

REVISTA
DESAFIOS

ISSN: 2359-3652

V.12, n.1, ABRIL/2025 – DOI: http://dx.doi.org/10.20873/pibic_2024_21110

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E PERFIL QUÍMICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE CLITORIA GUIANENSIS: UMA ABORDAGEM OSMAC E REDES MOLECULARES.

ANTIFUNGAL ACTIVITY AND CHEMICAL PROFILE OF ENDOPHYTIC FUNGI ISOLATED FROM *CLITORIA GUIANENSIS*: AN OSMAC AND MOLECULAR NETWORKING APPROACH.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y PERFIL QUÍMICO DE HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE CLITORIA GUIANENSIS: UN ENFOQUE OSMAC Y DE REDES MOLECULARES.

Millena Baltazar de Oliveira

Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: millena.baltazar@mail.uft.edu.br | [Orcid.org/0009-0001-8982-5652](https://orcid.org/0009-0001-8982-5652)

Douglas Martins de Oliveira Bessa

Mestre em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: douglas.martins@mail.uft.edu.br | <https://orcid.org/0000-0003-0370-3468>

Alice Barboza da Cruz

Graduanda em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: barbosa.alice@mail.uft.edu.br | [Orcid.org/0009-0000-6831-6771](https://orcid.org/0009-0000-6831-6771)

Daniela Baretto Barbosa Trivella

Pesquisadora do Laboratório Nacional de Biociências. Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). E-mail: daniela.trivella@lnbio.cnpem.br | [Orcid.org/0000-0002-7505-2345](https://orcid.org/0000-0002-7505-2345)

Vanessa Mara Chapla

Professora do Colegiado de Química. Universidade Federal do Tocantins (UFT). E-mail: vmchapla@mail.uft.edu.br | [Orcid.org/0000-0002-1078-668X](https://orcid.org/0000-0002-1078-668X)

ABSTRACT:

Endophytic fungi are microorganisms that inhabit healthy plant tissues, producing secondary metabolites with biotechnological potential. This study evaluated the antimicrobial activity and chemical profile of extracts obtained from endophytic fungi isolated from the medicinal plant *Clitoria guianensis*, using the OSMAC (*One Strain Many Compounds*) strategy through co-cultivation with the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. The extracts were analyzed by UPLC-MS/MS, and molecular networks constructed on the GNPS2 platform allowed the annotation of bioactive compounds, highlighting the presence of Beauvericin and Beauverriatin L. The antifungal activity was tested against *S. sclerotiorum*, with the co-culture of the fungus *Fusarium* sp. (CG45) showing 45.7% mycelial inhibition, superior to the monoculture (29%). None of the tested samples showed antibacterial activity. No significant cytotoxic activity was observed in the tested cell lines, indicating safety for biotechnological applications. The results suggest that co-cultivation is an effective strategy to enhance the production of antifungal metabolites, offering a sustainable alternative for the control of phytopathogens.

KEY WORDS: Endophytic fungi, Molecular networking, antifungal activity and co-cultivation

RESUMO:

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam tecidos vegetais saudáveis, produzindo metabólitos secundários com potencial biotecnológico. Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana e o perfil químico de extratos obtidos de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Clitoria guianensis*, utilizando a estratégia OSMAC (*One Strain Many Compounds*) por meio de co-cultivos com o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. Os extratos foram analisados por UPLC-MS/MS, e as redes moleculares construídas na plataforma GNPS2 permitiram a anotação de compostos bioativos, destacando a presença de Beauvericina e Beauverriatina L. A atividade antifúngica foi testada contra *S. sclerotiorum*, com destaque para o co-cultivo do fungo *Fusarium* sp. (CG45), que apresentou 45,7% de inibição micelial, superior ao monocultivo (29%). Das amostras testadas nenhuma evidenciou atividade antibacteriana. Nenhuma atividade citotóxica significativa foi observada nas linhagens celulares testadas, indicando segurança para aplicações biotecnológicas. Os resultados sugerem que o co-cultivo é uma estratégia eficaz para potencializar a produção de metabólitos antifúngicos, oferecendo uma alternativa sustentável para o controle de fitopatógenos.

Palavras-Chave: Fungos endofíticos, Redes Moleculares, Atividade antifúngica e Co-cultivo.

RESUMEN:

Los hongos endófitos son microorganismos que habitan en los tejidos vegetales sanos, produciendo metabolitos secundarios con potencial biotecnológico. Este estudio evaluó la actividad antimicrobiana y el perfil químico de extractos obtenidos de hongos endófitos aislados de la planta medicinal Clitoria guianensis, utilizando la estrategia OSMAC (One Strain Many Compounds) a través de co-cultivos con el fitopatógeno Sclerotinia sclerotiorum. Los extractos fueron analizados por UPLC-MS/MS, y las redes moleculares construidas en la plataforma GNPS2 permitieron la anotación de compuestos bioactivos, destacando la presencia de Beauvericina y Beauverriatina L. La actividad antifúngica se probó contra S. sclerotiorum, destacando el co-cultivo del hongo Fusarium sp. (CG45), que presentó un 45,7% de inhibición micelial, superior al monocultivo (29%). Ninguna de las muestras probadas mostró actividad antibacteriana. No se observó ninguna actividad citotóxica significativa en las líneas celulares probadas, lo que indica seguridad para aplicaciones biotecnológicas. Los resultados sugieren que el co-cultivo es una estrategia eficaz para potenciar la producción de metabolitos antifúngicos, ofreciendo una alternativa sostenible para el control de fitopatógenos.

