



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



HIANNA ALMEIDA CÂMARA LEITE

**BIOPROSPECÇÃO DA COMUNIDADE
ENDOFÍTICA FÚNGICA DE *Lippia origanoides*
COM POTENCIAIS AÇÕES ANTIMICROBIANAS**

Feira de Santana, BA

2024

HIANNA ALMEIDA CÂMARA LEITE

**BIOPROSPECÇÃO DA COMUNIDADE
ENDOFÍTICA FÚNGICA DE *Lippia origanoides*
COM POTENCIAIS AÇÕES ANTIMICROBIANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Angélica Maria Lucchese.

Feira de Santana, BA.

2024

HIANNA ALMEIDA CÂMARA LEITE

“BIOPROSPECÇÃO DA COMUNIDADE ENDOFÍTICA FÚNGICA DE *Lippia origanoides* COM POTENCIAIS AÇÕES ANTIMICROBIANAS”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 03 de maio de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **ANGÉLICA MARIA LUCCHESI**
Data: 03/05/2024 17:05:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora: Prof^a. Dr^a. **Angélica Maria Lucchese**
Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente
 **RAQUEL GUIMARAES BENEVIDES**
Data: 17/05/2024 10:58:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof^a. Dra. **Raquel Guimarães Benevides**
Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente
 **ALTAIR ROGERIO AMBROSIO**
Data: 07/05/2024 20:02:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Altair Rogério Ambrósio**
Universidade Positivo - Curitiba - PR

Documento assinado digitalmente
 **EDDY JOSE FRANCISCO DE OLIVEIRA**
Data: 08/05/2024 09:27:54-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Eddy José Francisco de Oliveira**
Universidade do Estado da Bahia

Keite da Silva Nogueira
Membro: Prof^a. Dr^a. **Keite da Silva Nogueira**
Universidade Federal do Paraná

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

L552b

Leite, Hianna Almeida Câmara

Bioprospeção da comunidade endofítica fúngica de *Lippia origanoides*
com potenciais ações antimicrobianas / Hianna Almeida Câmara Leite. – 2024.
147 f.: il.

Orientadora: Angélica Maria Lucchese.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2024.

1. Botânica. 2. Fungos. 3. *Lippia origanoides* Kunth 4. Verbenaceae.
5. Atividade antimicrobiana. I. Lucchese, Angélica Maria. orient.
II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU 582.949.1

Dedico este trabalho à minha família e a todos os meus mestres, formais e informais. Compreendi que o maior aprendizado consiste em aprender a aprender sempre.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é mais que um sentimento, é uma atitude para a vida! Sou grata, sim, muitíssimo grata, primeiro a Deus, meu amigo e companheiro em todas as horas, por me conceder saúde, equilíbrio, por cuidar de mim e da minha família, especialmente nos momentos em que tive que me ausentar deles. Ao meu esposo, Jônatas, e aos nossos filhos, Jônatas Filho e Hellen, por compreenderem minha necessidade de dedicação ao trabalho e à pesquisa, por serem meu bálsamo, meus sorrisos mais felizes e os melhores motivos para eu seguir em frente.

Aos meus pais, Elzevir e Socorro, minha eterna gratidão, pela vida que me proporcionaram, pelo amor e carinho, pelos valores que me transmitiram, pelo apoio aos estudos e incentivo. Em especial, à minha mãezinha, por me dar um enorme apoio sempre.

Aos meus sogros, cunhados, sobrinhos, tios, tias, primos, amigos e irmãos que sempre estiveram perto, que atenderam quando precisei, em várias situações. Especialmente, aos que cuidam da minha família, da minha casa e de mim.

À minha orientadora, prof^a Angélica Lucchese, pelo direcionamento do trabalho, pela atenção, pela estrutura que busca proporcionar aos seus orientandos e, especialmente, por ser um exemplo de dedicação à pesquisa.

À toda a equipe LAPRON, pela ajuda em diversas técnicas, especialmente aos alunos dos projetos de Iniciação Científica, Jade, Humberto, Hismirlei, Joelma, Kátia. Às doutoras egressas da nossa equipe de pesquisa, Serly Machado, Ingrid Gutierrez, Gabriela Carinhonha, Emilly Feijó, Aline Silva, e Amanda Santana. Às mais recentes parceiras na pesquisa Fabiana Kotwiski e Girlene, pelo apoio e experimentos compartilhados. Na verdade, eu precisaria citar nominalmente a todos, pois foram diversos os momentos de apoio e contribuição de alguma forma, sou muito grata a toda a equipe.

Aos funcionários da UEFS, Edna Peralta (LAPRON, já aposentada) e Danielle (LAMOL) pela colaboração; à equipe do PPGBiotec pela atenção; e ao amigo e colega Paulo Ricardo (CCMB) pelos inúmeros conselhos técnicos e pela ajuda em diversas metodologias.

A Josiane Monteiro, Patrícia Fiúza e Taimy Cantillo por terem dedicado seu tempo à identificação dos isolados.

Aos professores Dr^a Heiddy Márquez, Dr. Lenaldo Muniz, Dr. Luís Fernando Gusmão, Dr. Cássio van den Berg e Dr. Alexandre Espeleta pela colaboração em diversas etapas deste trabalho.

Às professoras Dr^a Regiane Fávoro e Dr^a Carla Pinheiro que muito contribuíram nas correções deste trabalho na etapa de qualificação.

Aos meus colegas de trabalho, antigos e novos, que me ensinam todos os dias e com quem compartilho muitas experiências de vida.

A todos os professores que, em alguma fase da minha vida, compartilharam do seu saber, para que hoje eu pudesse avançar este degrau da vida acadêmica. Recebam todos meu: muito obrigada!!!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. À CAPES, também, nossos agradecimentos.

As someone once said—"If I had to do this career all over again - I would." The strange and interesting world of fungi offers to us a never-ending challenge of excitement and discovery.

(Tradução livre: Como alguém disse uma vez: 'Se eu tivesse que fazer essa carreira novamente – eu faria'. O estranho e interessante mundo dos fungos nos oferece um interminável desafio de emoção e descoberta.)

Gary A. Strobel

RESUMO

Neste estudo, foi realizada a bioprospecção da comunidade endofítica fúngica de *Lippia organoides* Kunth (Verbenaceae), uma planta amplamente utilizada na medicina popular brasileira para o tratamento de doenças infecciosas. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial antimicrobiano dos isolados fúngicos obtidos. A metodologia envolveu a coleta do material vegetal, isolamento dos fungos endofíticos a partir de folhas e caules, produção de extratos brutos por partição em acetato de etila, identificação dos isolados bioativos por meio de testes antimicrobianos (Difusão em Disco de Ágar e Microdiluição em Caldo), triagem da atividade antioxidante (DPPH) e determinação do perfil fitoquímico dos extratos (CCD). Foram obtidos 129 isolados endofíticos fúngicos. Dos extratos brutos analisados, 31 apresentaram atividade antioxidante e 29 demonstraram potencial antimicrobiano contra pelo menos um dos micro-organismos patogênicos testados. A análise dos perfis fitoquímicos revelou a presença de compostos fenólicos em todos os extratos, esteroides e terpenos em 29 e cumarinas em 7. Adicionalmente, foram realizadas análises quimiométricas nos extratos de quatro isolados promissores para a produção de antimicrobianos, evidenciando semelhanças entre grupos pertencentes a uma mesma espécie. O isolado 1LO-C3.1 BDA (*Phoma-like*) destacou-se por apresentar CIM < 31,25 µg/mL contra *Candida albicans* CCMB 286 e os dermatófitos *Trichophyton tonsurans* URM 4288 e *Epidermophyton floccosum* URM 6209. Os isolados LO C 1.3 EMA (*Alternaria alternata species complex*) e LO C 3.2 EMA (*Alternaria sp.*) apresentaram CIM < 15,625 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* CCMB 263 e *Microsporum canis* URM 6969, inibindo ainda o crescimento de *E. floccosum* URM 6209 em CIM de 62,5 e 31,25 µg/mL, respectivamente. Os resultados obtidos são considerados promissores e reforçam o potencial de *L. organoides* como uma fonte de fungos endofíticos produtores de moléculas com atividades antimicrobianas.

Palavras-chave: bioprospecção; fungos endofíticos; *Lippia organoides*; atividade antimicrobiana; concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

In this study, we conducted a bioprospective study of the fungal endophytic community of *Lippia organoides* Kunth (Verbenaceae), a plant widely used in Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. The aim of this research was to investigate the antimicrobial potential of the fungal isolates obtained. The methodology involved the collection of plant material, isolation of endophytic fungi from leaves and stems, preparation of crude extracts using ethyl acetate partitioning, identification of bioactive isolates through antimicrobial tests (Agar Disc Diffusion and Broth Microdilution), screening of antioxidant activity (DPPH) and determination of the phytochemical profile of the extracts (CCD). A total of 129 fungal endophytic isolates were obtained. Of the crude extracts analyzed, 31 showed antioxidant activity and 29 demonstrated antimicrobial potential against at least one of the pathogenic microorganisms tested. The analysis of phytochemical profiles revealed the presence of phenolic compounds in all extracts, steroids and terpenes in 29 and coumarins in 7. Additionally, chemometric analyses were performed on the extracts of four promising isolates for the production of antimicrobials, evidencing similarities between groups belonging to the same species. The isolate 1LO-C3.1 BDA (Phoma-like) stood out for presenting MIC < 31.25 µg/mL against *Candida albicans* CCMB 286 and the dermatophytes *Trichophyton tonsurans* URM 4288 and *Epidermophyton floccosum* URM 6209. The isolates LO C 1.3 EMA (*Alternaria alternata* species complex) and LO C 3.2 EMA (*Alternaria* sp.) displayed MIC < 15.625 µg/mL against *Staphylococcus aureus* CCMB 263 and *Microsporum canis* URM 6969, also inhibiting the growth of *E. floccosum* URM 6209 at MICs of 62.5 and 31.25 µg/mL, respectively. The results obtained are considered promising and highlight the potential of *L. organoides* as a source of endophytic fungi capable of producing bioactive molecules with antimicrobial properties.

Keywords: bioprospecting; endophytic fungi; *Lippia organoides*; antimicrobial activity; minimum inhibitory concentration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das etapas metodológicas seguidas neste trabalho.....	43
Figura 2: Material Vegetal, exemplares de <i>Lippia origanoides</i> (LO 1, LO 2 e LO 3).....	44
Figura 3: Amostras do material vegetal pós-coleta e desinfestação superficial do material vegetal: organismos LO (A); etapas do procedimento de desinfestação superficial (B); fragmentos do material vegetal, folhas (C) e fragmentos de caule (D) após desinfestação; disposição do material vegetal em placas de Petri contendo meio de cultura, folhas (E) e fragmentos de caules (F).	46
Figura 4: Hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger.....	49
Figura 5: Cromatógrafo a gás Shimadzu CG-2010 acoplado a espectrômetro de massas QP-2010 Shimadzu.....	49
Figura 6: Etapas metodológicas utilizadas nas culturas fermentativas em meio líquido (BD e EM): cultivo em <i>Shaker</i> sob agitação orbital (120 rpm, 28 °C) (A); amostras obtidas após o cultivo (B); procedimento de filtração (C); seguida de secagem (D) e posterior pesagem da biomassa seca (E); partição líquido-líquido em funil de separação (F); extrato solvente + metabólitos obtidos após o processo (G).....	51
Figura 7: Filtração dos extratos e rotaevaporação das amostras.....	52
Figura 8: Cultivo em escala ampliada em meio sólido em placas de Petri (150 mm x 25 mm).....	53
Figura 9: Obtenção do extrato. A – Massa micelial na presença de solvente extrator (acetato de etila); B – macerado após 48 horas; C – após filtração; D – processo de rotaevaporação; E – extrato concentrado após rotaevaporação.....	54
Figura 10: Cultivo em escala ampliada em meio fermentativo de arroz, fungos LO C 3.2 e LO C 4.1 logo após a inoculação.....	55
Figura 11: Etapas metodológicas da Difusão em Disco de Ágar: discos padronizados do isolado fúngico(A); extração dos metabólitos em Acetato de Etila (B); impregnação dos discos de papel de filtro com os extratos (C).....	57
Figura 12: Esquema da metodologia da microdiluição em placa: A – placas de teste; B – placa de controles.....	60
Figura 13: Diluição seriada em placa de microtitulação.....	60

