade de 66% e como ligeiramente tóxico em concentração de 500 µg/mL com mortalidade de 33%. Os extratos que se apresentaram como não tóxicos nas duas concentrações testadas foram VJ 11, VJ 12 e VJ 16). Em concentrações menores como a de 500 µg/mL houve uma baixa porcentagem de mortalidade na maioria dos extratos, com exceção do extrato VJ 15, classificando esses extratos como não tóxicos (tabela 13).

Em estudo desenvolvido por Pedroza (2019), no qual foram avaliados os extratos hexânicos, metanólicos e aquosos das folhas de *V. japurensis* frente a *Artemia salina*, a autora obteve como resultados porcentagens de mortalidade de 100% na concentração de 1000 µg/mL para os extratos hexânicos na 1ª e 2ª coleta. Os extratos metanólicos, apresentaram como resultados 33% e 26% de mortalidade em 1000 µg/mL na 1ª e 2ª coleta, respectivamente. Os extratos aquosos não apresentaram porcentagens de mortalidade em ambas as coletas. Todos os extratos testados na concentração de 500 µg/mL foram considerados não tóxicos por não haver mortalidade das larvas.

No estudo de Osório (2019), ao analisar os extratos hexânicos, metanólicos e aquosos dos ramos de *V. japurensis* frente a *Artemia salina*, obtiveram-se como resultados para os extratos hexânicos mortalidade de 96% para o extrato da 1ª coleta e 63% para o extrato da 3ª coleta na concentração de 1000 µg/mL. Os extratos metanólicos apresentaram mortalidade de 6% no extrato da primeira coleta e 83% para o extrato da 3ª coleta em 1000 µg/mL. Os extratos aquosos apresentaram porcentagens de 3% em ambas as coletas.

Estudos como estes revelam a capacidade tóxica dos extratos de *Vismia japurensis*, tanto no aspecto fitoquímico da planta hospedeira, como pelos metabólitos produzidos por seus endófitos, como trata o presente trabalho. Nesse sentido, os extratos metanólicos dos fungos endofíticos de *V. japurensis* se mostram promissores no contexto de toxicidade, abrindo possibilidades para testes mais específicos como citotóxico ou antitumoral. Além disso, tanto os resultados tóxicos quanto os não tóxicos ao serem comparados com as análises químicas dos extratos MeOH por CCDC inferem que em ambos os casos, há a presença de substâncias bioativas de interesse que podem ser futuramente investigadas quanto suas atividades biológicas e química.

### **5.5.6. Ensaio antibacteriano dos extratos metanólicos dos fungos endofíticos de *V. japurensis***

Os resultados do ensaio antibacteriano estão apresentados na tabela 14. Dos 14 extratos fúngicos testados três apresentaram atividades, sendo estas, frente às cepas de *Morganella morganii* e *Staphylococcus aureus*. O padrão estabelecido para a atividade foi considerado a partir do formulário antibacteriano utilizado pelo Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia (LABB). Com isso, os extratos com valores acima dos 50% de inibição foram considerados com boa atividade, entre 49 e 35% com atividade moderada e abaixo dos 35% com atividade insuficiente. Os extratos VJ 10 e VJ 12 apresentaram boa atividade, com porcentagens de inibição de 51% e 58% frente a *M. morganii*, respectivamente. O destaque para atividade antibacteriana foi atribuído ao extrato VJ 15 que apresentou a maior porcentagem de inibição de 69% frente à cepa de *Staphylococcus aureus*. Os demais extratos não apresentaram atividades significativas frente as cepas bacterianas testadas.

**Tabela 14.** Dados da atividade antibacteriana em porcentagem de inibição dos extratos metanólicos dos fungos endofíticos de *V. jaturensis* frente a bactérias patogênicas

% inibição frente cepas bacterianas (1000 µg/mL)	% inibição frente cepas									
	AB	AH	EC	EF	KP	MM	PA	SA	SE	SM
VJ 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VJ 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VJ 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VJ 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VJ 07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VJ 08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>VJ 10</b>	-	-	-	-	-	<b>51% ±0,01</b>	-	-	-	-
VJ 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>VJ 12</b>	-	-	-	-	-	<b>58% ±0,03</b>	-	-	-	-
VJ 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>VJ 15</b>	-	-	-	-	-	-	-	<b>69% ±0,01</b>	-	-
VJ 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VJ 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VJ 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VJ 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C+	99,79	99,79	99,88	99,95	99,89	99,87	99,85	99,84	99,90	99,83
C-	5,33	2,70	4,14	28,53	6,17	7,90	4,28	6,47	5,48	3,40

Legendas: **AB** – *Acinetobacter baumannii*; **AH** - *Aeromonas hydrophila*; **EC** - *Escherichia coli*; **EF** - *Enterococcus faecalis*; **KP** - *Klebsiella pneumoniae*; **MM** - *Morganella morganii*; **PA** - *Pseudomonas aeruginosa*; **SA** - *Staphylococcus aureus*; **SE** - *Salmonella enterica*; **SM** - *Serratia marcescens*; C+: controle positivo (oxitetraciclina); C-: controle negativo (DMSO 5%); - Ausência de atividade frente as cepas testadas; ± Desvio Padrão. Fonte: Kathiane Reboucas, 2023.