Palabras clave: Hongos endófitos, Actividad antifúngica, Redes moleculares y Co-cultivo

INTRODUÇÃO

Os fungos endofíticos são definidos como aqueles que vivem no interior de tecidos e órgãos saudáveis de plantas sem causar malefícios aparente (LIU-XU et al., 2022; WANG et al., 2022). Nesta relação endossimbiótica, os endófitos fúngicos produzem compostos bioativos com atividade antimicrobiana e pesticida, conferindo proteção e resistência ao seu hospedeiro contra fitopatógenos (OMOMOWO et al., 2023).

Os compostos bioativos sintetizados pelos endófitos apresentam uma ampla diversidade química, incluindo alcalóides, benzopironas, citocalasinas, esteróides, fenóis, isocumarinas, terpenóides e xantonas (REIS et al., 2024). Entretanto, grande parte dos clusters de genes biossintéticos (BGCs), responsáveis pela síntese de enzimas produtoras desses compostos, permanece silenciada (ZAKARIYAH et al., 2024). Diante disso, diversas estratégias têm sido exploradas para desbloquear esse potencial biotecnológico e ampliar a produção de metabólitos secundários.

A estratégia OSMAC (*One Strain Many Compounds* - “uma cepa muitos compostos”) é uma técnica que utiliza alterações nos parâmetros de cultivo, como mudanças no pH, temperatura, concentração de oxigênio, condições e estado de cultivo, para promover a produção de maior variedade de substâncias. Essa estratégia é amplamente empregada para induzir a ativação de vias biossintéticas, visando obter maior rendimento e diversidade de compostos a partir de uma única cepa de microrganismo (FERREIRA et al., 2022; ZAKARIYAH et al., 2024). Uma das técnicas utilizadas nessa estratégia é o co-cultivo de microrganismos, que simula uma condição natural em que fungos do mesmo ou de diferentes nichos ecológicos competem pelos mesmos nutrientes, causando no endófito uma condição de estresse que pode ativar essas vias (REIS et al., 2024).

A procura por novos agentes antimicrobianos, a partir de plantas e microrganismos, é intensa devido à crescente resistência dos microrganismos patogênicos frente aos produtos sintéticos. Além disso, o uso destes pesticidas a longo prazo causa impactos negativos para a sociedade e para o meio ambiente devido à poluição causada pelos resíduos químicos (DESHMUKH et al., 2018). Uma alternativa menos prejudicial ao ambiente seria o uso de compostos de origem natural, como os produzidos por fungos endofíticos

Com base nisso, este trabalho teve como objetivo obter extratos brutos com atividade antimicrobiana a partir de fungos endofíticos. Estudos anteriores do grupo de pesquisa indicam que os endófitos associados à *Clitoria guianensis*, uma planta

medicinal do Cerrado, apresentam potencial antimicrobiano (FERRAZ et al., 2024). Além de apresentaram atividade antagonista contra o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Martins, 2022). Dessa forma, fungos endofíticos isolados de *C. guianensis* foram selecionados para a obtenção de extratos e avaliação de sua atividade antimicrobiana, com vistas ao uso sustentável desses recursos na agricultura ou na saúde pública.

METODOLOGIA

LINHAGENS MICROBIANAS

As linhagens fúngicas utilizadas neste trabalho foram isoladas de caules e folhas saudáveis da planta *Clitoria guianensis* por Ferraz et al. (2024). Os fungos do gênero *Fusarium* sp. codificados como CG45 e CG43 foram identificados com base em características morfológicas e macroscópicas por Martins (2022). Enquanto a linhagem *Neopestalotiopsis* sp., codificada como CG13, foi identificada em nível molecular por Ferraz et al. (2021). O fungo causador da doença de planta mofo branco, *Sclerotinia sclerotiorum* (SS), foi cedido pelo Prof. Dr. Geraldo Humberto Silva da Universidade Federal de Viçosa. As cepas bacterianas *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter baumannii* foram adquiridas pelo Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins (LACEN) de Palmas.

OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS E FRACIONAMENTO

As monoculturas das linhagens fúngicas dos endofíticos e do fitopatógeno *S. sclerotiorum* foram realizadas em meio BDA (200 g de batata, 20 g de dextrose, 20 g de ágar e 1L de água destilada) com a adição de antibiótico (Amoxicilina Tri-Hidratada, 500 mg, Multilab) a 70 mg L⁻¹, mantidas à temperatura ambiente por um período de incubação de 7 a 10 dias.

Posteriormente, a técnica OSMAC foi empregada por meio do co-cultivo das linhagens *Neopestalotiopsis* sp. CG13 com *S. sclerotiorum* (13 x SS), *Fusarium* sp. CG43 com *S. sclerotiorum* (43 x SS) e *Fusarium* sp. CG45 com *S. sclerotiorum* (45 x SS). O *S. sclerotiorum* foi inoculado, e, após um período de 2 dias, o endófito foi inoculado no extremo oposto da placa. Para o co-cultivo, ambos foram incubados em meio BDA, a 25°C, por um período de 7 a 10 dias. Foram realizadas 6 placas ao todo, sendo 3 placas para monocultura e 3 placas para o co-cultivo.

Os monocultivos e co-cultivos obtidos foram transferidos para um béquer e submersos, separadamente, em solução de Metanol 90% (350 mL). Após 3 horas, a massa micelial foi separada do caldo fermentado por filtração convencional utilizando bomba a vácuo, e o caldo clarificado obtido foi rotaevaporado até a obtenção do extrato hidrometanólico. Em seguida, foi realizada a partição líquido-líquido (3 x 100 mL, 2:1 v/v) com acetato de etila (AcOEt) por três vezes, seguida pela remoção do solvente por rotaevaporação a pressão reduzida a 40°C. Posteriormente, a fração AcOEt foi solubilizado em metanol 80% e foi submetido à partição líquido/líquido com hexano (3 x 5 mL) por três vezes, e rotaevaporados até a obtenção das frações metanólicas a 80% e hexânica. Um extrato contendo apenas o meio de cultura BDA foi preparado para comparação do perfil químico (MARTINS, 2022).

AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DOS EXTRATOS POR UPLC-MS/MS

A separação cromatográfica foi realizada utilizando o sistema UPLC Acquity HClass (Waters) em uma coluna C18 BEH Acquity de 1,7 µm (2,1 x 100 mm, Waters), operando a um fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e uma temperatura de coluna de 40 °C. A eluição de gradiente de 15 minutos começou, na fase móvel inicial, com 90% de água, 5% de acetonitrila e 5% de solução de ácido fórmico 2% por 10 min, aumentando para 95% a concentração de acetonitrila e mantendo 5% da solução de ácido fórmico a 2%; antes de aumentar para 100% de ácido acetonitrila em 12 min na fase móvel e reequilibrar por 3 min.

Em seguida, os analitos foram submetidos ao espectrômetro de massas tandem uHR-ESI-QqTOF Impact II (Bruker), em modo positivo. Os parâmetros foram configurados com uma taxa de aquisição de 8 Hz, modo linha e limite absoluto de 25 contagens. A ionização foi ajustada com os parâmetros: deslocamento de placa de extremidade a 500 V, voltagem de capilar de a 4500 V, pressão de nebulização de 4 bar para o gás de secagem N₂, com fluxo de 10 L min⁻¹ e temperatura de secagem de 200°C.

O método de MS/MS foi configurado com um tempo de ciclo de 1 segundo e um limiar absoluto de 1500 contagens. A célula de colisão foi ajustada para 5.0 eV, com energia de colisão variando de 20 a 70 V e um limite absoluto de fragmentação de 1000 contagens. Íons com massa inferior a 200 Da foram excluídos, e a função “*active exclusion*” foi habilitada. A calibração do espectrômetro foi realizada com uma solução de formiato de sódio a 10 mM. Após a análise, os dados brutos foram convertidos para o formato mzXML no software do equipamento.

CONSTRUÇÃO DE REDES MOLECULARES E ANÁLISES

Os dados de UPLC-MS/MS convertidos para o formato mzXML, foram utilizados para construção das redes moleculares. As redes moleculares foram obtidas por meio da plataforma de análise de espectrometria de massas GNPS2 (<https://gnps2.org/homepage>) e o fluxo de trabalho selecionado foi o *Classical Networking Workflow*. Os parâmetros para agrupamento e correspondência de compostos foram definidos como: tolerância a fragmentos MS/MS de 0,025 Da tolerância à massa do íon precursor de 0,025, limite de cosseno de 0,7, tamanho mínimo de cluster de 2 e picos correspondentes de 6. Posteriormente, a visualização dos dados foi realizada por meio do software Cytoscape.

Foram anotados todos os compostos que seguiram os seguintes parâmetros: 6 picos de correspondência com a biblioteca espectral e valor de cosseno superior a 0,9000. Para a anotação manual foi considerado o valor de erro.

AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A triagem dos extratos contra *Sclerotinia sclerotiorum* foi realizada usando o método de poços difusos. Pequenos poços foram perfurados no micélio de *S. sclerotiorum* previamente cultivados em placa contendo meio BDA, preenchidos com ágar a 5% e completados com solução das frações metanólica 80% em DMSO na concentração de 20 mg mL⁻¹. O mesmo procedimento foi realizado para o controle negativo, contendo DMSO e a testemunha contendo apenas o fitopatógeno. O ensaio foi realizado em triplicata.

A inibição do crescimento do fitopatógeno foi analisada utilizando o crescimento micelial radial, seguindo a equação: $PI = [(R_t - R_e) / R_t] \times 100$

Em que, PI é o percentual de inibição, R_t o raio da testemunha, R_e o raio referente as frações e o controle com DMSO. Para as análises estatísticas das médias de crescimento micelial do fitopatógeno, os valores referentes aos raios do grupo controle e dos extratos brutos foram submetidos a análise no Sisvar 5.6 utilizando o teste de Tukey com 5% de significância.

Duas linhagens bacterianas foram utilizadas para a avaliação da atividade antibacteriana, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter baumannii*. Essas linhagens foram reativadas em meio ágar BHI (Brain Heart Infusion) à temperatura ambiente por 24h. Posteriormente, cada suspensão bacteriana foi ajustada para uma

densidade óptica ($\lambda = 600$ nm) de 0,100, equivalente a $1,0 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, utilizando o padrão 0,5 McFarland (BHOSALE et. al., 2021).

O potencial antibacteriano foi testado pelo método de discos difusos, no qual 100 µL das suspensões bacterianas foram distribuídos em placas de Petri contendo meio BHI. Em seguida, discos de papel filtro autoclavados foram colocados nas placas, sobre os quais foram pipetados 10 µL de solução a 20 mg mL⁻¹ da fração metanólica 80% e 10 µL de DMSO foram adicionados na placa como controle negativo. Por fim, as placas foram incubadas por 24 horas à temperatura ambiente, e o diâmetro dos halos de inibição foi anotado. Cada experimento foi realizado em duplicata (TEH et. al., 2017).