- Figura 14:** Microdiluição em caldo, testagem da atividade antimicrobiana dos extratos brutos dos isolados endofíticos frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, revelação com resazurina.....61
- Figura 15:** Fungos filamentosos dermatófitos cultivados em meio Sabouraud Dextrose Agar (SBA): A – *Trichophyton mentagrophytes* 6272 (*Tm* 6272); B – *T. tonsurans* 4288 (*Tt* 4288); C – *Microsporum canis* 6969 (*Mc* 6969); D – *Epidermophyton floccosum* 6209 (*Ef* 6209).....63
- Figura 16:** Metodologia utilizada na CCD: extratos aplicados e detalhes da placa de sílica na cuba cromatográfica.....71
- Figura 17:** Fungos endofíticos em processo de crescimento a partir dos fragmentos de folhas e caules de de *Lippia organoides* cinco dias após o plaqueamento. A e C – fragmentos de folhas e caules dispostos em meio BDA; B e D - fragmentos de folhas e caules dispostos em meio EMA.....73
- Figura 18:** Fungos endofíticos de *Lippia organoides* isolados em meio Ágar Extrato de Malte (EMA) na primeira coleta.....76
- Figura 19:** Representantes de fungos endofíticos isolados a partir de folhas e caules de um organismo de *Lippia organoides*, na segunda coleta, em meios Batata Dextrose Ágar (BDA) e Ágar Extrato de Malte (EMA).....77
- Figura 20:** Cultivo em escala ampliada em meio Batata Dextrose (BD), em frascos reagentes tipo *Schotts* (300 mL).....84
- Figura 21:** Cultivo em escala ampliada em meio sólido EMA (placas de Petri 150 mm x 25 mm).....84
- Figura 22:** Cultivo em escala ampliada em meio fermentativo de arroz, isolado LO C 4.1 EMA, demonstrando o crescimento após 15 dias.....84
- Figura 23:** Teste de Difusão em Disco de Ágar frente à cepa *Staphylococcus aureus* CCMB 263. A – controles utilizados: Acetato de Etila (parte superior da imagem) – ausência de zona de inibição, Eritromicina (à esquerda da imagem) – diâmetro da zona de inibição 26 mm; e Cloranfenicol (à direita) – zona de inibição 35 mm; B – discos impregnados com extrato bruto do isolado LO C 3.1 EMA – zona de inibição 18 mm; C – discos impregnados com extrato bruto do isolado LO C 4.1 EMA – zona de inibição 14 mm.....87
- Figura 24:** Microdiluição em caldo para teste da linhagem *S. aureus* CCMB 263 frente aos efeitos dos extratos brutos de 11 isolados e extratos de *Lippia organoides*, utilizando revelação com resazurina. A – LO C 1.1 EMA (Fileiras 1 a 3); LO C 1.2 EMA (Fileiras 4 a 6); LO C 1.3 EMA (Fileiras 7 a 9); 1LO C 2.1 EMA (Fileiras 10 a 12); B – LO C 3.1 EMA (Fileira 1 a 3); LO C 3.2 EMA (Fileiras 4 a 6); LO C 3.3 EMA (Fileiras 7 a 8); LO C 4.1 EMA (Fileiras 10 a 12); C – 2 LO F 2.1 BDA (Fileira 1 a 3); 1 LO F 3.1 BDA (Fileiras 4 a 6); LO F 5.1 EMA (Fileiras 7 a 9); Extrato de Caule LO (Fileiras 10 a 12); D – Extrato de Folhas (Fileiras 1 a 3);

Extrato de Caule (Fileiras 4 a 6); Cloranfenicol (Fileira 9); Poços controles positivos e negativos (Fileiras 7 a 12).....92

Figura 25: Microdiluição em caldo para teste da linhagem *S. aureus* CCMB 263 frente aos efeitos dos extratos brutos de 16 isolados, utilizando revelação com resazurina. A – 2 LO C 3.2 EMA (Colunas 1 a 3); 1 LO C 3.2 BDA (Colunas 4 a 6); 3 LO C 1.1 BDA (Colunas 7 a 9); 1 LO C 3.1 BDA (Colunas 10 a 12); B – 1 LO F 1.1 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 1.2 BDA (Colunas 4 a 6); 2 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 8); 2 LO C 3.2 EMA (Colunas 10 a 12); C – 2 LO F2.1 BDA (Colunas 1 a 3); 3 LO C 3.3 EMA (Colunas 4 a 6); 3 LO C 2.1 BDA (Colunas 7 a 9); 3 LO C 2.2 BDA (Colunas 10 a 12); D – 3 LO C 3.2 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 3.2 BDA (Colunas 4 a 6); 3 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); 3 LO F 2.1 BDA (Colunas 10 a 12).....93

Figura 26: Microdiluição em caldo para teste da linhagem *C. albicans* ATCC 10231, observação contra foco de luz, destacando-se o desenvolvimento fúngico mais visível nas colunas de 2 a 4.....95

Figura 27: Microdiluição em caldo para teste da linhagem *C. albicans* CCMB 286, observação contra foco de luz, desenvolvimento fúngico pouco visível.....96

Figura 28: Concentração Fungicida Mínima dos extratos brutos testados frente a *Candida albicans* ATCC 10231, obtida a partir do plaqueamento de alíquotas (10 µL) dos poços da microplaca de titulação, após a incubação por 48 – 72 h. À direita da imagem, esquema de registro de dados.....96

Figura 29: Microdiluição em caldo para teste dos efeitos dos extratos brutos de *Lippia organoides* em relação ao dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* URM6272, 10 dias após o início do experimento. Os extratos brutos dos isolados correspondem à seguinte ordem: A – LO C 1.3 EMA (Colunas 1 a 3); LO C 3.2 EMA (Colunas 4 a 6); LO C 4.1 EMA (Colunas 7 a 9); 1 LO C 3.1 BDA (Colunas 10 a 12); B – 1 LO F 1.1 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 1.2 BDA (Colunas 4 a 6); 2 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); Cetoconazol (Colunas 10 a 12).....99

Figura 30: Microdiluição em caldo para teste dos extratos brutos de *Lippia organoides* em relação ao dermatófito *Trichophyton tonsurans* URM4288, 10 dias após o início do experimento. Os extratos brutos dos isolados correspondem à seguinte ordem: A – LO C 1.3 EMA (Colunas 1 a 3); LO C 3.2 EMA (Colunas 4 a 6); LO C 4.1 EMA (Colunas 7 a 9); 1 LO C 3.1 BDA (Colunas 10 a 12); B – 1 LO F 1.1 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 1.2 BDA (Colunas 4 a 6); 2 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); Cetoconazol (Colunas 10 a 12).....99

Figura 31: Microdiluição em caldo para teste dos extratos brutos de *Lippia organoides* frente ao dermatófito *Microsporum canis* URM 6969, 10 dias após o início do experimento. Os extratos brutos dos isolados correspondem à seguinte

ordem: A – 1 LO F 1.1 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 1.2 BDA (Colunas 4 a 6); 2 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); 2 LO C 3.2 EMA (Colunas 10 a 12); B – 3 LO C 3.2 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 3.2 BDA (Colunas 4 a 6); 3 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); Cetoconazol (Colunas 10 a 12).....100

Figura 32: Microdiluição em caldo para teste dos efeitos dos extratos brutos de *Lippia organoides* em relação ao dermatófito *Epidermophyton floccosum* URM 6209, 10 dias após o início do experimento. Os extratos brutos dos isolados correspondem à seguinte ordem: A – 1 LO F 1.1 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 1.2 BDA (Colunas 4 a 6); 2 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); 2 LO C 3.2 EMA (Colunas 10 a 12).....100

Figura 33: Fungos endofíticos isolados de *Lippia organoides* identificados morfologicamente, morfologia das colônias e conídios: LO C1.1 EM – *Diaporthe* sp. (A e A₁); LO C1.2 EM – *Pestalotiopsis* sp (B e B₁); LO C1.3 EM – *Alternaria* sp.(C e C₁); LO C2.1 EM – *Phoma*-like (D e D₁); LO C3.1 EM – *Alternaria* sp. (E e E₁); LO C3.2 EM – *Alternaria* sp.(F e F₁); LO C4.1 EM – *Drechslera* sp.(G e G₁); 1LO C3.1 BDA – *Phoma*-like (H e H₁); 1LO C3.2 BDA – *Fusarium* sp.(I e I₁); 3LO – C2.3 BDA – 3LO C2.2 BDA – *Myrmecridium* sp (J e J₁); 3LO C2.2 BDA – Ascomiceto com anamorfo *Phoma*-like (K e K₁); 3LO C3.3 BDA – *Phoma*-like (detalhes em microscopia ótica, 400 a 1000x).....104

Figura 34: Conídios solitários flexuosos, septados, marrom claro, largura: 15-26 µm. característicos de *Alternaria alternata* species complex. À esquerda da imagem, conídio do isolado LO C 1.3 EMA e, à direita, isolado LO C 3.2 EMA.....105

Figura 35: Macroconídios fusiformes, ligeiramente curvados, pontiagudos na ponta, principalmente três septados, células basais pediceladas característicos do gênero *Fusarium* spp.....106

Figura 36: Fiálides suportadas diretamente na vesícula, conídios globosos, amarelo claros a brilhantes, característicos do gênero *Aspergillus*.....107

Figura 37: Árvore filogenética de máxima verossimilhança obtida usando RaxML no servidor CIPRES baseado em sequências do espaçador transcrito interno ribossômico nuclear (nrITS) (acima) e sequências do gene da subunidade maior ribossômica nuclear (nrLSU) (abaixo). Números acima dos ramos indicam o valor de *bootstrap* ≥ 70 % e valores de probabilidade posterior na análise Bayesiana iguais ou superiores a 0,95, respectivamente.108.

Figura 38: Placas de sílica gel contendo extratos eluídos (A1: Caule/BDA, B1: Folha/BDA e C1:Caule/EMA). E placas reveladas com solução de DPPH. (A2: Caule/BDA, B2: Folha/BDA e C2: Caule/EMA).....110

Figura 39: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placa padrão (A1 e B1) e revelada com Reagente Anisaldeído Ácido Sulfúrico (AS) (A2 e B2), em luz visível (A1 e A2) e em UV (365 nm) (B1 e B2).....114

- Figura 40:** Cromatografia em Camada Delgada de extratos provenientes do cultivo em caldo Batata Dextrose (A1, B1, C1 e D1) e Caldo Extrato de Malte (A2, B2, C2 e D2), sendo mostradas nas imagens as placas: padrão, sem o uso de reveladores, em luz UV (365 nm) (A1 e A2) e em lâmpada germicida (B1 e B2); após a aplicação dos reveladores Reagente de Produtos Naturais (NP-PEG) (C1 e C2) e Anisaldeído Sulfúrico (AS) (D1 e D2), ambos em luz UV, na mesma faixa de absorvância (365 nm)..... 115
- Figura 41:** Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placa padrão (A1 e B1) e revelada com Reagente Hidróxido de Potássio (KOH) (A2 e B2), em luz visível (A1 e A2) e em UV (365 nm) (B1 e B2)..... 116
- Figura 42:** Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placa padrão (A1 e B1) e revelada com Reagente Dragendorff (A2 e B2), em luz visível (A1 e A2) e em UV (365 nm) (B1 e B2)..... 117
- Figura 43:** Análise de componentes principais (PCA), gráficos de pontuação PC 1 vs PC 2..... 119
- Figura 44:** Dendrograma representando relações de similaridade de composição química entre diferentes grupos de amostras..... 121

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Metabólitos derivados de plantas produzidos por endofítos.....	32
Quadro 2: Locais e períodos de coleta do material vegetal LO – <i>Lippia origanoides</i>	44
Quadro 3: Sequências obtidas para as regiões nrITS e nrLSU referentes aos fungos endofítos LO C 1.3, C 3.1 e C 4.1 EMA, isolados de <i>Lippia origanoides</i>	67
Quadro 4: Resultados dos isolamentos de fungos endofítos a partir da coleta de material vegetal realizada.....	74
Quadro 5: Códigos identificadores dos fungos endofítos isolados da espécie <i>Lippia origanoides</i> nas coletas realizadas.....	76
Quadro 6: Dados de acesso e número do <i>Genbank</i> utilizados para comparação das sequências ITS e LSU.....	108

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Taxas de Colonização dos fungos endofíticos isolados de folhas e caules da espécie *Lippia origanoides* na primeira e segunda coletas.....77
- Tabela 2:** Composição química do óleo essencial das folhas de *Lippia origanoides* Kunth e suas respectivas concentrações, identificados a partir do organismo proveniente de Santa Terezinha-BA, na primeira coleta.....80
- Tabela 3:** Massa média de extrato obtido por placa e quantidade total de extrato obtida para 31 isolados endofíticos fúngicos a partir da metodologia de cultivo em meio sólido.....86
- Tabela 4:** Zonas de inibição (mm) apresentadas pelos isolados endofíticos de *Lippia origanoides* frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* CCMB 263 e *Candida albicans* CCMB 286 na técnica Difusão em Disco de Ágar (DDA).....89
- Tabela 5:** Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) e Concentração Bactericida Mínima ($\mu\text{g/mL}$) apresentadas pelos extratos brutos dos isolados endofíticos de *Lippia origanoides* frente às cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 e *S. aureus* CCMB 263, em testes de microdiluição em caldo.....91
- Tabela 6:** Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) e Concentração Fungicida Mínima ($\mu\text{g/mL}$) apresentadas pelos extratos brutos dos isolados endofíticos de *Lippia origanoides* frente às linhagens *Candida albicans* ATCC 10231 e CCMB 263, em testes de microdiluição em caldo.....97
- Tabela 7:** Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) e Concentração Fungicida Mínima ($\mu\text{g/mL}$), em testes de microdiluição em caldo, apresentadas pelos extratos brutos dos isolados endofíticos de *Lippia origanoides* frente aos fungos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* URM6272; *T. tonsurans* URM4288; *Microsporum canis* URM6969 e *Epidermophyton floccosum* URM6209.....101
- Tabela 8:** Identificação morfológica de fungos endofíticos isolados da espécie *Lippia origanoides* com atividades antimicrobianas.....103
- Tabela 9:** Perfil Fitoquímico Por Cromatografia Em Camada Delgada (CCD) de 30 extratos brutos em acetato de etila, obtidos – de fungos endofíticos isolados de *Lippia origanoides*.....112

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL – microlitros

μg/mL – microgramas por mililitro

BD – Caldo Batata Dextrose

BDA – Batata Dextrose Ágar

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta Básica de Pesquisa de Local de Alinhamento)

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CCMB – Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia

CG-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectometria de Massas

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE/DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção por Arranjos de Diodos

DDA – Difusão em Disco de Ágar

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EM – Extrato de Malte

EMA – Extrato de Malte Ágar

IK ou KI - Índice de Kovats

KI^a – Índice de retenção linear obtido através da equação de Índice de Kovats

KI^b – Índice de retenção linear obtido na literatura

LAMIC – Laboratório de Micologia

LAPRON – Laboratório de Produtos Naturais

LO – *Lippia origanoides*

MH – Müller-Hinton

mg/mL – miligramas por mililitro

N - Número de átomos de carbono do padrão do alcano (C9 a C24)

NI – Compostos não identificados.