A família Hypericaceae possui espécies que apresentam atividades antimicrobianas relatadas na literatura (XIAO; MU; GIBBONS, 2020; DIEL et al., 2021; AJAO E MOTEETEE, 2023). Quanto a avaliação dessas atividades por fungos endofíticos, tem-se destaque o gênero *Hypericum*. Na literatura, endófitos de *Hypericum* foram isolados e avaliados quanto o seu potencial antimicrobiano. Outros gêneros de Hypericaceae, como: *Cratoxylum*, *Eliea*, *Harungana*, *Psorospermum* e *Vismia*, ainda não foram estudados de forma detalhada a respeito de seus endófitos e seu potencial frente a microrganismos patogênicos.

Em estudo desenvolvido por Casella e colaboradores (2013), além do trabalho de coleta, isolamento e identificação de fungos endofíticos de espécies vegetais da Guiana Francesa, incluindo três espécies do gênero *Vismia*, estes autores realizaram ensaios antimicrobianos com os extratos fúngicos obtidos. O ensaio foi realizado através do método de concentração inibitória mínima (CIM). Os autores relataram como resultados que dentre os 138 extratos testados para esta atividade, quatro extratos (2,9% do total de amostras) apresentaram atividade antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus* (CIM  $\leq$  128  $\mu\text{g/mL}$ ).

No estudo de Alexandre (2018) com o fungo endofítico *Diaporthe hongkongensis* quanto sua atividade antibacteriana, o autor destaca através de resultados de atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, que este fungo endofítico provavelmente produziu substâncias específicas para essa espécie bacteriana. Tal cenário, pode ser o mesmo identificado quanto ao presente estudo.

Outro ponto a ser levantado relaciona-se as características da parede celular de *S. aureus*, bactéria gram-positiva que contém uma parede celular que apesar de espessa com peptidoglicanos de multicamadas, por haver ausência de uma membrana externa, pode apresentar redução significativa da sua proteção contra substâncias com propriedades antibióticas (SWANDINY et al., 2025).

Com isso, observa-se que os fungos endofíticos de espécies da família Hypericaceae são potencialmente produtores de substâncias antibacterianas.

### 5.5.7. Análise de toxicidade frente a *Artemia salina* do extrato escala ampliada e fase AcOEt e hidrometanólica

Os dados obtidos a partir do ensaio de toxicidade frente a *A. salina* do extrato em escala ampliada, bem como das fases AcOEt e hidrometanólica estão registrados na tabela 15.

**Tabela 15.** porcentagem de mortalidade de *A. salina* submetida ao extrato metanólico escala ampliada e fases AcOEt e hidrometanólica do fungo VJ 15

Código do Fungo	Mortalidade (%) 1000 µg/mL	Mortalidade (%) 500 µg/mL
VJ 15 Ext. E.A	10%	10%
VJ 15 F.AcOEt	6,6%	6,6%
VJ 15 F.H <sub>2</sub> O+MeOH	6,6%	6,6%
<b>C+</b>	<b>100%</b>	<b>100%</b>
<b>C-</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Legenda: C+ - Controle positivo (dicromato de potássio); C- Controle negativo (DMSO+água salina).

Ao analisar o extrato em escala ampliada, bem como as fases acetato de etila e hidrometanólica frente a *A. salina*, foi possível observar taxas de mortalidade baixas, variando entre 6 a 10%. O extrato da escala ampliada apresentou a maior taxa de mortalidade dentre todas as amostras testadas, com 10% de mortalidade nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL. As fases testadas apresentaram as mesmas porcentagens de mortalidade em ambas as concentrações, sendo 6,6%. Ao verificar os resultados obtidos da mortalidade com a classificação de Harwing e Scott (tabela 13) é possível classificar o extrato em escala ampliada como ligeiramente tóxico (10 % mortalidade - 1000 e 500 µg/mL) e as fases como não tóxicas (6,6% - 1000 e 500 µg/mL).

No estudo realizado por Cherigo e colaboradores (2024), o qual consistia na bioprospecção do potencial biomédico de fungos endofíticos isolados dos manguezais panamenhos, ao testarem os extratos brutos desses fungos frente à *Artemia salina*, verificaram que não houve toxicidade em nenhum dos extratos em todas as concentrações testadas (1000, 500, 250 e 125 µg/mL), entretanto, esses resultados, segundo os autores, são importantes pois indicam que os extratos atóxicos podem ser inofensivos para células de mamíferos, podendo serem utilizadas para outros bioensaios e aplicações.