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

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

Brevemente, as frações metanólicas 80% armazenadas em placas LDV (9 µL) foram dispostas em *assay ready plates* (384 poços), por meio de transferência acústica precisa com o uso do manipulador de líquidos ECHO 650 (Beckman Coulter). Este procedimento foi realizado para obter concentrações finais de 40 µg/mL - 0,16 µg/mL no ensaio celular. DMSO (concentração final = 0,4%) foi utilizado como controle negativo, enquanto Paclitaxel foi usado como controle positivo em concentrações finais de 0,5 µM a 0,5 nM. As células foram transferidas para as *assay ready plates* e, após a transferência, a placa foi incubada por 48 horas a 37°C e 5% de CO₂. A citotoxicidade foi avaliada por contagem de núcleos. Deste modo as células foram coradas com Hoechst (coloração dos núcleos), fixadas com PFA 3,7% e analisadas em um microscópio automatizado Operetta (Perkin Elmer), onde foi possível obter as imagens de interesse. As imagens foram quantificadas no software Harmony (Perkin Elmer) transferidas, processadas e armazenadas no CDD Vault (INVITROGEN, 2020; NOVAES et al., 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados seis extratos brutos obtidos de fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Clitoria guianensis*, sendo três provenientes de monocultivos e três de

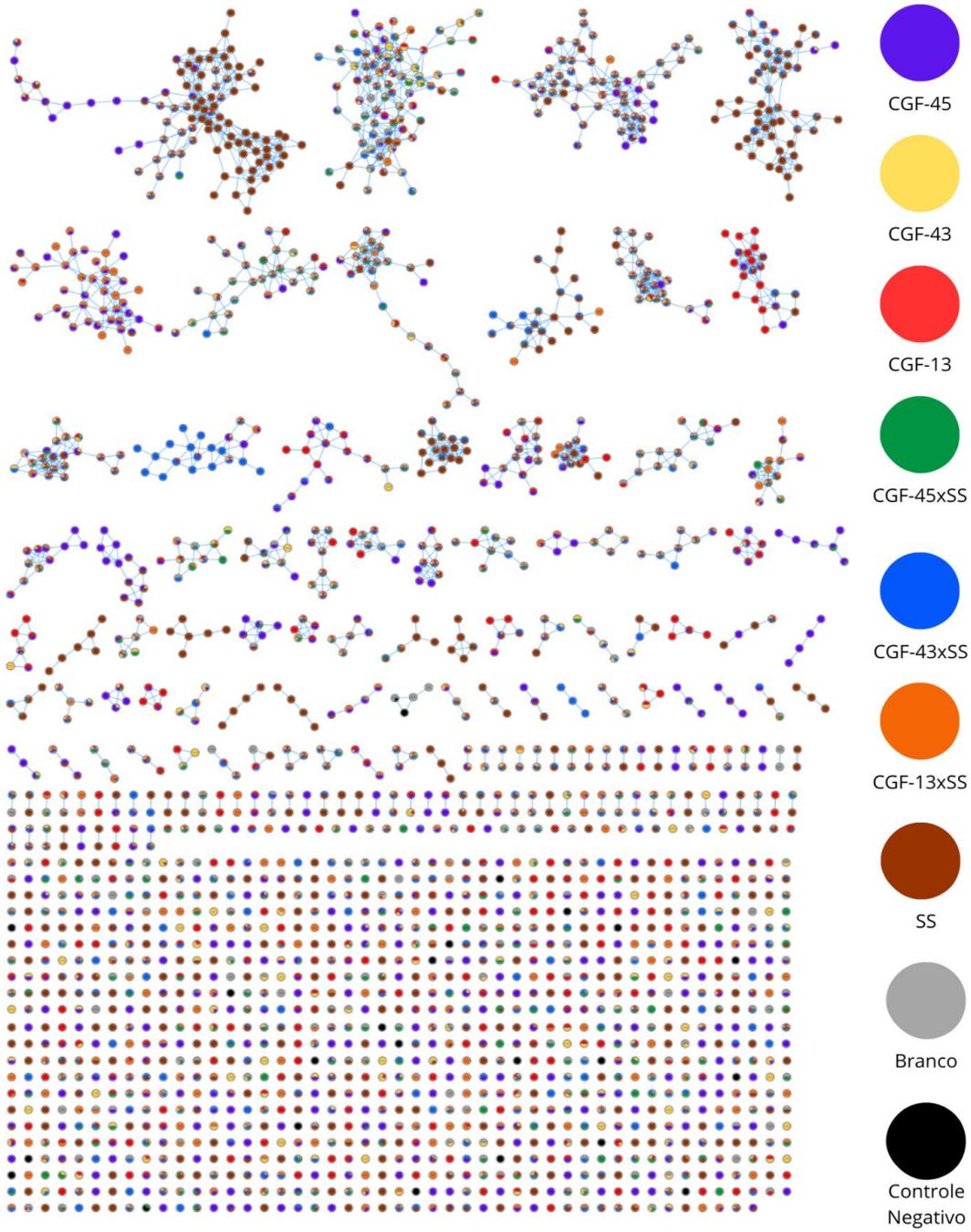
co-cultivos com *Sclerotinia sclerotiorum*. Além disso, foi preparado um extrato bruto apenas do meio de cultivo, utilizado para excluir, das redes moleculares, os íons ou entidades de massa presentes nesse controle. A comparação dos metabólitos secundários foi realizada por meio de redes moleculares clássicas formadas na plataforma GNPS2 (Figura 1). Para a quantificação do perfil metabólico, consideraram-se as entidades de massa sem identificação em bancos de dados e literatura, utilizando apenas os valores de m/z , o tempo de retenção e as culturas às quais essas entidades foram atribuídas.