NR – Não realizado

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

R – Resistente

ROS – *Reactive Oxygen Species* (em inglês)

SD – Sabouraud Dextrose

SDA – Sabouraud Dextrose Ágar

t'R(A) – Tempo de retenção do pico calculado

t'R(N + 1) – Tempo de retenção do alcano que elui posteriormente ao pico calculado

T'R(N) – tempo de retenção do alcano correspondente ao pico calculado

Tc – Taxa de Colonização

Ti – Taxa de Isolamento

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	BIOPROSPECÇÃO.....	21
2.2	MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	22
2.3	BIODIVERSIDADE DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA FÚNGICA.....	25
2.4	PRODUTOS NATURAIS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	30
2.5	PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS.....	33
2.5.1	A família Verbenaceae	37
2.6	METODOLOGIAS EMPREGADAS NO ESTUDO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	39
3	MATERIAIS	E
	MÉTODOS	43
3.1	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	43
3.1.1	Desinfestação do Material Vegetal, Isolamento e Preservação da Microbiota Endofítica Fúngica.....	45
3.2	<i>SCREENING</i> DAS RELAÇÕES ENTRE ENDOFÍTICOS E SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS.....	47
3.3	OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DO MATERIAL VEGETAL POR HIDRODESTILAÇÃO	47
3.3.1	Análise da Composição Química do Óleo Essencial das Folhas do Material Vegetal	49
3.4	CULTIVO DOS ISOLADOS PARA OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	50
3.4.1	Preparo dos extratos em meio líquido em escala reduzida	50
3.4.2	Preparo dos extratos dos fungos endofíticos em escala ampliada	52
3.4.2.1	Preparo dos extratos em meio sólido	53

3.4.2.2	Cultivo e extração em meio fermentativo de arroz	54
3.5	TESTES ANTIMICROBIANOS	56
3.5.1	Difusão em disco de ágar (DDA)	56
3.5.2	Microdiluição em Caldo	58
3.5.2.1	Testes com bactérias patogênicas <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	59
3.5.2.2	Testes com a levedura <i>Candida albicans</i>	61
3.5.2.3	Testes com fungos filamentosos dermatófitos.....	63
3.6	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS.....	65
3.6.1	Identificação morfológica dos isolados endofíticos	65
3.6.2	Identificação molecular dos isolados endofíticos	66
3.7	TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	69
3.8	PERFIL FITOQUÍMICO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DOS ISOLADOS	69
3.9	ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	71
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	73
4.1	MICROBIOTA ENDOFÍTICA FÚNGICA ISOLADA.....	73
4.1.1	Endofíticos isolados de <i>Lippia origanoides</i> (Kunth)	74
4.2	SCREENING DAS RELAÇÕES ENTRE ENDOFÍTICOS NOS ORGANISMOS DE <i>Lippia origanoides</i> COLETADOS.....	77
4.3	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DO MATERIAL VEGETAL.....	79
4.4	COMPARAÇÃO DO RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS NAS METODOLOGIAS DE CULTIVO TESTADAS	83
4.5	TESTES ANTIMICROBIANOS.....	86
4.5.1	Difusão em Disco de Ágar (DDA)	87
4.5.2	Microdiluição em caldo	90
4.5.2.1	Testes com bactérias patogênicas <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>	90
4.5.2.2	Testes com linhagens da levedura <i>Candida albicans</i>	95
4.5.2.3	Testes com fungos filamentosos dermatófitos.....	98
4.6	IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS	

	ISOLADOS	103
4.6.1	Identificação Morfológica Dos Isolados Endofíticos.....	103
4.6.2	Identificação Molecular dos Isolados Endofíticos.....	107
4.7	TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	110
4.8	PERFIL FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	112
4.9	ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	118
4.9.1	Avaliação da análise multivariada	118
4.9.2	Quimiometria não supervisionada.....	118
5	CONCLUSÃO	122
	REFERÊNCIAS.....	125

1 INTRODUÇÃO

Micro-organismos endofíticos são conceituados como habitantes do interior das plantas, podendo ser encontrados em diversas partes vegetais, como folhas, caule, raízes, sementes, sem causar prejuízos ao hospedeiro ou danos externos visíveis (Khare *et al.*, 2018; Yadav, 2018). Podem ser encontrados vivendo nos espaços intracelulares de raízes, uma das principais portas de entrada para estes micro-organismos (Mengistu, 2020).

As pesquisas relacionadas aos endofíticos apresentam uma grande abrangência de aplicações biotecnológicas, em áreas como medicina, agricultura, indústria (Aboobaker *et al.*, 2019; Rana *et al.*, 2020; Tejesvi; Pirttilä, 2018; Venieraki *et al.*, 2017), tais como controle biológico de fitopatógenos e pragas (Adeleke; Babalola, 2021; Pena *et al.*, 2019); promoção de crescimento vegetal (Ali *et al.*, 2019); produção de fármacos e moléculas bioativas (Polli *et al.*, 2021). Alguns endofíticos demonstraram produção de compostos de ação inseticida, antimicrobiana e anticancerígena, classificados como alcaloides, terpenoides, esteroides, quinonas, fenilpropanoides, fenóis e lactonas (Singh *et al.*, 2021; Fadiji; Babalola, 2020).

Para a obtenção desses micro-organismos, a escolha da espécie vegetal hospedeira deve ser realizada de forma analítica (Strobel; Daisy, 2003), uma vez que os endofíticos se relacionam geralmente de forma mutualística com a planta, produzindo compostos químicos que resultem em benefícios para o hospedeiro, enquanto recebem nutrientes e um habitat protegido. As plantas medicinais são consideradas como uma fonte potencial de endofíticos produtores de metabólitos de importância farmacêutica (Yan *et al.*, 2018), pois, devido a coevolúrem, funcionam como um meta-organismo ou holobionte. Alguns desses micro-organismos desenvolvem a capacidade de produzir os mesmos compostos ou substâncias similares aos que as suas hospedeiras produzem (Pang *et al.*, 2021). No entanto, diversas espécies vegetais, não apenas as utilizadas na medicina popular, têm protagonizado estudos de sua microbiota endofítica em todo o mundo (Strobel, 2018).

A busca por produtos ainda inexplorados pelas indústrias farmacêutica e agroquímica é incessante e, apesar dos recursos tecnológicos hoje existentes, a obtenção desses produtos a partir de matéria-prima natural consiste ainda em uma estratégia de sucesso para a descoberta de novos fármacos (Gómez; Luiz, 2018).

Diversos estudos têm encontrado resultados positivos no que diz respeito à busca por compostos bioativos produzidos pela microbiota endofítica de plantas medicinais (Ravi *et al.*, 2022; Khalil *et al.*, 2021; Ntemafack, *et al.*, 2021; Ogbe *et al.*, 2020; Palanichamy *et al.*, 2018). Os estudos relacionados à microbiota endofítica em plantas tropicais, no entanto, sobretudo das plantas medicinais brasileiras, ainda estão sendo divulgados em pequena escala (Ferreira *et al.*, 2021; Dos Santos *et al.*, 2021; Cardoso *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2020; Carvalho *et al.*, 2019; Pádua *et al.*, 2018; Noriler *et al.*, 2018).

A biodiversidade e o potencial da flora e da fauna brasileira são ainda riquezas naturais pouco exploradas. A flora brasileira dispõe de diversas espécies vegetais de aplicação medicinal, a maioria delas de ação ainda pouco caracterizada cientificamente. Pelo valor intrínseco a essa imensa riqueza biológica como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos, a preservação e o conhecimento destes recursos é fundamental. Justifica-se, assim, o advento das pesquisas de bioprospecção dos biomas brasileiros e da busca por bioprodutos de valor agregado, bem como da realização de pesquisas que valorizem os recursos nacionais e a preservação destes.

Espécies do gênero *Lippia* são frequentemente utilizadas pela medicina popular brasileira no tratamento de doenças microbianas (Souza *et al.*, 2020; Siqueira-Lima *et al.* 2019; Leyva-Jiménez *et al.*, 2019; Pérez Zamora *et al.*, 2018). O gênero *Lippia* compreende cerca de 200 espécies com distribuição pantropical, principalmente na América do Sul e Central; cerca de 120 espécies estão distribuídas no Cerrado e Caatinga, complexos de biomas brasileiros (Lu-Irving, 2021; Almeida *et al.*, 2018; Salimena, 2010; Marx *et al.*, 2010). *Lippia origanoides* Kunth é utilizada como antisséptico, no tratamento de cólicas infantis e menstruais, problemas digestivos e inflamações, febre, dentre outros (Camilo *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2021; Oliveira *et al.*, 2014).

O Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira apresenta *Lippia soides* Cham. como sinonímia da *L. origanoides* Kunth, atribuindo-lhe como nome popular “alecrim-pimenta” (BRASIL, 2021), registrando seu uso como antisséptico orofaríngeo e em afecções de pele (tintura) e como antisséptico em afecções do couro cabeludo (sabonete líquido). A literatura especializada também atribui outras sinonímias a estas espécies, tais como *L. berlandieri* Schauer, *L. berteroi* Spreng, *L. graveolens* Kunth, *L. salviifolia* Cham, *L. schomburgkiana* Schauer (TROPICOS,

2022). Produtos bioativos extraídos de *L. origanoides*, tanto nos óleos essenciais de alguns dos seus quimiotipos, como em extratos de caules e folhas desta espécie apresentaram atividade antimicrobiana, antiparasitária, propriedades antioxidantes e antigenotóxicas, efeitos inseticidas, analgésicos e antinociceptiva (Soares *et al.*, 2017; Sarrazin *et al.*, 2015; Pinto *et al.* 2013).

Tendo como objeto de estudo a microbiota endofítica fúngica isolada de *L. origanoides* Kunth, uma planta medicinal brasileira de tradicional utilização popular, descrita cientificamente em relação à existência de produtos bioativos de ação medicinal em seus óleos essenciais (Pinto *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2007), este trabalho teve como objetivos:

Geral:

- Isolar e identificar a microbiota endofítica fúngica da espécie *Lippia origanoides* Kunth, verificando potencial produção de compostos antimicrobianos.

Específicos:

- Coletar material vegetal e isolar a microbiota endofítica fúngica das folhas e caules da espécie *Lippia origanoides*;
- Preparar extratos dos isolados e extrair metabólitos secundários;
- Realizar triagem de atividades antimicrobianas dos isolados endofíticos fúngicos em testes de inibição a micro-organismos previamente selecionados (bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*; levedura *Candida albicans*; fungos filamentosos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes*; *T. tonsurans*; *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*);
- Definir a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima dos extratos brutos produzidos pelas espécies bioativas em relação aos micro-organismos teste;
- Caracterizar taxonomicamente os isolados bioativos;

- Realizar triagem do perfil fitoquímico dos extratos;
- Comparar o perfil fitoquímico dos extratos metabólicos secundários dos endofíticos ao perfil dos organismos de *L. origanoides* coletados.

A seções deste trabalho sequenciam-se em uma revisão de literatura, contextualizando as principais teorias e informações que o fundamentaram; a descrição da metodologia seguida e das informações técnicas referentes a estes métodos; os resultados obtidos, as discussões e conclusão a respeito da interpretação dos mesmos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOPROSPECÇÃO

A bioprospecção pode ser definida como a utilização de pesquisas com o objetivo de extração de valor econômico a partir da biodiversidade (Galves; Oliveira; Correia, 2021). Estudos de bioprospecção são caracterizados pela busca sistemática, classificação e investigação de novas fontes de compostos químicos, sejam genes, proteínas ou outros produtos que possam levar ao desenvolvimento de um produto de interesse comercial, seja para a indústria química, farmacêutica, cosmética e/ou alimentícia. A coleta de novas espécies vegetais para testes em modelos de *screening* e em técnicas analíticas pode elucidar moléculas cujas atividades configurem ações biológicas potenciais no tratamento de diferentes doenças (Marques *et al.*, 2022).

Almeida; Collares; Barbosa (2015) afirmam que a bioprospecção de micro-organismos abrange estratégias como a exploração da fração cultivável e da fração não-cultivável da biodiversidade microbiana e a prospecção *in silico* de sequências genômicas dos micro-organismos disponíveis em banco de dados, com a finalidade de identificar micro-organismos, genes, enzimas e/ou vias metabólicas e outros compostos moleculares para posteriores aplicações biotecnológicas.