Apesar das baixas porcentagens de mortalidade e classificação de toxicidade, tais resultados destacam mais uma vez a possibilidade de utilização desses extratos e fases para outras atividades que não envolvam a capacidade tóxica dessas amostras, podendo estes serem eficientes em outras atividades biológicas testadas.

### 5.5.8. Ensaio Antibacteriano do extrato escala ampliada e fase AcOEt

Os resultados do ensaio antibacteriano estão apresentados na tabela 17. Ao analisar os resultados obtidos observou-se que tanto o extrato escala ampliada quanto as fases AcOEt e hidrometanólica apresentaram atividade insuficiente frente a cepa de *Staphylococcus aureus*.

**Tabela 16.** Atividade antibacteriana do extrato escala ampliada e da fase AcOEt de *Diaporthe* sp.

% inibição frente cepas bacterianas	SA
VJ 15 E.A	-
VJ 15 FAcOEt	-
VJ 15 FH <sub>2</sub> O+MeOH	-
C+	99,86
C -	4,53

Legenda: SA - *Staphylococcus aureus*; C+: controle positivo (oxitetraciclina); C-: controle negativo (DMSO 5%); - Ausência de atividade frente as cepas testadas; ± Desvio Padrão.

Ao analisar a porcentagem de inibição obtida a partir do primeiro ensaio antibacteriano utilizando o extrato em microescala de *Diaporthe* sp. com o segundo, realizado com o extrato em escala ampliada e fases, observa-se então a ausência de atividade antibacteriana entre o primeiro e o segundo ensaio.

Essa ausência pode estar relacionada a alguns fatores, como: efeito sinérgico, complexidade da mistura de metabólitos presentes no extrato e variações na produção de metabólitos secundários. Charria-Girón e colaboradores (2021) em seu estudo de avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de fungos endofíticos discorrem a respeito do fator efeito sinérgico. Os autores explicam que apesar de a triagem da atividade antimicrobiana com extratos brutos indicar a bioatividade desses extratos e consequentemente conduzir para a prospecção dos possíveis compostos responsáveis por essa atividade, nota-se uma crescente quanto a relatos que remetem à baixa atividade biológica de moléculas isoladas ao serem comparadas com extratos brutos contendo essas moléculas. Esse efeito é relatado como a combinação de vários compostos ativos nos extratos brutos que podem conferir bioatividades mais elevadas nesses extratos em relação aos metabólitos isolados.

Em um estudo realizado por Nguyen e colaboradores (2019) no qual estes avaliaram a atividade antimicrobiana do fungo *Amphirosellinia nigrospora* contra microrganismos fitopatogênicos, os autores evidenciaram que o extrato bruto do fungo mostrou atividade biológica mais elevada frente ao fungo fitopatogênico *Magnaporthe oryzae* com CIM de 250 µg/mL. Em contrapartida, a substância isolada pelos autores, um derivado de ciclohexenona, conhecida como coriloxina demonstrou atividade antimicrobiana baixa se comparada ao extrato bruto, com CIM de 125 µg/mL,

Outros fatores que podem estar relacionados a diminuição de bioatividades no geral, podem ser atribuídos a estabilidade e a degradação de metabólitos bioativos, onde há a possibilidade durante o processo de cultivo, a degradação dos metabólitos secundários devido a sensibilidade do microrganismo à fatores como pH, temperatura, oxigenação, iluminação etc. (SLAMA et al., 2021). A falta de estabilidade nesses metabólitos pode, por conseguinte, desencadear variações na produção dos metabólitos secundários pelos fungos, gerando um perfil metabólico diferente, o que no contexto de atividade antibacteriana pode exemplificar situações nas quais ocorrem a diminuição ou total ausência de metabólitos com essa bioatividade.

Alexandre (2018), ressalta a importância da utilização de métodos alternativos de cultivo, tendo em vista a variedade de classes de substâncias produzidas por *Diaporthe*. Portanto, faz-se necessário verificar as condições de cultivo nas quais o fungo pode desempenhar o seu ótimo desenvolvimento, podendo-se utilizar como base a técnica de OSMAC, auxiliando assim na otimização da produção de metabólitos secundários bioativos (HASHEM et al., 2023).

## 6. CONCLUSÃO

A partir deste estudo, foi possível concluir que a espécie *Vismia japurensis* abriga uma grande diversidade de fungos endofíticos, apresentando variedade macromorfológica e considerável quantidade de indivíduos, características estas, refletidas através das taxas de colonização e quantidade de fungos endofíticos isolados a partir das folhas dessa espécie vegetal. Sendo ainda realizada a identificação do fungo VJ 15 como pertencente ao gênero *Diaporthe*, um importante gênero produtor de substâncias bioativas.