A análise dos diagramas de Venn (Figura 2) revelou a quantidade de íons m/z acumulados, identificando aqueles comuns e/ou específicos às monoculturas e aos co-cultivos. Observou-se a presença de íons exclusivos dos co-cultivos, como no caso do co-cultivo de *Fusarium* sp. CG43 e *Sclerotinia sclerotiorum* (43xSS), que apresentou 203 entidades de massa únicas (Figura 2A). Esse resultado indica uma produção metabólica diferenciada nos co-cultivos, ou seja, um aumento na diversidade química produzida. Assim, a técnica OSMAC mostrou-se eficiente para promover a variação na produção metabólica dos fungos.

A diversidade de compostos bioativos pode ser explicada pela condição de co-cultivo no qual visa simular uma condição real de competição por nutrientes entre fungos do mesmo ou de diferentes nichos ecológicos causando um estresse que ativa genes biossintéticos e, assim, promovendo a produção de maior variedade de substâncias (DOS REIS et. A., 2024, FERREIRA et. Al., 2022).

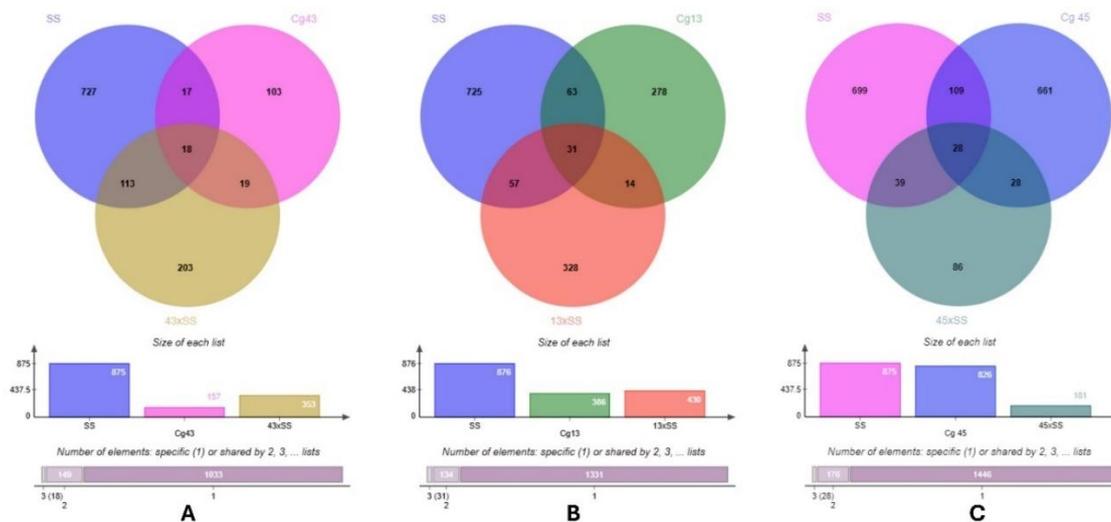
Ao utilizar o co-cultivo para a obtenção das frações teve-se a intenção de estimular a produção de compostos com potencial antifúngico, visto que, utilizou-se o fitopatógeno *S. sclerotiorum* como microrganismo de interação no co-cultivo. Considerando-se que a ativação de genes silenciados, responsáveis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

Figura 1 – Rede molecular gerada a partir dos espectros de massas MS² dos extratos brutos



Fonte: Adaptado de Cytoscape, 2024

Figura 2 – Diagramas de Venn relacionando o número de entidades de massas dos monocultivos e cocultivos. **A)** Diagrama de Venn relacionando as entidades de massas dos monocultivos de *Fusarium* sp. CG43 e *S. sclerotiorum* (SS), com as do seu cocultivo, 43xSS. **B)** Diagrama de Venn relacionando as entidades de massas dos monocultivos de *Neopestalotiopsis* sp. CG13 e *S. sclerotiorum* (SS), com as do cocultivo, 13xSS. **C)** Diagrama de Venn relacionando as entidades de massas dos monocultivos de *Fusarium* sp. CG45 e *S. sclerotiorum* (SS), com as do seu cocultivo, 45xSS.



Fonte: Autor, 2025.

ANOTAÇÃO DE COMPOSTOS

Para a anotação de compostos, foi selecionado o parâmetro de 6 picos de correspondência com a biblioteca espectral do GNPS2, resultando em 2 compostos anotado com valor de cosseno superior a 0,9000, identificado como Beauvericina (BEA) e Beauvenniatina L (Figura 3).

BEAUVERICINA

Os espectros de consenso que gera o nó 8354, com m/z 784,417 $[M+H]^+$ e tempo de retenção de 575,4 segundos, foi anotado como Beauvericina, com valor de cosseno 0,9752 com correspondência com a biblioteca espectral do GNPS2 e um erro de massa de 0,417 ppm. O mesmo composto foi anotado para o espectro de consenso que gerou o nó 10546, com m/z 801.443 $[M+NH_4]^+$ e tempo de retenção 577,2 segundos. Estes nós formaram rede com outros dois nós, e o composto anotado foi detectado nas amostras dos fungos *Fusarium* sp. CG43, *Fusarium* sp. CG45 cultivado em monocultura e em co-cultura e *Neopestalotiopsis* CG13.

A Beauvericina (BEA) é um hexadepsipeptídeo cíclico sintetizado por diversos gêneros fúngicos, como *Fusarium* e *Beauveria* (COVARELLI et al., 2015; XU et al., 2008; ZHANG et al., 2013). BEA apresenta forte atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias, sem distinção entre Gram-positivos e bactérias Gram-negativas. Essa toxina também se mostra citotóxica, apoptótica e com atividade imunossupressora. Estudos demonstraram que a BEA exerce uma variedade de papéis biológicos devido às suas atividades, incluindo inseticida, antimicrobiana, antiviral e antitumoral (JOW et al., 2004; SARKER et al., 2024; ZHANG et al., 2016; FORNELLI et al, 2004).