A biodiversidade influencia de maneira significativa na descoberta de novas moléculas bioativas; especialmente nos últimos 50 anos, produtos naturais têm sido investigados como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos. Estudos para conhecimento das espécies nativas com potencial terapêutico ganham grande relevância, especialmente considerando os processos de regulação das relações entre a sociedade, os sistemas socioculturais, natureza e o meio ambiente. Neste contexto, as pesquisas com extratos e óleos essenciais de espécies nativas e o conhecimento da composição química e possível potencial bioativo ampliam as possibilidades de criação de protocolos de uso sustentável da biodiversidade (Silva *et al.*, 2022).

Estudos envolvendo bioprospecção possuem ampla relevância, sendo objeto de diversos grupos de pesquisa no mundo inteiro. Desde os primórdios das civilizações, plantas são usadas para fins medicinais, assim, a bioprospecção de espécies

vegetais, e também de micro-organismos, apresenta grande potencial para a descoberta de substâncias ou produtos de interesse para a sociedade, como novos fármacos efetivos em atividades antiinflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, dentre outras, as quais estão intimamente relacionadas aos metabólitos presentes nas espécies vegetais (Brito *et al.*, 2020).

O presente trabalho pode ser caracterizado como um estudo de bioprospecção a partir de fungos endofíticos isolados de organismos da espécie vegetal *Lippia origanoides* Kunth, com a finalidade de buscar possíveis atividades antimicrobianas nos metabólitos secundários produzidos por estes micro-organismos.

2.2 MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS

A palavra “endofítico” (do grego *endon* – dentro e *phyton* – planta) foi um termo cunhado por Anton de Bary, em 1866 (Khare *et al.*, 2018), quando estes micro-organismos foram descritos pela primeira vez. Os relatos seguintes sobre tais micro-organismos datam do fim do século XIX, a respeito da detecção de células bacterianas no interior de tecidos de tomate, cenoura e beterraba açucareira por Fernbach, um dos estudantes orientados por Louis Pasteur, em 1888 (Holland, 2019).

Em um breve histórico, traçado por Nomani e Shirsh (2020), são relatados: a primeira narração do isolamento de um fungo endofítico, a partir de sementes de *Lolium temulentum* L (joio), em 1898, por Vogl; a identificação de um fungo na espécie *Persian darnel* (joio persa) por Freeman, na Alemanha, em 1904; a primeira descrição da microbiota não-patogênica em tecidos das raízes por Perotti, em 1926, e o isolamento de bactérias nas folhas e caules das plantas aparentemente saudáveis por Henning, em 1940.

São diversas as definições dos micro-organismos endofíticos encontradas na literatura, com pequenas distinções. Podemos referir aqui, inicialmente, uma compreensão simplificada de que são chamados endofíticos os micro-organismos que colonizam os tecidos das plantas sem causar nenhum sintoma aparente (Wani; Hakeem, 2022), destacando-se fungos e bactérias.

Citados por Santos (2019), os pesquisadores brasileiros Azevedo e Araújo (2007) afirmaram considerar endofíticos os micro-organismos, cultiváveis ou não, que

colonizam o interior da planta hospedeira sem causar danos aparentes ou estruturas externas visíveis. Esta definição foi acrescida, pouco depois, por Mendes e Azevedo (2008), que propuseram a classificação dos endofíticos em dois tipos principais, sendo: tipo I, aqueles que não produzem estruturas externas à planta hospedeira; e tipo II, aqueles que produzem estruturas externas, como fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio.

De acordo com Haroim *et al.* (2015), a definição mais comum de endófitos é derivada da descrição prática dada por Hallmann e colaboradores, em 1997, que afirmaram que os endófitos são aqueles (referindo-se mais especificamente às bactérias) que podem ser isolados de tecido vegetal desinfestado na superfície ou extraídos de dentro da planta e que não a prejudiquem visivelmente. Definição esta que tem sido válida para espécies cultiváveis na maioria dos laboratórios no mundo nas últimas duas décadas. Entretanto, este estudo considera que, devido à suspeita de falta de eliminação adequada de ácidos nucleicos após a desinfecção de superfícies de plantas, esta definição pareceu ser menos adequada, levando em conta as espécies de micro-organismos endofíticos não cultiváveis, que puderam ser percebidas mediante a introdução de técnicas de detecção na pesquisa de endófitos, como as tecnologias de alto rendimento, que permitem a investigação de complexos microbiomas.

De acordo com as suas estratégias de vida, os endofíticos bacterianos podem ser classificados como “obrigatórios”, aqueles que dependem estritamente da planta hospedeira para seu crescimento, desenvolvimento e sobrevivência, ou “facultativos”, cuja transmissão ocorre verticalmente ou via vetores para outras plantas. Estes últimos têm um estágio de vida livre no solo, colonizando a planta internamente durante algum período de seu ciclo de vida (Nomani; Shirsh, 2020).

Assim como humanos e outros animais, as plantas possuem um microbioma que desempenha funções importantes em aspectos como saúde e sobrevivência dos hospedeiros, proteção contra outros micróbios, insetos e herbívoros, promoção do crescimento, resistência a estresse hídrico, dentre outras (Rana *et al.* 2020; Aboobaker *et al.* 2019; Tejesvi; Pirtilä, 2018)

Hassani *et al.* (2018) afirmam que as plantas e sua microbiota têm interagido desde a colonização da terra, formando um conjunto de espécies que pode ser referido como um “holobionte”; a pressão seletiva agindo neste, haveria moldado a microbiota associada à planta, contribuindo para a existência dos complexos

conjuntos microbianos na filosfera, rizosfera e compartimentos da endosfera da planta. Nessa concepção, as abordagens laboratoriais utilizadas, apesar de poderem ser consideradas reducionistas, são importantes ao fornecerem ferramentas para a discussão das interações entre procariontes e eucariontes, ilustrando que as interações entre os membros da microbiota são críticas para o estabelecimento e a manutenção de homeostase do hospedeiro. Comunidades endofíticas bacterianas e fúngicas geralmente são investigadas separadamente, mas a interação entre ambos os grupos dentro de plantas pode se tornar um novo campo fascinante na pesquisa em endofíticos (Hardoim *et al.*, 2015).

O termo endofítico tem sido utilizado, portanto, para designar organismos que causam infecções assintomáticas nos tecidos internos de plantas, referindo-se às interações simbióticas entre fungos e plantas, tais como mutualismo e comensalismo. No entanto, o estilo de vida dos endofíticos sofre influência de fatores ambientais, hospedeiro e genótipos microbianos, desproporção na troca de nutrientes entre o micro-organismo e o hospedeiro, assim, eles podem mudar seu estilo de vida, assumindo o patogênico, diante da ocorrência de um desequilíbrio durante o interação entre hospedeiro e micro-organismo (Mengitsu, 2020).

Strobel (2018) nos apresenta uma perspectiva interessante a respeito do gradativo aumento da percepção da presença e do papel exercido pelo endofíticos em sua relação com as plantas hospedeiras, ao refletir que um século atrás buscava-se descrever a patologia e o agente causal de cada doença em vegetais, e qualquer micro-organismo associado a uma planta era suspeito de ser um agente patogênico. Contudo, no século XX, alguns pesquisadores começaram a isolar, descrever e nomear uma gama de não-patógenos das plantas, designados “endofitos” se encontrados nos tecidos vegetais vivos. Estes passaram um tempo estigmatizados, após serem associados a abortos e morte em rebanhos de gado bovino, porém a associação do fungo *Taxomyces andreanea*, isolado da planta *Taxus brevifolia*, à sua capacidade de produzir o fármaco taxol, um complexo diterpenoide de comprovada ação antitumoral, trouxe interesse renovado aos endofíticos.

O taxol é um fármaco anticancerígeno utilizado industrialmente, sua única fonte de extração conhecida era a casca das taxaceas, sendo necessários cerca de 8-10 kg de casca de planta, coletados de cerca de 4 a 5 plantas, para a obtenção de um grama de taxol purificado (El-Sayed *et al.*, 2020). Cech e Oberlies (2023) relatam que, em 1962, Dr. Arthur Barclay e sua equipe encontraram uma casca do teixo *Taxus brevifolia*,

coletada na Floresta Nacional Gifford Pinchot, em Washington, Estados Unidos. Esta casca demonstrou atividade citotóxica promissora contra células cancerígenas, fazendo com que, em 1964, cerca de 30 libras do material vegetal, equivalente a 13,5 Kg, fossem coletadas e enviadas à equipe do Dr. Mansukh Wani, na Carolina do Norte, para a sua purificação em um único composto. Devido à instrumentação cromatográfica disponível para a época, a equipe precisou de um ano e meio para purificá-lo a um único composto ativo, tendo sido obtidos 12 g de taxol.

Estudos conduzidos por Stierle *et al.* (1993) demonstraram que o *Taxomyces andreanea*, fungo endofítico isolado da planta *Taxus brevifolia*, é capaz de produzir tal substância. Anos depois foi encontrada a mesma capacidade no fungo *Pestalotiopsis microspora*, isolado da *T. wallachiana* (Strobel *et al.*, 1996). Desde então, fungos endofíticos de *Taxus* spp. têm sido as fontes de produção industrial de taxol devido a diversas características facilitadoras, como o crescimento rápido, custo-benefício, independência do clima, viabilidade na manipulação. O taxol é, até hoje, o padrão de cuidado no tratamento de neoplasias, incluindo de mama e de ovário, ao ponto de ser considerado um divisor de eras, o antes e o depois do taxol (Mize *et al.*, 2023).

2.3 BIODIVERSIDADE DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA FÚNGICA

Os fungos endofíticos são amplamente distribuídos entre as espécies vegetais. Algumas espécies podem ser isoladas de diferentes famílias de plantas, outras aparentemente estão restritas a certas espécies hospedeiras, ocorrendo particularmente em algumas famílias. A presença e a diversidade de endófitos na microbiota vegetal variam de acordo com o hospedeiro ou tecido específico. Um fungo endofítico é capaz de colonizar mais de um hospedeiro, no entanto, não interage com estes hospedeiros da mesma maneira, tal interação com o hospedeiro pode demonstrar especificidade ecológica e funcional (Shulz; Boyle, 2005).

As plantas estabelecem interações íntimas com micro-organismos mutualistas, especialmente por terem evoluído na presença destes. Algumas características consideradas fundamentais para o sucesso da adaptação vegetal à Terra podem, inclusive, ser atribuídas às relações com micro-organismos simbiotes. Alguns destes

podem ter sido transmitidos por meio de sementes, de forma vertical, ao longo das gerações de plantas, como micróbios persistentes, ou mesmo de forma transitória, por transmissão horizontal. A transmissão de endofíticos entre plantas também pode ocorrer por meio da reprodução de plantas, pela transmissão dos esporos fúngicos por via aérea, pela água ou mesmo por insetos (Hardoim, 2019).

Schulz *et al.* (2015) afirmam que, *in planta*, os fungos endofíticos devem lidar com múltiplas interações de organismos. Para que eles cresçam assintomaticamente em seus hospedeiros, presume-se que exista um equilíbrio de antagonismos entre a defesa do hospedeiro e a virulência do fungo. Para superar a resistência do hospedeiro, os endofíticos podem exercer diversas estratégias, tais como: secreção de metabólitos tóxicos; modulação dos fitohormônios do hospedeiro, desintoxicação de metabólitos constitutivos de defesa e secreção de enzimas líticas.

Com o intuito de compreender a distribuição da comunidade fúngica cultivável nos tecidos vegetais dessa espécie, Fang *et al.* (2019) realizaram o isolamento de fungos endofíticos de *Ageratina adenophora*. A microbiota fúngica cultivável mudou ao longo das áreas geográficas e mostrou certo grau de variação em diferentes tecidos; em folhas maduras e murchas, os fungos cultiváveis flutuaram mais do que em raízes e caules; alguns destes podem sofrer migração e o caule pode ser um tecido de transporte pelo qual os fungos transportados pelo ar infectam raízes. Os autores afirmam trazer evidências de que a comunidade fúngica endofítica da planta foi parcialmente compartilhada com o ambiente contíguo.

Os progressos na pesquisa endofítica têm demonstrado o isolamento da microbiota fúngica em diversos ecossistemas, bem como, grande diversidade de grupos vegetais, incluindo desde samambaias a gimnospermas e angiospermas. Os fungos isolados pertencem a diversos filos, incluindo Ascomycota, Basidiomycota e Mucoromycota (Rana *et al.* 2019).

Hardoim *et al.* (2015) apresentaram os resultados de uma busca a partir de dados de sequências depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) até agosto de 2014. O conjunto de dados de sequências endofíticas eucarióticas ITS completas pertenciam principalmente às seguintes atribuições taxonômicas:

- *Glomeromycota* (40,17%): *Glomeromycetes* são fungos micorrízicos arbusculares, que formam endossimbioses com a maioria das plantas terrestres e são de inegável importância ecológica e econômica.