Quanto ao estudo químico dos extratos metanólicos dos fungos endofíticos dessa espécie vegetal foi possível inferir por CCDC classes de metabólitos secundários importantes para a biotecnologia, como alcaloides, terpenoides, flavonoides, substâncias fenólicas, dentre outras. Foi também possível inferir a presença de classes de substâncias de interesse biotecnológico em VJ 15 (*Diaporthe* sp.). A avaliação do extrato de VJ 15 por RMN possibilitou evidenciar regiões de interesse para substâncias nitrogenadas, o que atrelado a outros experimentos possibilitou o isolamento de duas substâncias pertencentes a classe dos alcaloides: prolina betaína (**1**) e glicina betaína (**2**). Ressaltando assim, a relevância do estudo químico de espécies fúngicas e o quanto compreendê-las é essencial no processo de bioprospecção.

A avaliação biológica quanto as atividades tóxica e antibacteriana juntamente aos resultados obtidos a partir do estudo químico demonstraram que os fungos endofíticos de *V. japurensis* possuem potencial na produção de substâncias biologicamente ativas, algumas demonstrando serem tóxicas e possivelmente aplicáveis em testes mais específicos para essa finalidade e outras com características atóxicas podendo ser utilizadas em outros bioensaios. Quanto a atividade antibacteriana, alguns fungos demonstraram ser potenciais produtores de substâncias com ação antibiótica, podendo ser otimizados quanto ao seu cultivo para avaliar e aprimorar a produção dessas substâncias.

Portanto, os resultados obtidos a partir deste trabalho contribuirão para o conhecimento químico e biológico dos fungos endofíticos de *V. japurensis*, sendo o primeiro relato de estudo acerca da microbiota fúngica e endofítica dessa espécie vegetal, enfatizando a importância de se investigar mais a respeito da biologia e química desses fungos. Reforçando então a avaliação de outras atividades biológicas, experimentação de condições de cultivo alternativas, otimização de processos para obtenção de substâncias de interesses, o que possibilitará a ampliação do conhecimento químico e biológico dos fungos endofíticos dessa espécie vegetal, os quais podem ser úteis e aplicáveis no contexto biotecnológico.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAO, Abdulwakeel Ayokun-nun; MOTEETEE, Annah Ntsamaeeng. *Psorospermum febrifugum* Spach (Hypericaceae): ethnomedicine, phytochemistry, and pharmacological activity of an underexplored Plant. **Scientific African**, p. e01934, 2023.
- ALEXANDRE, Andrei da Silva. **Bioprospecção de *Diaporthe hongkongensis* fungo endofítico isolado de *Minquartia guianensis* (OLACACEAE)**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Amazonas, p. 70, 2018.
- ANCHEEVA, Elena; DALETOS, Georgios; PROKSCH, Peter. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi. **Current medicinal chemistry**, v. 27, n. 11, p. 1836-1854, 2020.
- APG (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, p. 1–20, 2016.
- AZEVEDO, João Lúcio de. Microrganismos endofíticos. **Ecologia microbial**. Tradução. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998.
- BACON, Charles W.; WHITE, James F. Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. **Symbiosis**, v. 68, p. 87-98, 2016.
- BARER, Michael R.; SWANN, Andrew. *Klebsiella, Enterobacter, Proteus* and other enterobacteria Urinary tract infection: bacteraemia: pneumonia: antimicrobial resistance *In*: BARER, Michael R.; IRVING, Will L. (Ed.). **Medical Microbiology E-Book: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Investigation and Control**. Elsevier Health Sciences, Londres, Reino Unido, 2018.
- BLOOR, Stephen. Arthrinic acid, a novel antifungal polyhydroxyacid from *Arthrinium phaeospermum*. **The Journal of antibiotics**, v. 61, n. 8, p. 515-517, 2008.
- BRADY, Sean F. et al. The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. **Organic letters**, v. 2, n. 25, p. 4043-4046, 2000.
- BORCHARDT, Mark A.; STEMPER, Mary E.; STANDRIDGE, Jon H. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 224, 2003.

- BOSE, Priyom; GOWRIE, S. Uma; CHATHURDEVI, G. Optimization of Culture Conditions for Growth and Production of Bioactive Metabolites by Endophytic Fungus-*Aspergillus tamarii*. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 2, p. 469-478, 2019
- BUCKLE, Jane. Chapter 7 – Infection *In*: BUCKLER, Jane (Ed.). **Clinical Aromatherapy: essentials oils in healthcare**. Clinical Aromatherapy, Londres, Reino Unido, 2015.
- CASELLA, Thiago M. et al. Antimicrobial and cytotoxic secondary metabolites from tropical leaf endophytes: isolation of antibacterial agent pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402. **Phytochemistry**, v. 96, p. 370-377, 2013.
- CENTERAQUARISMO. *Artemia salina*. 2015. Fotografia. Disponível em: <centeraquarismo.wordpress.com/2015/06/26/artemia-salina/>. Acesso em: março de 2024.
- CHAMBERS, Stephen T; KUNIN, Calvin M. Isolation of glycine betaine and proline betaine from human urine. Assessment of their role as osmoprotective agents for bacteria and the kidney. **The Journal of clinical investigation**, v. 79, n. 3, p. 731-737, 1987.
- CHAPLA, Vanessa M.; BIASETTO, Carolina R.; ARAUJO, Angela R. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química**, p. 421-437, 2012.
- CHARRIA-GIRÓN, Esteban et al. Evaluation of the antibacterial activity of crude extracts obtained from cultivation of native endophytic fungi belonging to a tropical montane rainforest in Colombia. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 716523, 2021.
- CHERIGO, Lilia et al. Exploring the Biomedical Potential of Endophytic Fungi Isolated from Panamanian Mangroves. **Natural Product Communications**, v. 19, n. 1, p. 1934578X241228152, 2024
- CHINWORRUNGSEE, Maneekarn et al. Cytotoxic activities of trichothecenes isolated from an endophytic fungus belonging to order Hypocreales. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 611-616, 2008.