BEAUVENNIATINA L

O composto Beauvenniatina L foi anotado a partir da anotação manual, sendo o nó 10526, razão m/z 767.4580 e tempo de retenção de 591,6 segundos, sendo erro de massa de 1,20 ppm. Este composto foi detectado nas amostras dos fungos *Fusarium* sp. CG43, *Fusarium* sp. CG45.

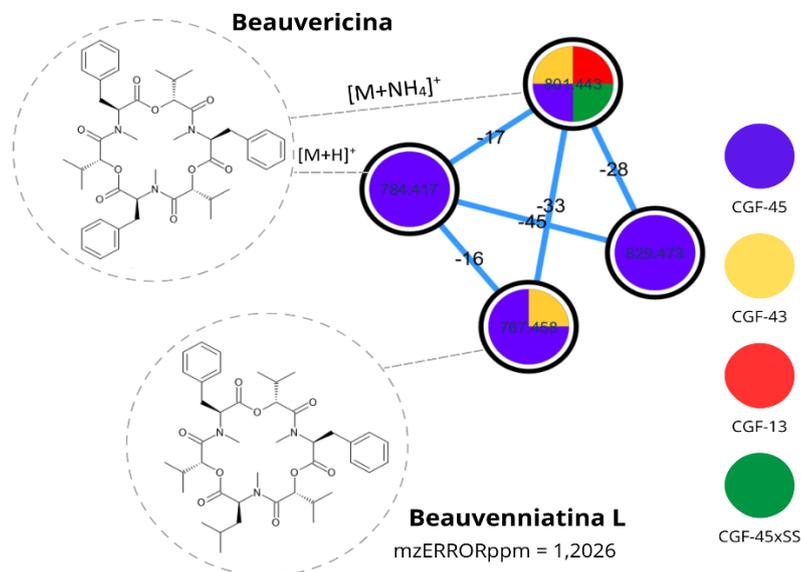
A Beauvenniatina L também é um hexadepsipeptídeo cíclico cuja em sua estrutura contém o aminoácido *N*-metil-leucina, semelhante às enniatinas. Sintetizada por fungos da ordem hypocreales, como o *Fusarium* sp., este composto pode ser tóxico e co-ocorrer com outras micotoxinas (SY-CORDERO et. al., 2012; URBANIAK et al., 2019). As enniatinas possuem diversas atividades biológicas relatadas como antimicrobianas, antifúngica, inseticidas e propriedades herbicidas (EKWOMADU et al., 2021).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antifúngica das frações fúngicas cultivadas em monocultura e co-cultivo foi testada contra o fungo fitopatogênico *S. sclerotiorum*. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 1, que mostra o percentual de inibição de *S. sclerotiorum* para cada fração testada. A Figura 4 ilustra o resultado do ensaio antifúngico, evidenciando a formação de halos de inibição.

Neste estudo, os fungos endofíticos isolados da planta *C. guianensis* mostraram-se ter potencial antifúngico contra *S. sclerotiorum*. Destacando-se a condição de co-cultivo com *Fusarium* sp. (CG45) que obteve o melhor desempenho, com 45,7% de inibição sobre a linhagem *S. sclerotiorum*, enquanto no monocultivo foi de apenas 29%, sugerindo que no co-cultivo houve a maior produção de compostos antifúngicos. Assim destaca-se o co-cultivo como uma aplicação promissora no controle de fitopatógenos.

Figura 3 - Estrutura química dos compostos Beauvericina e Beauvenniatina L e o *cluster* pertencente dos compostos gerados a partir dos espectros de massa MS² das frações metanólicas 80% obtidas dos cultivos fúngicos.



Fonte: Autor, 2025

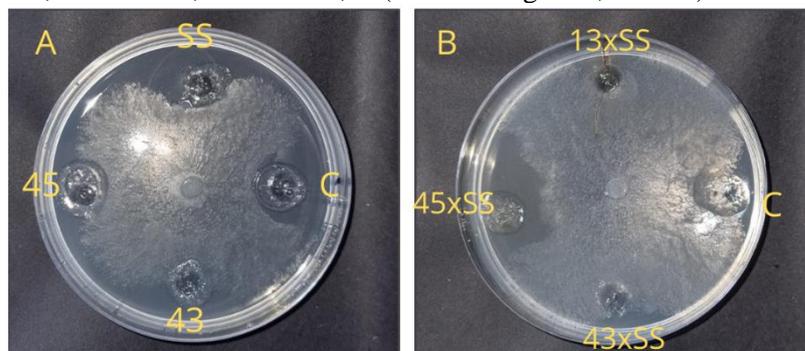
O *S. sclerotiorum* é um fitopatógeno causador da doença de planta popularmente conhecido como mofo branco capaz de infectar milhares de plantas, causando prejuízos significativos e perda de rendimento nas culturas agrícolas. Estudos realizados pela EMBRAPA apontam que desde 2008 até 2022 mais de 10 milhões de hectares foram infectados por *S. sclerotiorum* (MEYER et. al., 2022). Fungicidas químicos são amplamente utilizados para combater o fungo, mas esses agentes são prejudiciais tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente. Por isso, formas alternativas de controle do fitopatógenos têm sido amplamente pesquisada, e os defensivos à base de microrganismos têm se mostrado uma alternativa eficaz (SMOLIŃSKA et. al., 2018).