- *Ascomycota* (30,92%): destacando-se *Dothideomycetes* – 15,07%, muitos dentre estes são fungos fitopatogênicos necrotróficos, notáveis por sua produção de toxinas específicas do hospedeiro, como metabólitos fitotóxicos e peptídeos biologicamente ativos apenas contra uma espécie particular de plantas. Em geral, esta classe contém muitas espécies dos gêneros *Alternaria* e *Epicoccum* compreendendo endófitos. Muitos membros da classe *Sordariomycetes* (9%) são endófitos, como espécies dos gêneros *Balansia*, *Epichloë*, *Nemania*, *Xylaria* e *Colletotrichum*, no entanto, esta classe também é bem conhecida por seus membros fitopatogênicos, como *Cryphonectria parasitica*, *Magnaporthe grisea*, *Ophiostoma ulmi* e *O.a novo-ulmi*, além de espécies de *Fusarium*, *Verticillium* e *Rosellinia*.
- *Basidiomycota* (20,3%): destacando-se *Agaricomycetes* – 18,49%, classe que contém um grande número de endófitos, principalmente formadores de basidiomas. Os membros da ordem *Sebacinales* formam simbioses micorrízicas com uma ampla gama de plantas; outras classes contendo endófitos são *Atractiellomycetes*, *Cystobasidiomycetes*, *Microbotryomycetes* e *Tremellomycetes*
 - Filos não identificados (8%)
 - *Zygomycota* (0,06%)

Os autores afirmam que vários táxons compreendem fitopatógenos conhecidos e também cepas sem efeitos patogênicos conhecidos, indicando que as funções dos fungos endofíticos também podem não necessariamente estar ligadas à taxonomia.

Segundo Cobian *et al.* (2019), as comunidades endofíticas são fortemente selecionadas pelas suas espécies hospedeiras. No entanto, enquanto a espécie hospedeira é a principal determinante da composição da comunidade fúngica, os hospedeiros se associam a um conjunto amplamente único de fungos endófitos, que são diferentes das comunidades associadas com espécies de plantas co-ocorrentes e de plantas da mesma espécie em outras localidades.

A espécie *Calotropis procera* (Apocynaceae), planta originária do sul da Ásia e África, introduzida no nordeste do Brasil, encontrada em condições de alta salinidade ao longo da vegetação de dunas costeiras, foi estudada pela primeira vez fora de sua região de origem. Em um estudo que analisou a comunidade de fungos endofíticos, 156 isolados fúngicos, distribuídos em 19 táxons foram obtidos de 468 fragmentos de folhas de *C. procera*, em diferentes estágios de maturação. Os resultados

demonstraram que a taxa de colonização endofítica aumentou com a idade/desenvolvimento da folha. As espécies dominantes de fungo endofítico isoladas neste estudo foram diferentes daquelas encontradas na mesma espécie e outras espécies do mesmo gênero em regiões nativas. O endofítico dominante foi *Phaeoramularia calotropidis* (63,5 %), seguido por *Guignardia bidwellii* (21,1 %). Dentre os gêneros isolados, podem ser citados: *Acremonium*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Diplodina*, *Glomerella*, *Microascus*, *Phaeoramularia*, *Rhodotorula* e *Xylaria*. Os autores afirmam que algumas das propriedades farmacológicas de *C. procera* podem ser mediadas por seus endófitos fúngicos (Nascimento *et al.*, 2015).

Em uma pesquisa realizada em uma região árida, na África do Sul, a população endofítica de dez espécies de Aizoaceae foi isolada em seu ambiente endêmico, resultando em cinquenta e nove espécies de fungos de 25 gêneros, incluindo quatorze espécies raras. Neste estudo, foi observada uma especificidade sazonal, uma vez que 32 endofíticos fúngicos foram isolados apenas durante as estações de floração e 21 em estação seca. *Fusarium* foi o gênero mais abundante nas amostras da estação de floração; *Alternaria* e *Cladosporium* foram os mais abundantes na estação seca (Pieterse *et al.*, 2018).

A micobiota de 11 amostras de sementes de *Zea mays* (Poaceae) foi isolada, 169 isolados fúngicos foram obtidos da superfície e dos tecidos internos da semente, 16 espécies distintas foram identificadas, pertencentes a 10 gêneros, 15 deles eram ascomycetos. Dentre essas espécies, sete foram isoladas exclusivamente de tecidos internos, duas espécies foram isoladas apenas da superfície da semente, e outras seis espécies foram isoladas tanto da superfície como dos tecidos internos. *Aspergillus niger* foi encontrado com abundância relativa; além de espécies de *Fusarium* e *Penicillium*. Os resultados mostraram que a incidência geral de infecção fúngica diminuiu com o tempo de armazenamento, não houve associação entre o tempo de armazenamento das sementes e a riqueza de espécies fúngicas ou abundância relativa, a composição da micobiota associada ao milho sementes foi altamente variável entre as amostras. A detecção dos quatro principais micotoxigênicos, os gêneros fúngicos, especificamente *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria*, foi muito alta (Xing *et al.*, 2018).

Dentre os estudos da micobiota endofítica realizados nas plantas da família Verbenaceae, podem ser citados os realizados em: *Stachytarpheta cayennensis*,

coletadas no estado Amazonas, Brasil (Paes *et al.*, 2018); *Lippia sidoides* Cham., nos estados Tocantins (Ferreira *et al.*, 2017) e Pernambuco, Brasil (De Siqueira *et al.*, 2011); *Lippia citriodora* Kunth, na província de Hamedan, no Iran (Golparyan *et al.*, 2018).

O isolamento da microbiota fúngica de *Stachytarpheta cayennensis*, planta medicinal de ocorrência natural na região amazônica, indicou a presença de 8 gêneros de endofíticos associados: *Aspergillus* (32,84 %), *Beauveria* (0,59 %), *Fusarium* (0,59 %), *Paecilomyces* (5,92 %), *Penicillium* (18,05%), *Trichoderma* (22,49 %), *Colletotrichum* (6,51 %), *Scopulariopsis* (1,48 %), *Mycelia sterilia* (11,54 %) (Paes *et al.*, 2018).

Quinze fungos endofíticos morfologicamente distintos foram obtidos a partir de fragmentos de folhas frescas de *L. sidoides* Cham, espécie medicinal nativa do nordeste brasileiro, sinônima de *L. organoides* Kunth . Os isolados foram identificados morfologicamente no nível de gênero como *Colletotrichum sp.*(02), *Verticillium sp.* (01), *Alternaria sp.* (01), *Phomopsis sp.* (01), *Fusarium sp.* (03), não identificados (7) (Ferreira *et al.*, 2017).

Estudos sobre endofíticos evidenciam que a presença destes pode não apenas influenciar o crescimento da planta, seu desenvolvimento, aptidão e diversidade, mas também a dinâmica populacional, a diversidade da comunidade de plantas e o funcionamento do ecossistema. Os genomas coletivos de micro-organismos que vivem em associação com plantas originou o conceito de “microbioma vegetal”, levando a novas idéias sobre a evolução vegetal, em que as forças seletivas atuam no próprio genoma da planta, bem como na planta inteira, incluindo a sua comunidade microbiana associada (Hardoim *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, pesquisas relacionadas ao microbioma vegetal progrediram significativamente devido ao advento do sequenciamento paralelo massivo. Esses estudos ajudaram a definir diferentes tipos de microbiomas vegetais e interações planta-microbioma. Essas conjuntos não são estáticos, eles podem mudar em resposta a estímulos ambientais, incluindo estresses abióticos e fatores bióticos. Há cada vez mais evidências de que a estrutura dos microbiomas vegetais é o resultado de uma série de interações inversas entre a planta, os micróbios e suas condições físicas e químicas ambientais (Pang *et al.*, 2021).

2.4 PRODUTOS NATURAIS PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os metabólitos naturalmente derivados e/ou subprodutos de micro-organismos, plantas ou animais são denominados produtos naturais. Normalmente, são derivados do metabolismo secundário e utilizados pelos organismos fonte para diversas funções, dependendo da origem, habitat e atividade específica exercida no organismo de origem. Têm sido utilizados pela humanidade há milhares de anos e estão associados a diversas finalidades, constituindo as fontes mais importantes de novos agentes terapêuticos potenciais (Bernardini *et al.*, 2018).

Os avanços nos métodos automatizados de “triagem de alto rendimento” (do inglês, *high-throughput screening* – HTS) e tecnologias de isolamento, nas últimas décadas, contribuíram para o incremento das pesquisas relacionadas a produtos naturais, especialmente nas áreas da medicina e agricultura. No início dos anos 2000, a maioria das grandes empresas farmacêuticas encerrou seus HTS e empreendimentos de bioprospecção, no entanto, a baixa produtividade de química combinatória e *design* de drogas tem contribuído para um retorno aos posicionamentos da farmacognosia e ao ressurgimento da descoberta de produtos naturais como uma fonte importante de medicamentos atuais no mercado (David *et al.*, 2015).

No final da década de 1980, a síntese química ganhou força na produção de novas drogas, ainda assim, de acordo com Newman e Cragg (2016), da década de 1940 até o final de 2014, das 175 moléculas aprovadas na área do câncer, 131 (75%) são diferentes do “S” (sintético), sendo 85 (49%) produtos naturais ou derivados diretamente deles. Nesse aspecto, destaca-se a área anti-infecciosa, bastante dependente de produtos naturais e suas estruturas. Um número significativo de medicamentos/produtos naturais é produzido por micro-organismos e/ou interações microbianas com o hospedeiro (de onde foi isolado) e, portanto, esta área de pesquisa de produtos naturais deve ser expandida significativamente.

Ensaio com compostos antigos de várias fontes, considerados muito tóxicos para serem usadas como candidatos a medicamentos, estão sendo retomados como “ogivas”, provenientes de todas as fontes de produtos naturais, ligadas a anticorpos monoclonais ou a transportadores poliméricos, sendo (Cragg; Newman, 2018).

Em um artigo de revisão, Rana *et al.* (2020) compila relatos de micro-organismos endofíticos produtores e as classes de metabólitos produzidos, dentre eles:

- a) Aldeídos – Caetopiranina, derivado de benzaldeído isolado de fungos endofíticos *Chaetomium globosum* (Wang *et al.*, 2006);
- b) Alcaloides – vincristina (Oncovin) pode ser obtido de *Catharanthus roseus*, utilizado para o tratamento de leucemia linfocítica aguda, doença de Hodgkin, neuroblastoma (Montgomery, 2017); também relacionados à produção da vincristina são citados *Fusarium oxysporum* e *Talaromyces radicus* (Kumar *et al.*, 2013; Palem *et al.*, 2015);
- c) Cromonas – Pestalotiopsone F 22 foi relatada na cultura do fungo endófito *Pestalotiopsis* (Xu *et al.*, 2009);
- d) Ciclohexanonas – *Apiospora montagnei*, um fungo marinho, foi relado como produtor de diterpeno mirocina A, ácido apiospórico, ácido 9-hidroxi-hexilitacônico e epiepoxidona (Klemke *et al.*, 2004);
- e) Depsidonas – *Pleosporales* capaz de produzir três novas depsidonas (Pittayakhajonwut *et al.*, 2006);
- f) Depsipeptídeos – Beauvericina isoladas do endofítico *Fusarium oxysporum* (Zhan *et al.*, 2007);
- g) Ergocromos – A ergoflavina foi isolada dos fungos *Claviceps purpurea*, *Phoma terrestris*, *Pyrenochaeta terrestris*, *Penicillium oxalicum* e espécies de *Aspergillus* (Deshmukh *et al.*, 2009);
- h) Ésteres – Ácido orselínico e ésteres globosumonos foram isolados de *Chaetomium globosum* (Bashyal *et al.*, 2005);
- g) Lactonas – Brefeldin A é uma lactona antiviral, produzida por diferentes gêneros fúngicos, mais recentemente teve sua produção associada a *Cladosporium sp.*, isolado de *Quercus variabilis* (Wang *et al.*, 2007)
- h) Lignanais – relatada a produção de podofilotoxina lignana de *Phialocephala fortinii* (Eyberger *et al.*, 2006);
- l) Peptídeos – Antibiótico leucinostatina foram identificadas em filtrado da cultura do fungo *Penicillium lilacinum* (Kawada *et al.*, 2010);
- j) Poliquetídeos – do extrato bruto da cultura de *Pestalotiopsis clavispora* foram isolados seis derivados de poliquetídeos (Hemphill *et al.*, 2016));
- k) Quinonas – Dois novos metabólitos de benzoquinona isoladas de um fungo endofítico *Xylaria sp.* (Tansuwan *et al.*, 2007);

- l) Espirobisnaftalenos – extratos de cultura de *Preussia sp.* levaram ao isolamento de spiropreussione, spiropreussione e espiropreussomerina, três novos análogos de espirobisnaftaleno (Chen *et al.*, 2009).

Um aspecto determinante que influencia a composição química do material vegetal de partida é representado pela presença de organismos endofíticos, como fungos e bactérias, que habitam o interior das plantas e produzem seus próprios metabólitos secundários. Como consequência, extratos vegetais podem conter moléculas derivadas de organismos endofíticos ou produzidas por plantas como resultado da interação com eles (David *et al.* 2015).

Diversos compostos naturais de aplicações farmacológicas, produzidos em quantidades ínfimas pelas plantas, são produzidos por micro-organismos endofíticos. Além do célebre paclitaxel (Taxol®), isolado da casca do teixo do Pacífico, *Taxus brevifolia* (Dewick, 2009), podem ser citados: trabectedina (Yondelis), utilizado contra o câncer de mama, isolada do esguicho do mar *Ecteinascidia turbinata*, primeiro medicamento anticancerígeno marinho aprovado na Europa depois da citarabina (Mayer *et al.* 2010); mevastatina, produzida por *Penicillium citrinum*, do grupo das estatinas sintéticas exemplificadas pela atorvastatina (Verpoorte *et al.*, 2009).