- CIMMINO, Alessio et al. Phomentrioloxin, a fungal phytotoxin with potential herbicidal activity, and its derivatives: a structure–activity relationship study. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 40, p. 9645-9649, 2013.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE [CLSI]. **Methods for dilution - approved standard – M07-A10**, v. 35, n. 2, 2015.
- COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia** p. 453-453, Editora Unicamp, São Paulo, 2006.
- DE BARY, Anton. **Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten**. Engelmann, Universidade de Freiburg, Alemanha. 1866.
- DE MEDEIROS, Aliandra G. et al. Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. **Folia microbiologica**, v. 63, p. 499-505, 2018.
- DEVI, Reema et al. A systematic review on endophytic fungi and its role in the commercial applications. **Planta**, v. 257, n. 4, p. 70, 2023.
- DEVI, Rubee et al. Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. *In: New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*. Elsevier, 2020. p. 147-161, Chennai, Índia.
- DISSANAYAKE, Asha J.; CHEN, Ya-Ya; LIU, Jian-Kui. Unravelling *Diaporthe* species associated with woody hosts from karst formations (Guizhou) in China. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 251, 2020.
- DHINGRA, Sameer et al. Microbial resistance movements: an overview of global public health threats posed by antimicrobial resistance, and how best to counter. **Frontiers in Public Health**, v. 8, p. 535668, 2020.
- DIEL, Kriptsan Abdon Poletto et al. Drawing a parallel between phytochemistry and other features of *Vismieae* species. **Phytochemistry Reviews**, v. 20, n. 6, p. 1-51, 2021.
- DO CARMO, Maria et al. Anthraquinones from *Vismia* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2041-2042, 1981.
- EID, Ahmed Mohamed et al. Role of endophytes in plant health and abiotic stress management. **Microbiome in plant health and disease: challenges and opportunities**, p. 119-144, 2019

- EL-SAYED, Ashraf SA et al. Camptothecin bioprocessing from *Aspergillus terreus*, an endophyte of *Catharanthus roseus*: antiproliferative activity, topoisomerase inhibition and cell cycle analysis. **Microbial Cell Factories**, v. 23, n. 1, p. 15, 2024.
- FEINER, Gerhard. The microbiology of specific bacteria. **Meat Products Handbook, 1st ed.**; Feiner, G., Ed, p. 595-615, 2006.
- FLORA E FUNGA DO BRASIL, 2023. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Hypericaceae. Disponível em: < Flora e Funga do Brasil (jbrj.gov.br)>. Acesso em: 20 de dezembro de 2023.
- GAO, Hong et al. *Cytospora* and *Diaporthe* species associated with hazelnut canker and dieback in Beijing, China. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 664366, 2021.
- GELBERG, Howard B. Alimentary system and the peritoneum, omentum, mesentery, and peritoneal cavity. **Pathologic basis of veterinary disease**, p. 324, 2017.
- GLOBAL DIVERSITY INFORMATION FACILITY (GBIF). *Hypericaceae*. 2024. Ilustração < <https://www.gbif.org/species/4900406>>. Acesso em: março de 2024.
- GLOSSOP, Hugh D. et al. Linear Analogues of the Lipopeptide Battacin with Potent In Vitro Activity Against *S. aureus*. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 112, p. 385-394, 2018.
- GOMES, Lesliê de Azevedo. **Estudo químico e biológico de fungos endofíticos isolados de *Deguelia duckeana***. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, p. 100, 2024.
- GONÇALVES, M. L. S.; MORS, W. B. Vismiaquinone, a  $\Delta^1$ -isopentenyl substituted anthraquinone from *Vismia reichardtiana*. **Phytochemistry**, v. 20, n.8, 1947-1950, 1981.
- GOWTHAM, H. G. et al. Fungal endophytes as mitigators against biotic and abiotic stresses in crop plants. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 2, p. 116, 2024.
- GUO, Bingying et al. Cytonic acids A and B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema species*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 5, p. 602-604, 2000.