Tabela 1 - Média e Percentual de Inibição das frações fúngicas testado contra *Sclerotinia sclerotiorum*.

| Fração Fúngica | Média (mm) ¹ | Percentual (%PI) |
|--------------------|-------------------------|------------------|
| CG45 | 29,01 c | 29,4 |
| CG43 | 26,61 b | 35,2 |
| SS | 23,41 b | 42,9 |
| CG45xSS | 22,32 a | 45,7 |
| CG43xSS | 27,72 b | 32,5 |
| CG13xSS | 31,35 d | 23,7 |
| Testemunha | 41,08 g | - |
| DMSO | 33,21 e | 19,0 |
| CV(%) ² | 11,41 | |

¹médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas da tabela não diferem entre si, conforme o teste de Tukey a 5% de significância. ²CV= Coeficiente de variação. CG45: monocultivo de *Fusarium* sp. CG45. CG43: monocultivo de *Fusarium* sp. CG43. SS: monocultivo de *Sclerotinia sclerotiorum*. CG45xSS: co-cultivo de CG45 x SS. CG43xSS: co-cultivo de CG43 x SS. CG13xSS: co-cultivo de CG13 x SS.

Figura 4 - Ensaio antifúngico das frações contra *Sclerotinia sclerotiorum*. A) Frações em monocultivo, 45 (*Fusarium* sp. CG45), 43 (*Fusarium* sp. CG43), SS (*Sclerotinia sclerotiorum*), C (controle negativo, DMSO). B) Frações em co-cultivo, CG45 x SS, CG43 x SS, CG13 x SS, C (controle negativo, DMSO)



Fonte: Autor, 2024.

A atividade antibacteriana das frações fúngicas cultivadas em monocultura e co-cultivo foi testada contra as bactérias *S. maltophilia* e *A. baumannii*, contudo não foi observada a formação de halos de inibição, sendo as frações considerados inativos.

ATIVIDADE CITOTÓXICA

A análise das amostras nas linhagens celulares HaCaT e HCT-116 marcou o início da investigação de potenciais agentes citotóxicos. Entre as amostras testadas, nenhuma demonstrou citotoxicidade, considerando como *cut-off* para citotoxicidade 20% de morte celular em relação ao controle negativo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise do perfil químico das frações obtidas dos fungos endofíticos revelou sua capacidade de sintetizar uma diversidade de compostos bioativos, dos quais foram anotados duas micotoxinas a Beauvericina e Beauverniatina L. O método de co-cultivo foi capaz de diversificar a produção metabólica dos fungos.

Os fungos endofíticos isolados da planta *Clitoria guianensis* possuem potencial antimicrobiano. As condições de co-cultivo com *Fusarium* sp. mostraram o melhor desempenho antifúngico, com 45,7% de inibição sobre a linhagem *Sclerotinia sclerotiorum*, enquanto no monocultivo a inibição foi de 29%, sugerindo uma aplicação promissora no controle de fitopatógenos. Além disso, a ausência de citotoxicidade em todas as amostras testadas reforça o potencial de uso seguro dessas frações em futuras aplicações biotecnológicas, embora a atividade antibacteriana não tenha se mostrado positiva. Esses achados indicam a importância de continuar investigando os compostos bioativos produzidos por fungos endofíticos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro recebido do INCT-BioNat (processo CNPQ-INCT 465637/2014-0). DMOB, ABC e MOB agradecem a CAPES e CNPQ pelas bolsas concedidas. Ao professor Alex Sânder Rodrigues Cangussu pelas cepas bacterianas e auxílio. E ao Prof. Dr. Geraldo Humberto Silva da Universidade Federal de Viçosa.

Referências Bibliográficas

BALBERT, D. et al. Combining Desirable Traits for a Good Biocontrol Strategy against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Microorganisms**, vol. 10, Page 1189, v. 10, n. 6, p. 1189, 9 jun. 2022.

BHOSALE, A. S. et al. Photocatalytic and antibacterial activities of ZnO nanoparticles synthesized by chemical method. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 32, n. 15, p. 20510–20524, 1 ago. 2021.

COVARELLI, L. et al. Biosynthesis of beauvericin and enniatins in vitro by wheat *Fusarium* species and natural grain contamination in an area of central Italy. **Food Microbiology**, v. 46, p. 618–626, 1 abr. 2015.

DERBYSHIRE, M. C.; DENTON-GILES, M. The control of *sclerotinia* stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. **Plant Pathology**, v. 65, n. 6, p. 859–877, 1 ago. 2016.

DESHMUKH, S. K.; GUPTA, M. K.; PRAKASH, V.; SAXENA, S. Endophytic Fungi: A Source of Potential Antifungal Compounds. **Journal of fungi**, v. 4, n. 77, p. 1 – 42, 2018.

DOS REIS, J. B. A. et al. The hidden treasures in endophytic fungi: a comprehensive review on the diversity of fungal bioactive metabolites, usual analytical methodologies, and applications. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 4, p. 1–34, 20 mar. 2024.

DUAN, Y. et al. Pharmacological characteristics of the novel fungicide pyrisoxazole against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 149, p. 61–66, 1 jul. 2018.

EKWOMADU, T. L., AKINOLA, S. A., MWANZA, M. Fusarium mycotoxins, their metabolites (free, emerging, and masked), food safety concerns, and health impacts. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, p. 11741, nov 2021

FERRAZ, L. F. et al. Potencial biotecnológico de fungos endofíticos isolados de *Clitoria guianensis*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 12, n. 2, p. 82–91, 3 jun. 2024.

FERRAZ, L. F. **Identificação dos compostos orgânicos e propriedades biológicas de dois fungos endofíticos isolados de *Clitoria guianensis***. Orientadora: Vanessa Mara Chapla. 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, UFT. Gurupi, 2021.