Relatos da literatura referem-se ao isolamento de quantidade considerável de substâncias com atividade biológica produzidas por endofíticos. Singh *et al.* (2021) relatadas atividades antimicrobianas, antiparasitárias, antivirais, neuroprotetivas, antioxidantes, antineoplásicas, dentre outras. No quadro 1 são relacionados alguns exemplos dos fitometabólitos, suas atividades e fungos endofíticos fontes e hospedeiros vegetais.

Metabólitos	Atividade/Aplicação	Endofítico fonte	Planta hospedeira	Referência
Alcaloides				
- Piperina	Antimicrobiana Anti-inflamatória, anticâncer	<i>Phomopsis sp</i>	<i>Oryza sativa</i>	Mathew <i>et al.</i> , 2017
- Sanguinarina	Antimicrobiana Anticâncer Anti-inflamatória Antioxidante Antihelmíntica neuroprotetiva	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Macleaya cordata</i>	Singh e Sharma, 2018
- Solamargina	Anticâncer Citotóxica	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Solanum nigrum</i>	El-Hawary <i>et al.</i> , 2016

Cumarinas				
- Bergapteno	Antioxidante	<i>Botryodiplodia theobromae</i>	<i>Dracaena draco</i>	Zaher <i>et al.</i> , 2015
Flavonoides				
- Quercetina	Anti-inflamatória, Anticâncer Antioxidante	<i>Nigrospora oryzae</i>	<i>Loranthus micranthus</i>	Ebada <i>et al.</i> , 2016
- Vitexina	Antioxidante Antitumoral Neuroprotetiva	<i>Dichotomopilus funicola</i>	<i>Cajanus cajan</i>	Gu <i>et al.</i> , 2018
Lignanas				
- Podophyllotoxina	Antitumoral, antiviral	<i>Alternaria tenuissima</i>	<i>Podophyllum emodi</i>	Liang <i>et al.</i> , 2016
Saponinas				
Diosgenina	Anti-inflamatória, Antitumoral	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Dioscorea nipponica</i>	Ding <i>et al.</i> , 2014
Terpenos				
Asiaticoside	Antidermatítico Anti-inflamatório Antioxidante Imunomodulatória	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Centella asiatica</i>	Gupta <i>et al.</i> , 2018
Xantonas				
- Lapachol	Antimicrobiana Anti-inflamatória, Anticâncer Antiparasitária	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Tabebuia argentea</i>	Channabasava; Govindappa, 2014
- Hypericina	Antidepressivo Antimicrobiano Antiretroviral	<i>Epicoccum nigrum</i>	<i>Hypericum perforatum</i>	Vigneshwari <i>et al.</i> , 2019

Quadro 1: Metabólitos derivados de plantas produzidos por endofíticos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022)

2.5 PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE MICRO-ORGANISMOS ENDOFÍTICOS

As plantas medicinais são utilizadas tradicionalmente na medicina popular há centenas de anos. Os conhecimentos, inicialmente transmitidos oralmente por gerações, foram gradualmente compilados, passando a fazer parte da identidade cultural de vários povos. O retorno ao uso dessas preparações terapêuticas tem, inclusive, encontrado estímulo após multiplicarem-se na literatura especializada informações sobre experimentos científicos que atestam determinadas propriedades farmacológicas de inúmeras espécies. As medicinas tradicionais chinesa, indiana, tibetana, árabe e japonesa possuem registros bem documentados a respeito do uso

das plantas medicinais, o que leva a um escopo maior de pesquisas científicas realizadas nessa área nesses países (Costa; Gutierrez, 2016).

No Brasil, em 2006, o Ministério da Saúde (MS) publicou a Portaria 971/2006, que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), definindo que órgãos e entidades do MS deveriam promover a elaboração ou a readequação de seus planos, programas, projetos e atividades, estimulando o uso da Medicina Tradicional/Medicina Complementar/Alternativa nos sistemas de saúde de forma integrada às técnicas da medicina ocidental modernas. Como Medicina Tradicional e Complementar/Alternativa - MT/MCA estão citadas na referida portaria: a Acupuntura, a Homeopatia, o Termalismo Social/Crenoterapia e a Fitoterapia. A portaria traz ainda alguns eventos e documentos considerados marcos na construção dessa política, dentre eles o Decreto Presidencial de 17 de fevereiro de 2005, que cria o Grupo de Trabalho para elaboração da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. À época do documento, verificou-se que a fitoterapia estava presente em 116 municípios brasileiros, contemplando 22 unidades federadas.

Segundo Pinto *et al.* (2013), os primeiros médicos portugueses que vieram para o Brasil, muito cedo foram obrigados a perceber a importância dos remédios indígenas devido à escassez, na colônia, de remédios empregados na Europa, dando início aos estudos relacionados ao potencial das nossas plantas medicinais. Entretanto, as pesquisas por micro-organismos associados aos produtos naturais das plantas medicinais brasileiras só começaram a ser investigados a poucas décadas.

Em revisão sistemática, sobre a relação entre fungos endofíticos e plantas medicinais, Jia *et al.* (2016) consideraram que existem três tipos de interações benéficas entre endofíticos fúngicos e suas plantas hospedeiras: (1) melhoria do crescimento das plantas medicinais hospedeiras, (2) aumento da resistência das plantas hospedeiras a estresses bióticos e abióticos, e (3) acúmulo de metabólitos secundários, incluindo os compostos usados como drogas, produzidos originalmente pelas plantas medicinais. Neste último, é considerada uma aplicação importante o fato de que os endofíticos podem promover o acúmulo de metabólitos secundários originalmente produzidos por plantas; podendo utilizá-los no aprimoramento da síntese e acúmulo dos compostos bioativos das plantas medicinais hospedeiras para drogas brutas de maior qualidade. Esta aplicação pode abrir uma dimensão completa para a produção de medicamentos naturais de forma extremamente eficaz.

Palupi *et al.* (2021) exploraram a biodiversidade e a bioatividade de metabólitos ativos produzidos por 14 fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Physalis angulata* L. (Solanaceae), na Indonésia. Esta planta medicinal também presente no Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste brasileiros, principalmente na Amazônia, é usada tradicionalmente em chás e infusões no combate à asma, hepatite, malária, reumatismo e também como diurético e analgésico. Quatorze fungos endofíticos foram isolados de flores, caules, folhas e cascas de frutos de PA. O fungo *Hyphomycetes*, isolado da flor, exibiu atividade antioxidante moderada índice antioxidante de 0,59 (IC50 = 52,43 µg/mL). Os experimentos indicaram que seis isolados têm forte atividade antibacteriana contra *E. coli* e *S. aureus* com valor de concentração inibitória mínima (CIM) variando de 8-64 µg/mL: um *Hyphomycetes* (isolado da flor), um *Fusarium sp.* (isolado do caule), e quatro *Colletotrichum sp.* (isolados de folhas e cascas de frutos), sendo estes considerados potenciais como novas fontes de metabólitos ativos, especialmente para compostos antibacterianos.

Zanthoxylum simulans Hance (Rutaceae) é uma especiaria natural e planta medicinal, comumente conhecida como pimenta Szechuan ou pimenta chinesa, cresce na ilha de Kinmen, Taiwan. Neste estudo, amostras de folhas e caules de *Z. simulans*, coletadas no verão e no inverno, foram testadas para fungos endofíticos produtores de metabólitos antimicrobianos e anti-inflamatórios. Dentre as 113 cepas endofíticas isoladas e cultivadas, 23 apresentaram atividade antimicrobiana, dentre os gêneros: *Penicillium* (26,09%, 6), *Colletotrichum* (21,74%, 5), *Diaporthe* (21,74 %, 5), *Daldinia* (17,39%, 4), *Alternaria* (8,70%, 2) e *Didymella* (4,34%, 1). O estudo revelou que *Z. simulans* pode conter grandes e diversas comunidades de fungos endofíticos e sua composição varia sazonalmente. Além disso, fungos endofíticos produzem agentes antimicrobianos, que podem proteger seus hospedeiros contra patógenos e podem ser uma fonte potencial de antibióticos naturais (Kuo *et al.*, 2021).

Pádua *et al.* (2018) estudaram a comunidade fúngica endófitas das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae), no Brasil, avaliando sua potencial produção de L-asparaginase. Os ramos e folhas têm inúmeras propriedades medicinais, sendo utilizada como anti-inflamatório, antiulcerogênico e cicatrizante. Foram isolados 187 endófitos, conferindo uma taxa de colonização de fragmentos de folhas da caatinga (10,41 %) inferior aos do brejo de altitude (39,58 %), neste também foi encontrada maior riqueza e diversidade. Os gêneros fúngicos isolados forma pertencentes às classes *Ascomycota* (*Botryosphaeriales*, *Chaetothyriales*,

Diaporthales, *Eurotiales*, *Glomerellales*, *Hypocreales* e *Pleosporales*) e *Basidiomycota* (*Polyporales*). O gênero *Diaporthe* foi o mais frequente e também foi o melhor produtor de L-asparaginase. Os autores consideraram que, em seu habitat natural, *M. urundeuva* abriga uma importante diversidade de endófitos, que poderiam ser usados na produção da enzima L-asparaginase, que atualmente é utilizada como medicamento e também tem aplicação na fabricação de alimentos.

Bauhinia forficata (Fabaceae), planta medicinal nativa da América do Sul, é amplamente utilizada na medicina popular no Brasil no tratamento de doenças como diabetes, infecções e como analgésico. Neste estudo, a diversidade, a atividade antibacteriana e as enzimas hidrolíticas extracelulares de fungos endofíticos associados a esta planta foram estudados. No total, 95 fungos endofíticos foram isolados (18 de folhas, 22 de sépalas, 46 de caules e nove de sementes), sendo a diversidade e a riqueza de espécies maiores nos tecidos do caule. Dentre as 28 espécies isoladas, as mais frequentes foram: *Acremonium curvulum* (9,5%), *Aspergillus ochraceus* (7,37%), *Gibberella fujikuroi* (10,53%), *Myrothecium verrucaria* (10,53%) e *Trichoderma piluliferum* (7,37%). *Aspergillus ochraceus*, *Gibberella baccata*, *Penicillium commune* e *P. glabrum* foram os que apresentaram maior atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e/ou *Streptococcus pyogenes*. Treze espécies apresentaram atividade proteolítica, principalmente *Phoma putaminum*. Quatorze espécies foram celulasas positivas (particularmente espécies de *Penicillium* e *Myrmecridium schulzeri*). Todos os isolados testados foram positivos para xilanase, 10 apresentaram atividade lipolítica, especialmente *Penicillium glabrum*. Os autores consideram que os fungos endofíticos de *B. forficata* têm potencial para a produção de compostos bioativos (Bezerra *et al.*, 2015).

Um trabalho realizado na Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, Brasil, por Ribeiro (2011), teve como objetivo o isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Mikania laevigata* (Asteraceae). Foram obtidos 40 isolados, dos quais 15 foram selecionados e caracterizados pelos aspectos morfológicos como ascomicetos da família Xylariaceae. A investigação molecular resultou na identificação de 3 cepas de *Nodulisporium* sp., 3 cepas de *Hypoxylon* sp., 1 cepa de *Daldinia* sp. e 1 espécie identificada como *Xylaria luteostromata*.

2.5.1 A família Verbenaceae

A Caatinga representa um bioma exclusivamente brasileiro que apresenta em um grande número de plantas com potencial medicinal. Dentre estas, a família Verbenaceae, das dicotiledôneas com princípios aromáticos, caracterizada por ervas, arbustos, árvores ou trepadeiras lenhosas, com ramos regulares ou serrados; consiste em uma família relativamente grande e um elemento importante na flora de América do Norte e do Sul, especialmente em climas temperados quentes e regiões tropicais. Incluem várias espécies economicamente importantes utilizadas para o fornecimento de madeira, especiarias e ornamentos. Compreende 32 gêneros e 800 espécies atualmente aceitas. Os quatro maiores gêneros são *Lantana*, *Lippia*, *Priva* e *Verbena* (Cardoso *et al.*, 2021; De Souza *et al.*, 2020).

O gênero *Lippia* compreende 150 espécies, herbáceas, arbustivas ou pequenas árvores, a maioria apresenta propriedades medicinais. Além do México, o Brasil é um dos principais centros de diversidade específica das espécies de *Lippia*, com 98 espécies endêmicas (Salimena; Múlgura, 2015). O referido gênero foi classificado em sete seções, com base nas características morfológicas diferenciais. A seção *Goniostachyum* Schauer, considerada monofilética e caracterizada por pequenas variações no número de cromossomos ($2n = 12$), sofreu uma revisão das espécies, resultando na validação de quatro representantes: *L. grata* Schauer, *L. origanoides* Kunth, *L. sericea* Cham. e *L. stachyoides* Cham. Algumas nomeações de espécies ou variedades devem ser considerados sinônimos de *L. origanoides* incluindo, entre outros, *L. sidoides*, *L. graveolens* Kunth, *L. microphylla* Cham., *L. salviifolia* Cham., *L. velutina* Schauer e *Lantana origanoides* Martens & Galeotti (Almeida *et al.*, 2018).