- GUPTA, Shubhpriya et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. **Biotechnology advances**, v. 39, p. 107462, 2020.
- HARRIS, Jason B.; BROOKS, W. Abdullah. Typhoid and paratyphoid (enteric) fever. *In: Hunter's tropical medicine and emerging infectious diseases*. Elsevier, p. 608-616, Estados Unidos da América, 2020.
- HARWIG, J.; SCOTT, P. M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied microbiology**, v. 21, n. 6, p. 1011-1016, 1971.
- HASHEM, Amr H. et al. Bioactive compounds and biomedical applications of endophytic fungi: a recent review. **Microbial cell factories**, v. 22, n. 1, p. 107, 2023.
- HENZELYOVÁ, Jana et al. Isolation, characterization and targeted metabolic evaluation of endophytic fungi harbored in 14 seed-derived *Hypericum* species. **Planta Medica**, v. 86, n. 13/14, p. 997-1008, 2020.
- HUTCHINGS, Matthew I.; TRUMAN, Andrew W.; WILKINSON, Barrie. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72-80, 2019.
- INDEX FUNGORUM. Royal Botanic Gardens, Kew. Disponível em: <<https://www.indexfungorum.org/>>. Acesso em: 02 de abril de 2025.
- JAMES, R. Infection prevention and control and the role of medical textiles. *In: Handbook of Medical Textiles*. Woodhead Publishing, p. 297-315, Alemanha, 2011.
- JENKINS, Claire. *Escherichia coli* and *Shigella* Extraintestinal infections; gastrointestinal infections; travellers diarrhoea; haemolytic uraemic syndrome; antimicrobial resistance *In: BARER, Michael R.; IRVING, Will L. (Ed.). medical microbiology e-book: a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory investigation and control*. Elsevier Health Sciences, Londres, Reino Unido, 2018.
- JHA, Priyanka et al. Endophytic fungi: hidden treasure chest of antimicrobial metabolites interrelationship of endophytes and metabolites. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.
- JIANG, Lin et al. Bioactive secondary metabolites produced by fungi of the genus *Diaporthe* (*Phomopsis*): structures, biological activities, and biosynthesis. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 105062, 2023.

- KELLER, Nancy P.; TURNER, Geoffrey; BENNETT, Joan W. Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. **Nature reviews microbiology**, v. 3, n. 12, p. 937-947, 2005.
- KHIRALLA, Afra et al. Evaluation of antiviral, antibacterial and antiproliferative activities of the endophytic fungus *Curvularia papendorffii*, and isolation of a new polyhydroxyacid. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1353, 2020.
- KILIAN, Mogens. *Streptococcus* and *Enterococcus pharyngitis*; scarlet fever; skin and soft tissue infections; streptococcal toxic shock syndrome; pneumonia; meningitis; urinary tract infections; rheumatic fever; poststreptococcal glomerulonephritis *In*: BARER, Michael R.; IRVING, Will L. (Ed.). **Medical Microbiology E-Book: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Investigation and Control**. Elsevier Health Sciences, 2018.
- KIM, Jong Hoon et al. *Morganella morganii* sepsis with massive hemolysis. **Journal of Korean medical science**, v. 22, n. 6, p. 1082-1084, 2007.
- KUSARI, Souvik; HERTWECK, Christian; SPITELLER, Michael. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.
- LAMBOU, Karine et al. Pathway of glycine betaine biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 6, p. 853-863, 2013.
- LEE, Ezra e ANJUM, Fatima. *Staphylococcus epidermidis* Infection. 2020. National Library of Medicine. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563240/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563240/)>. Acesso em 16 de julho de 2023.
- LHULLIER, Cintia; HORTA, Paulo Antunes; FALKENBERG, Miriam. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 158-163, 2006.
- LI, Gang et al. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Eupenicillium* sp. LG41. **Journal of natural products**, v. 77, n. 11, p. 2335-2341, 2014.
- LIU, Huibo et al. Four new metabolites from the endophytic fungus *Diaporthe lithocarpus* A740. **Fitoterapia**, v. 137, p. 104260, 2019.