FERREIRA, R. R.; CRUZ, J. S.; HAMERSKI, L. Estratégia OSMAC: Um Método Acessível para a Descoberta de Novas Substâncias Microbianas. **Revista Virtual de Química**, v. 14, n. 5, p. 853–859, 31 out. 2022.

FORNELLI, F.; MINERVINI, F.; LOGRIECO, A. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 85, n. 2, p. 74–79, 1 fev. 2004.

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

HAN, V. C. et al. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*: Modes of action of biocontrol agents, soil organic amendments, and soil microbiome manipulation. **Biological Control**, v. 186, p. 105346, 1 nov. 2023.

HOSSAIN, MD. M. et al. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the Pathogenomic Features of a Global Pathogen. **Cells**, v. 12, n. 7, p. 1063, 31 mar. 2023.
JOW, G. M. et al. Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: the causative role of calcium. **Cancer Letters**, v. 216, n. 2, p. 165–173, 28 dez. 2004.

LIU-XU, L.; VICEDO, B.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; LLORENS, E. Advances in endophytic fungi research: a data analysis of 25 years of achievements and challenges. **Journal of Plant Interactions**, London, v. 17, n.1, p. 244-266, fev. 2022.

MARTINS, D.; OLIVEIRA BESSA. **Atividade antagonista de fungos endofíticos associados à *Clitoria guianensis* BENTH.** Orientadora: Vanessa Mara Chapla. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS, UFT, Gurupi, 2022.

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; SATO, L. N.; CHAGAS, D. F.; SCHIPANSKI, C. A.; GALDINO, J. V.; SENGER, M.; BRUSTOLIN, R.; PIZOLOTTO, C. A.; DIAS, A. R.; NUNES JUNIOR, J.; LOBO JUNIOR, M.; TORMEN, N. R.; JULIATTI, F. C.; MARTINS, M. C.; SOUZA, T. P. de; OLIVEIRA, M. C. N. de. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2021/2022: resultados sumarizados dos experimentos cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2022. 14 p. (Embrapa Soja. Circular técnica, 189).

NOVAES, L. F. T. et al. Formal Total Synthesis of Actinoranone: Synthesis Approaches and Cytotoxic Studies. **Journal of Organic Chemistry**, v. 83, n. 9, 2018.

NI, Y. et al. Responses of physiological indexes and leaf epicuticular waxes of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum* infection. **Plant Pathology**, v. 63, n. 1, p. 174–184, 1 fev. 2014.

OMOMOWO, I. O. et al. A review on the trends of endophytic fungi bioactivities. **Scientific African**, v. 20, p. e01594, 1 jul. 2023.

SARKER, S.; CHOI, H. W.; LIM, U. T. Evaluation of new strain (AAD16) of *Beauveria bassiana* recovered from *Japanese rhinoceros* beetle: Effects on three coleopteran insects. **PLOS ONE**, v. 19, n. 1, p. e0296094, 1 jan. 2024.

SHAHID, Mohammad et al. Bioactive antifungal metabolites produced by *Streptomyces amritsarensis* V31 help to control diverse phytopathogenic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1687-1699, 2021.

NVITROGEN. Handbook: CELL CULTURE BASICS. **GIBCO**, v. 1, n. 1, 2020.

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

SMOLIŃSKA, U.; KOWALSKA, B. Biological control of the soil-borne fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* — a review. **Journal of Plant Pathology**, v. 100, n. 1, p. 1–12, 5 mar. 2018.

SY-CORDERO, A. A.; PEARCE, C. J.; OBERLIES, N. H. Revisiting the enniatins: A review of their isolation, biosynthesis, structure determination and biological activities. **Journal of Antibiotics**. The Journal of Antibiotics, v. 65, p. 541-549, nov. 2012.

SORNAKILI, A. et al. Antagonistic fungal endophytes and their metabolite-mediated interactions against phytopathogens in rice. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 112, p. 101525, 1 dez. 2020.

SU, Y. S. et al. Study of the Low Polar Constituents from the Endophytic Fungus *Annulohyphoxylon ilanense*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 55, n. 6, p. 1131–1132, 1 nov. 2019.

TEH, C. H. et al. Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 36, 16 fev. 2017.

URBANIAK, M., SPEPIEN, L., UHLIG, S. Evidence for Naturally Produced Beauvericins Containing N-Methyl-Tyrosine in Hypocreales Fungi. **Toxins**, v. 26, n. 11, p. 182, 2019.

WANG, Y. et al. Antifungal activity and action mechanism of the natural product cinnamic acid against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 103, n. 5, p. 944–950, 1 maio 2019.

WANG, Z. et al. Research advances on endophytic fungi and their bioactive metabolites. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, n. 2, p. 165–170, 1 fev. 2023.

XU, Y. et al. Biosynthesis of the Cyclooligomer Depsipeptide Beauvericin, a Virulence Factor of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. **Chemistry & Biology**, v. 15, n. 9, p. 898–907, 22 set. 2008.

ZAKARIYAH, R. F. et al. Progress in endophytic fungi secondary metabolites: biosynthetic gene cluster reactivation and advances in metabolomics. **Bulletin of the National Research Centre** 2024 48:1, v. 48, n. 1, p. 1–18, 23 abr. 2024.

ZHANG, H. et al. Isolation and Identification of the Antimicrobial Agent Beauvericin from the Endophytic *Fusarium oxysporum* 5-19 with NMR and ESI-MS/MS. **BioMed Research International**, v. 2016, n. 1, p. 1084670, 1 jan. 2016.

ZHANG, T. et al. Cloning and characterization of the gene cluster required for beauvericin biosynthesis in *Fusarium proliferatum*. **Science China Life Sciences**, v. 56, n. 7, p. 628–637, 6 jul. 2013.