Lippia origanoides Kunth, popularmente conhecida no Brasil como “alecrimpimenta”, nativa da região nordeste do Brasil e norte do estado de Minas Gerais (Brasil), é uma espécie aromática utilizada como antisséptico e antimicrobiano, geralmente é aplicada topicamente na pele, mucosas, boca e garganta (Oliveira *et al.*, 2014).

Lippia graveolens, popularmente conhecida como “orégano” (especialmente no México e nos Estados Unidos), é também considerada atualmente sinônima de *L. origanoides*. A infusão das partes apicais da planta tem sido utilizado para tratar distúrbios gastrointestinais, como diarreia, cólicas e dores de estômago, relatando-se

também o uso como abortivo. As atividades dos extratos demonstram propriedades: antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes. Nos óleos essenciais foi verificada a presença de compostos ativos como astimol, carvacrol, p-cimeno e γ -terpineno. (Ombito *et al.*, 2014).

Lippia sidoides, syn. *L. organoides*, apresenta forte atividade antimicrobiana e está incluída no programa de Fitoterapia do Ministério da Saúde do Brasil, devido à sua atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, sendo esta atribuída à presença de terpenoides no seu óleo essencial (Almeida *et al.*, 2018). Estudos realizados nos óleos essenciais dessa espécie comprovaram amplo espectro antimicrobiano e os testes fitoquímicos demonstraram presença de várias substâncias como: terpenos, esteroides, cumarinas, saponinas, flavonoides e ácidos fenólicos em caules e folhas. Os principais constituintes voláteis frequentemente encontrados nos óleos essenciais da *L. organoides* são majoritariamente: o p-cimeno, α - e γ -terpineno, timol, carvacol, β -cariofileno, α -felandreno e δ -careno (Pinto *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2007).

A microbiota endofítica da *Lippia* spp. ainda é pouco explorada no Brasil. Alguns trabalhos foram referidos na seção 2.2, destacando-se a os estudos da microbiota fúngica sinonímia *Lippia sidoides* Cham. (Ferreira *et al.*, 2017; De Siqueira *et al.*, 2011). Ferreira *et al.* (2017) testaram a atividade eliciadora de fitoalexinas de *L. sidoides* Cham. e seis fungos endofíticos associados, verificando a síntese das enzimas em resposta à ação antioxidante e antifúngica. Tanto o óleo essencial de *L. sidoides* quanto os extratos dos fungos endofíticos *Verticillium* sp., *Fusarium* sp. 1 sp. 2 e o isolado LS-14, tiveram uma resposta positiva na indução de fitoalexina e a presença de enzimas relacionadas à atividade antioxidante foi demonstrada.

De Siqueira *et al.* (2011) realizaram o isolamento de 203 fungos endofíticos de folhas e caules de *L. sidoides*, 14 espécies relativas aos grupos Ascomycota, Coelomycetes e Hifomicetos. As espécies fúngicas com maiores frequências de colonização foram: *Colletotrichum gloeosporioides* (12,3%), *Alternaria alternata* (7,08%), *Guignardia bidwellii* (6,87%) e *Phomopsis archeri* (5,41%). Foram isoladas apenas de folhas *Curvularia pallescens*, *Dreschlera dematioidea*, *G. bidwellii*, *Microascus desmosporum*, *Peacilomyces variotti*, *Periconia byssoidea* e *Ulocladium oudemansii*; enquanto *Fusarium lateritium* e *Phoma tracheiphila* foram isoladas apenas de caules, considerados, portadores de especificidade tecido-hospedeiro. A colonização endofítica foi encontrada majoritariamente em folhas (50,4%).

Da planta *L. citriodora* Kunth. (Verbenaceae) foram isolados 48 endófitos, considerando fungos e bactérias. Apenas os endófitos com atividade antifúngica positiva em experimentos realizados foram identificados taxonomicamente, dentre eles, *Aspergillus sp.* Neste estudo, métodos de pulverização foliar e encharcamento do solo para aplicação de inóculos de endófitos foram usados em ensaios *in planta*. Os resultados mostraram que endófitos fúngicos e bacterianos aumentaram parâmetros de crescimento de *L. citriodora*, como altura da planta, número de folhas, peso fresco e peso seco da parte aérea, raiz e folha (Golparyan *et al.*, 2018).

2.6 METODOLOGIAS EMPREGADAS NO ESTUDO DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Para os estudos dos metabólitos secundários, os esforços nas análises químicas de produtos naturais são direcionados para o desafio de detectar e identificar os componentes moleculares presentes em amostras complexas e, frequentemente, em quantidades pequenas.

Liu e Liu (2018) descrevem sequencialmente os principais procedimentos adotados para as análises do fungo endófito *Pestalotiopsis fici*, isolado de ramos sadios de *Camellia sinensis* (Theaceae), como um exemplo para análises de metabólitos secundários: 1. Isolamento, cultivo e preservação da microbiota; 2. Fermentação em escala reduzida; 3. Extração dos Metabólitos Secundários; 4. Ensaios para triagem dos endófitos (ex.: atividade antimicrobiana); 5. Aumento de escala de fermentação para os fungos que apresentarem efeito positivo na triagem; 6. Análise de metabólitos fúngicos (ex.: sistema de cromatografia líquida de alta performance – CLAE/HPLC). De acordo com os autores, esses procedimentos podem ser adotados para outros fungos após pequenas modificações.

Metodologia semelhante foi adotada por Ferreira *et al.* (2017), acrescentando-se que, nesse caso, os endófitos foram selecionados de acordo com testes de fungitoxicidade fungo fitopatogênico do milho, *Curvularia lunata*; também foram realizadas determinação de: compostos fenólicos totais (método Folin-Ciocalteu), de flavonóides totais e a capacidade antioxidante (método DPPH) dos extratos fúngicos.

Em estudos de bioprospecção, a identificação molecular é uma das estratégias para a compreensão da biodiversidade da microbiota associada a determinadas espécies vegetais. Após o isolamento e preservação da microbiota, são realizados procedimento de identificação dos micro-organismos, por caracterização morfológica, seguida do isolamento de DNA genômico, amplificação de sequências intergênicas, a exemplo da região ITS, e análise filogenética (Palanichamy *et al.*, 2018).

O metabólito secundário E-G6-32 produzido pelo fungo endofítico *Curvularia* sp. G6-32, isolado da planta medicinal *Sapindus saponaria* L., foi investigado em relação ao seu potencial antioxidante e o teor total de compostos fenólicos, sendo submetido a testes espectroscópicos e análises espectrométricas de massa (Polli *et al.*, 2021)

Palanichamy *et al.* (2018) utilizaram os métodos espectrofotométricos espectro ultravioleta (UV) e espectro infravermelho (FT-IR) para a análise e caracterização do metabólito secundário bruto do isolado endofítico *Alternaria* sp. MGTMMMP031, identificando o metabólito secundário bioativo como alternariol éter metílico.

A metabolômica consiste em uma análise comparativa dos metabólitos encontrados em conjuntos de amostras biológicas, como caldos fermentados. Uma área interdisciplinar que tem crescido nos últimos anos, em virtude do desenvolvimento e aplicação de técnicas como eletroforese, cromatografia e espectrometria. Para pesquisas de metabólitos bem-sucedidas são requeridos eficazes sistemas de extrações e para metabólitos não-alvos, sendo realizados estudos de caracterização funcional e estrutural de proteínas ligadas a metais em diferentes organismos e tecidos, levado à compreensão dos complexos processos que envolvem as metaloproteínas (Silva; Silva, 2020). Os métodos de extração necessitam capturar uma ampla quantidade de metabólitos celulares e biofluidos, excluindo componentes, tais como proteínas que não são destinadas às análises. Os estudos metabolômicos são realizados por análises comparativas sobre os perfis metabólicos individuais obtidos para as diferentes amostras, sendo esse conjunto de informações analíticas interpretado com o objetivo de refletir todos os metabólitos secundários detectáveis e presentes nas amostras em estudo (Funari *et al.*, 2013).

Assim como nas análises de metabólitos secundários vegetais, os métodos mais amplamente utilizados para as análises dos metabólitos secundários endofíticos incluem: cromatografia a gás, cromatografia acoplada a espectrometria de massa (CG-MS); cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (CL-MS); eletroforese capilar-MS (CE-MS); espectroscopia de ressonância magnética nuclear

(RMN); espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR); imagiologia por espectrometria de massa (MSI) e espectrometria de massa de célula única ao vivo (LSC-MS). Tais métodos são usados frequentemente de forma combinada, por fornecerem informações complementares entre si, analisando diferentes tipos de metabólitos (Pang *et al.*, 2021).

Com o objetivo de reduzir as análises de produtos do metabolismo secundário ao nível unicelular, permitindo a separação das células vegetais das células microbianas potencialmente associadas e produção de análises individualizadas, têm surgido novas abordagens, como: imagem por espectrometria de massa (MSI) – técnica em desenvolvimento para medir a distribuição espaço-temporal de muitas biomoléculas nos tecidos (Boughton; Thinakaran, 2018); ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) e eletropulverização por ablação a laser ionização (LAESI) – a ablação por laser consiste em um processo no qual um feixe de laser é focado na superfície de uma amostra para remover o material da zona irradiada (Bhattacharjee *et al.*, 2020; Silva; Silva, 2020); espectrometria de massa de célula única ao vivo (LSC-MS) – técnica que permite a detecção de centenas a milhares de picos de metabólitos adquiridos de uma única célula vegetal em poucos minutos, sendo as células vegetais observadas primeiramente sob um estereomicroscópio, uma célula de interesse é escolhida e então amostrada, usando um microcapilar de vidro revestido de metal para análise subsequente (Masuda *et al.*, 2018); pipeline de metabolômica espacial (metaFISH) – técnica que combina microscopia de hibridização *in situ* de fluorescência (FISH) e espectrometria de massa de dessorção/ionização a laser assistida por matriz de pressão atmosférica de alta resolução para captar imagens das simbioses hospedeiro-micro-organismo e suas interações metabólicas (Geier *et al.*, 2020).

Métodos de análise estatística multivariada e univariada são utilizados para extrair a informação relevante dos dados. Nas multivariadas, são aplicados métodos não supervisionados, como análise de componentes principais (PCA, do inglês, *Principal Component Analysis*), e métodos supervisionados, como análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, *Partial Least Squares Discriminant Analysis*), e projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês, *Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis*). Nas análises univariadas, as variáveis de estudo (entidades ou metabólitos) são avaliadas separadamente e desprezadas as relações entre elas, são exemplos frequentemente

utilizados ANOVA, teste t de Student, ou de Mann-Whitney U (Canuto *et al.*, 2018).

O conjunto dos micro-organismos que podem ser cultivados em laboratório – denominado “culturome” – e as técnicas de sequenciamento de metagenoma fornecem informações para a caracterização do microbioma vegetal. Para obter o culturome, as células cultiváveis na comunidade microbiana são selecionado usando meio sólido ou meio líquido, e o sequenciamento *shotgun* subsequente permite a identificação da identidade taxonômica das células cultivadas (Pang *et al.*, 2021).

Misra (2020) considera que, mesmo com esse progresso nas pesquisas, ainda existem muitos desafios para descomplicar o complexo metaboloma. Futuros avanços em estratégias analíticas, fluxos de trabalho computacionais e análise de dados, melhorias das técnicas e aumento das plataformas de metabolômica e sequenciamento serão necessários para análises integradas usando ambas as abordagens e permitirão a superação dos desafios atuais para as análises da microbiômica e metabolômica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A figura 1 apresenta, de forma resumida, um esquema das etapas metodológicas que serão descritas nesta seção.