- LIZCANO, Leandro J. et al. Piper and *Vismia* species from Colombian Amazonia differentially affect cell proliferation of hepatocarcinoma cells. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 179-195, 2014.
- MARTINS, Milena Ventrichi; SHIMIZU, Gustavo Hiroaki; BITTRICH, Volker. Flora da Reserva Ducke, Estado do Amazonas, Brasil: Hypericaceae. **Hoehnea**, v. 45, p. 361-371, 2018.
- MAPOOK, Ausana et al. Ten decadal advances in fungal biology leading towards human well-being. **Fungal Diversity**, v. 116, n. 1, p. 547-614, 2022.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; McLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 45, p. 31–34, 1982.
- MOHANA KUMARA, Patel et al. *Fusarium proliferatum*, an endophytic fungus from *Dysoxylum binectariferum* Hook. f, produces rohitukine, a chromane alkaloid possessing anti-cancer activity. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 101, p. 323-329, 2012.
- NAGEM, Tanus Jorge; OLIVEIRA, Fernando Faustino de. Xanthonés and other constituents of *Vismia parviflora*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 8, p. 505-508, 1997.
- NARANJO-ORTIZ, Miguel A.; GABALDÓN, Toni. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. **Biological Reviews**, v. 94, n. 6, p. 2101-2137, 2019.
- NATATA. *Alexander Fleming e a penicilina*. 2024. Ilustração. Disponível em: <<https://www.shutterstock.com/pt/image-vector/alexander-fleming-vector-sketch-illustration-portrait-1215810598>>. Acesso em: março de 2024.
- NGUEMEVING, Jean Robert et al. Laurentixanthonés A and B, antimicrobial xanthonés from *Vismia laurentii*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 13, p. 1341-1346, 2006.
- NGUYEN, Giang Thu et al. Enhanced podophyllotoxin production of endophyte *Fusarium proliferatum* TQN5T by host extract and phenylalanine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 17, p. 5367-5378, 2023.
- NGUYEN, H. T. et al. Antimicrobial activities of an oxygenated cyclohexanone derivative isolated from *Amphirosellinia nigrospora* JS-1675 against various plant pathogenic bacteria and fungi. **Journal of applied microbiology**, v. 126, n. 3, p. 894-904, 2019.

- NTUNGWE N, Epole et al. Artemia species: An important tool to screen general toxicity samples. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 24, p. 2892-2908, 2020.
- OLIVEIRA, A. H. et al. Anti-inflammatory activity of *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. extracts and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, p. 266-274, 2017.
- OLIVEIRA, Juliana Gomes de Souza. **Bioprospecção de alcaloides em extratos de fungos endofíticos de *Duroia macrophylla* Huber (RUBIACEAE)**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Amazonas, p. 182, 2018.
- OREN, Aharon et al. Glycine betaine is the main organic osmotic solute in a stratified microbial community in a hypersaline evaporitic gypsum crust. **Extremophiles**, v. 17, p. 445-451, 2013.
- OSORIO, Maria Izabel Correia. **Estudo químico e biológico dos ramos de espécies do gênero *Vismia* vand. (hypericaceae)**. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, p. 101, 2019.
- PEDROZA, Laila da Silva. **Estrutura molecular e atividade biológica de metabólitos secundários de espécies de *Vismia* Vand (Hypericaceae)**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas, p. 207, 2019.
- PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial Ecology of Leaves**. New York: Springer-Verlag New York Inc. p. 179–197. 1991.
- POMPENG, Phunlap et al. Antiangiogenic effects of anthranoids from *Alternaria* sp., an endophytic fungus in a Thai medicinal plant *Erythrina variegata*. **Phytomedicine**, v. 20, n. 10, p. 918-922, 2013.
- POWO 2023. Plants of the World Online. Royal Botanic Gardens, Kew. Hypericaceae. Disponível em: < <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30001287-2> >. Acesso em: 20 de dezembro de 2023.
- REYNOLDS, Dan; KOLLEF, Marin. The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: an update. **Drugs**, v. 81, n. 18, p. 2117-2131, 2021.
- RHODES, D.; HANSON, A. D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. 1993.

- RIGA, Riga et al. Secondary metabolites from *Diaporthe lithocarpus* isolated from *Artocarpus heterophyllus*. **Natural Product Research**, v. 35, n. 14, p. 2324-2328, 2021.
- SAKAMOTO, Atsushi et al. Genetic engineering of biosynthesis of glycinebetaine enhances tolerance to various stress. *In: Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2000. p. 95-104.
- SAMAGA, Pradeepa Vasudeva; RAI, Vittal Ravishankar. Diversity and bioactive potential of endophytic fungi from *Nothapodytes foetida*, *Hypericum mysorense* and *Hypericum japonicum* collected from Western Ghats of India. **Annals of microbiology**, v. 66, n. 1, p. 229-244, 2016.
- SAMONIS, G. et al. *Citrobacter* infections in a general hospital: characteristics and outcomes. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 28, p. 61-68, 2009.
- SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, Laura; MARINA ALEGRE, Maria Luisa; CREGO NAVAZO, Antonio L. Determination of Betaines in Vegetable Oils by Capillary Electrophoresis-Ion Trap Mass Spectrometry *In: Betaine: Chemistry, Analysis, Function and Effects*, ed. V. R. Preedy, **The Royal Society of Chemistry**. p. 120-138, 2015.
- SELMER-OLSEN, E. et al. Survival of *Lactobacillus helveticus* entrapped in Ca-alginate in relation to water content, storage and rehydration. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 79-85, 1999.
- SEO, Eun-Kyoung et al. New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 1, p. 35-42, 2000.
- SHAHZAD, Raheem et al. What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 24, 2018.
- SHARMA, Vishal et al. Valproic acid induces three novel cytotoxic secondary metabolites in *Diaporthe* sp., an endophytic fungus from *Datura innoxia* Mill. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 12, p. 2217-2221, 2018.
- SHI, Xiao-Shan 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.

- SHIMIZU. *Vismia japurensis*. 2018. Fotografia. Disponível: <[http://www.plantsystematics.org/imgs/shimizu/r/Hypericaceae\\_Vismia\\_japurensis\\_48929.html](http://www.plantsystematics.org/imgs/shimizu/r/Hypericaceae_Vismia_japurensis_48929.html)>. Acesso em: março de 2024.
- SINGH, G. et al. Serine-glycine-betaine, a novel dipeptide from an endophyte *Macrophomina phaseolina*: isolation, bioactivity and biosynthesis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 2, p. 756-767, 2021.
- SLAMA, Houda Ben et al. Potentials of endophytic fungi in the biosynthesis of versatile secondary metabolites and enzymes. **Forests**, v. 12, n. 12, p. 1784, 2021.
- SOUZA, Antonia Queiroz Lima de et al. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta amazônica**, v. 34, p. 185-195, 2004.
- SPINOPS. *Taxus brevifolia*. 2022. Fotografia. Disponível em: <<https://www.biodiversity4all.org/observations/140594123>>. Acesso em: março de 2024.
- STANIEK, Agata; WOERDENBAG, Herman J.; KAYSER, Oliver. *Taxomyces andreanae*: a presumed paclitaxel producer demystified?. **Planta medica**, v. 75, n. 15, p. 1561-1566, 2009.
- STIERLE, Andrea; STROBEL, Gary; STIERLE, Donald. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214-216, 1993.
- STROBEL, Gary et al. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, n. 2, p. 179-183, 2002.
- SUN, Wenxiu et al. Morphological and molecular identification of *Diaporthe* species in southwestern China, with description of eight new species. **MycoKeys**, v. 77, p. 65, 2021.
- SWANDINY, Greesty Finotory et al. Potent antibacterial and cytotoxic bioactive compounds from endophytic fungi *Diaporthe* sp. associated with *Salacia intermedia*. **Archives of Microbiology**, v. 207, n. 2, p. 1-15, 2025.
- TAKIS, Panteleimon G. et al. The chemistry of betaine. 2015. In: PREEDY, Victor R. (Ed). Betaine: chemistry, analysis, function and effects. **Royal Society of Chemistry**, 2015.

- UDAYANGA, Dhanushka et al. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal diversity*, v. 50, p. 189-225, 2011.
- UDDIN, Tanvir Mahtab 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.
- ÜNÜVAR, Songül. Microbial foodborne diseases. In: **Foodborne Diseases**. Academic Press, 2018. p. 1-31.
- VERMA, Rohit Kumar et al. Global status of bacterial fish diseases in relation to aquatic pollution. In: **Bacterial Fish Diseases**. Academic Press, 2022. p. 155-182.
- VERMA, Vijay C. et al. Piperine production by endophytic fungus *Periconia* sp. isolated from *Piper longum* L. **The Journal of antibiotics**, v. 64, n. 6, p. 427-431, 2011.
- VT NAIR, Divek; VENKITANARAYANAN, Kumar; KOLLANOOR JOHNY, Anup. Antibiotic-resistant *Salmonella* in the food supply and the potential role of antibiotic alternatives for control. **Foods**, v. 7, n. 10, p. 167, 2018.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas**. 2a. ed. Alemanha: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.
- WORLD FLORA ONLINE 2023. Global Strategy For Plant Conservation. Hypericaceae. Disponível em: <<https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-7000000292-2023-06?page=1>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2023.
- XIAO, Chuan-Yun; MU, Qing; GIBBONS, Simon. The phytochemistry and pharmacology of *Hypericum*. **Progress in the chemistry of organic natural products 112**, p. 85-182, 2020.
- XIE, Chun-Lan et al. Discovery of andrastones from the deep-sea-derived *Penicillium allii-sativi* MCCC 3A00580 by OSMAC strategy. **Bioorganic Chemistry**, v. 108, p. 104671, 2021.
- YAN, Lu et al. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, p. 3327-3340, 2019.
- YANG, Qin; JIANG, Ning; TIAN, Cheng-Ming. Three new *Diaporthe* species from Shaanxi province, China. **MycoKeys**, v. 67, p. 1, 2020.

- ZHAI, Guifa et al. Bioactive monoterpenes and polyketides from the ascidian-derived fungus *Diaporthe* sp. SYSU-MS4722. **Marine Drugs**, v. 20, n. 9, p. 553, 2022.
- ZOU, Ge et al. Griseofulvin enantiomers and bromine-containing griseofulvin derivatives with antifungal activity produced by the mangrove endophytic fungus *Nigrospora* sp. QQYB1. **Marine Life Science & Technology**, v. 6, n. 1, p. 102-114, 2024.
- ZOU, Huibin et al. The metabolism and biotechnological application of betaine in microorganism. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, p. 3865-3876, 2016.