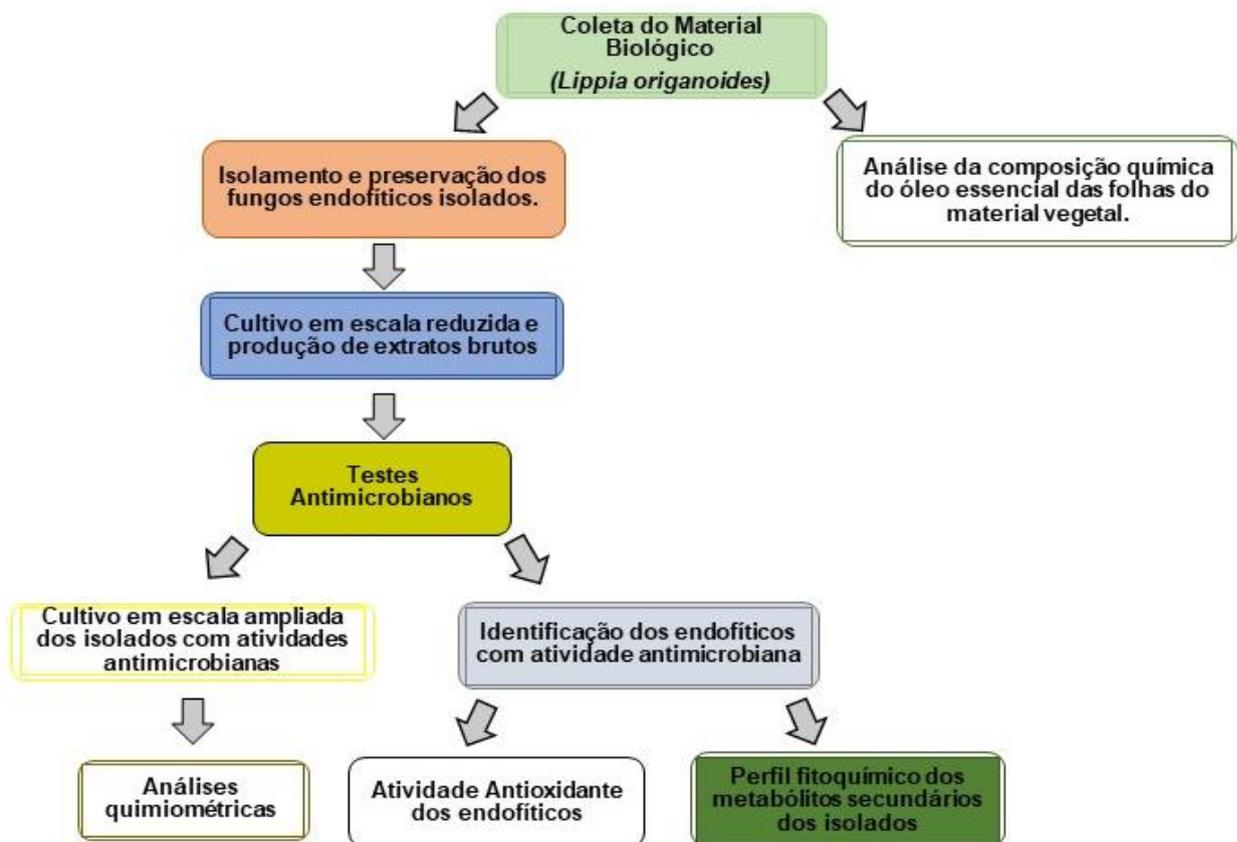


Figura 1: Representação esquemática das etapas metodológicas seguidas neste trabalho.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

3.1. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Foram coletadas partes vegetais de exemplares da espécie *L. origanoides* (LO) sob a supervisão do Prof. Dr. Lenaldo Muniz de Oliveira. O material foi acondicionado em sacos plásticos, sendo encaminhado imediatamente para o Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) da UEFS, e submetidas ao procedimento de isolamento dos fungos endofíticos em um período entre 12 e 24 h após

a coleta. Todas as amostras foram coletadas no período da manhã.

A Figura 2 apresenta imagens dos três organismos de *L. organoides* obtidos na coleta realizada em 10/03/2017; a seguir, os locais e períodos de coleta do material vegetal são apresentados no Quadro 2. As coletas foram realizadas em duas estações, verão em inverno, com o objetivo de possíveis comparações futuras relacionadas à quantidade e propriedades de óleo essencial, bem como aos endofíticos fúngicos isolados. (Silva, 2017; Bedoya *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014).

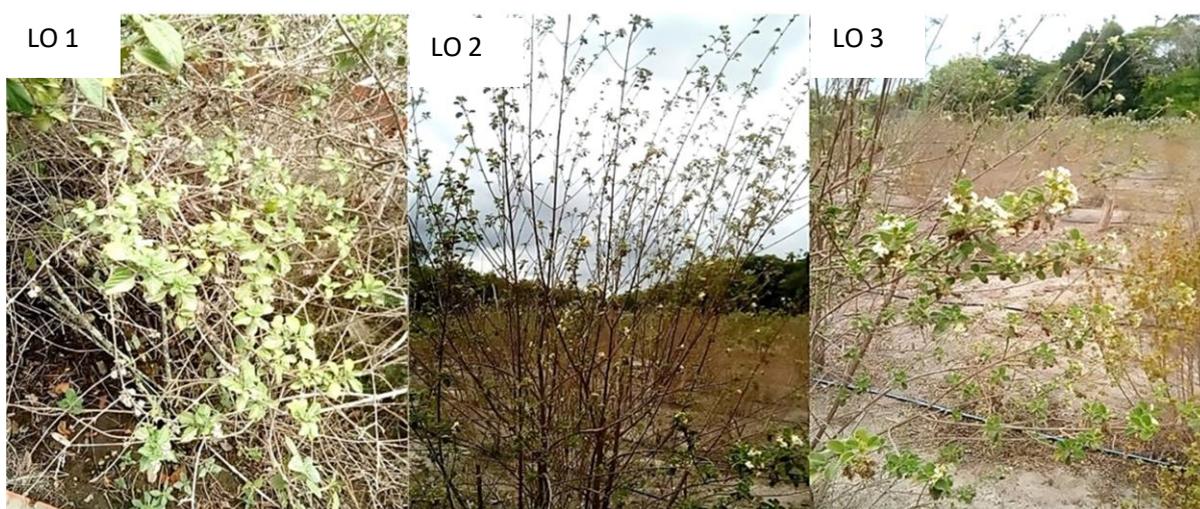


Figura 2: Material Vegetal, exemplares de *Lippia organoides* (LO 1, LO 2 e LO 3).
Fonte: Arquivos pessoais do autor (2017).

Período da Coleta	1ª coleta: 07/08/2015 (inverno)	2ª coleta: 10/03/2017 (verão)
Informações a respeito da coleta	5 placas para cada órgão vegetal 3 folhas por placa 3 fragmentos de caule por placa 01 tipo de meio (EMA)	5 placas para cada órgão vegetal 3 folhas por placa 3 fragmentos de caule por placa 02 tipos de meios (BDA e EMA)
Espécie LO	3 organismos: Origem: Santa Terezinha -BA (O) 39° 32' 14,8" / (S) 12° 35' 46,8" Altitude: 140 m	3 organismos cultivados no Horto Florestal da UEFS: LO 1 – 83373 Herbário UEFS; LO 2 (Origem: Jaguarari-BA) (O) 40° 13' 58" / (S) 10° 05' 20,4" Altitude: 543 m LO 3 (Origem: Santa Bárbara-BA) (O) 38° 58' 15,5" / (S) 12° 01' 04,5" Altitude: 270 m

Quadro 2: Locais e períodos de coleta do material vegetal LO – *Lippia organoides*.
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

3.1.1 Desinfestação do Material Vegetal, Isolamento e Preservação da Microbiota Endofítica Fúngica

Para o isolamento da microbiota endofítica fúngica, o material vegetal foi lavado em água corrente e, posteriormente, folhas e caules com aparência sadia foram selecionados e submetidos ao processo de desinfestação superficial. O principal objetivo deste procedimento é a eliminação da sujeira e parte dos micro-organismos epifíticos que possam estar presentes na superfície dos tecidos vegetais.

A desinfestação do material vegetal obtido na primeira coleta foi realizada em câmara asséptica, seguindo uma sequência de imersão em álcool a 70% (v/v), hipoclorito de sódio (NaClO) 2 - 2,5%(m/v), seguida de lavagem em água destilada estéril, três vezes (De Siqueira *et al*, 2011). Devido a contaminações ocorridas em etapas de teste da equipe de pesquisa, o protocolo de desinfestação seguintes foi adaptado, aumentando-se os tempos de imersão: em álcool a 70% (v/v) por 5 minutos para folhas e 10 minutos para os caules; hipoclorito de sódio (NaClO) 2 - 2,5% (m/v) por 3 minutos para as folhas e 5 minutos para caules; sequência de lavagem em água destilada estéril, três vezes por 1 minuto cada.

Após a desinfestação, foram retirados, com auxílio de um bisturi estéril, o ápice do limbo foliar e o pecíolo de cada folha, devido à maior concentração de contaminantes nestas regiões, e para facilitar o contato do endofíticos com os nutrientes do meio de cultura. Os caules foram cortados em fragmentos de aproximadamente 2 cm de comprimento.

Após tais procedimentos, os fragmentos vegetais foram dispostos em placas de Petri (90 x 15 mm), sendo utilizados os meios de cultura: Ágar Batata Dextrose – BDA (Himedia®) e Extrato de Malte Ágar – EMA (Himedia®), ambos acrescidos com Cloranfenicol (100 µg/mL, Sygma-Aldrich), preparados de acordo com as orientações do fabricante.

Para o controle da efetividade do procedimento de desinfestação superficial, foi realizado o plaqueamento de 100 µL da última água de lavagem utilizada, em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo o meio BDA ou EMA (De Siqueira *et al*, 2011).

Para o plaqueamento, três folhas selecionadas (tamanho médio de 3 cm) e três fragmentos de caule (2 cm) do mesmo organismo foram dispostos separadamente em placas de Petri (90 x 15 mm), com cinco repetições para cada organismo. A figura 3

ilustra os procedimentos desde a desinfestação superficial do material vegetal ao plaqueamento dos fragmentos deste material nos meios de cultivo BDA e EMA.

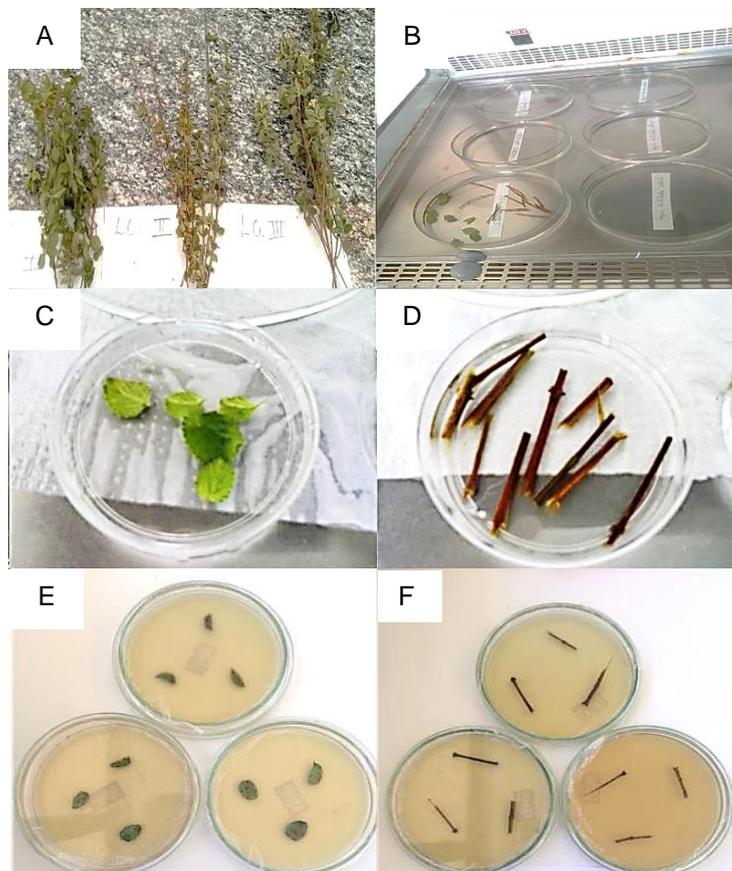


Figura 3: Amostras do material vegetal pós-coleta e desinfestação superficial do material vegetal: organismos LO (A); etapas do procedimento de desinfestação superficial (B); fragmentos do material vegetal, folhas (C) e fragmentos de caule (D) após desinfestação; disposição do material vegetal em placas de Petri contendo meio de cultura, folhas (E) e fragmentos de caules (F).

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2017).

As placas de Petri foram incubadas em estufa de crescimento, a 28 °C, sendo examinadas diariamente para verificação da emergência de fungos endofíticos, por um período de até 45 dias. À medida que os endofíticos emergiam do interior do fragmento vegetal, eram retirados discos miceliais padronizados (6 mm de diâmetro), em câmara asséptica, e transferidos para novas placas de Petri, contendo o meio de cultura utilizado para o isolamento.

Os isolados foram denominados de acordo com a sua procedência: LO – fungos isolados na primeira coleta; 1 LO, 2 LO e 3 LO para os isolados na segunda coleta,

correspondendo aos 3 organismos respectivamente. Para as placas nas quais foram plaqueadas folhas, os fungos receberam a identificação “F”; no caso dos caules “C”; seguidos dos números de 1 a 5 (de acordo com a placa de origem) e de outro dígito identificador, por ordem em que foram isolados a partir da placa inicial, bem como do meio em foram isolados (BDA ou EMA).

Para a preservação dos isolados obtidos, optou-se pela técnica de Castellani (1967), que consiste na transferência de discos miceliais em ágar para frascos de vidro, contendo água destilada estéril (10 mL), sendo estes mantidos fechados, à temperatura ambiente, para posteriores utilizações.

3.2 SCREENING DAS RELAÇÕES ENTRE ENDOFÍTICOS E SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS

De acordo com Huang *et al.* (2008), a colonização endofítica pode ser avaliada por dados como: Taxa de Colonização (Tc) – calculada pelo número total de pedaços de tecidos da planta colonizados pelos endofíticos e dividido pelo número total de pedaços incubados para aquela amostra de planta, sendo expresso em porcentagem.

As taxas de colonização nos fragmentos dos órgãos vegetais de LO pelos fungos endofíticos foi definida considerando cada parte vegetal analisada (folhas e caule) como um tratamento, obteve-se a Taxa de Colonização (Tc) por coleta e por parte vegetal plaqueada (Taylor; Hyde; Jones, 1999).

$$\text{Taxa de Colonização (Tc)} = \frac{\text{Número de Fragmentos com Crescimento fúngico}}{\text{Número total de fragmentos}} \times 100$$

3.3 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DO MATERIAL VEGETAL POR HIDRODESTILAÇÃO

O óleo essencial de amostras do material vegetal de LO foi analisado no

Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) para a caracterização do quimiotipo das plantas analisadas. O material coletado foi pesado e, em seguida, triturado em um liquidificador industrial, com adição de água destilada para facilitar o processo. A biomassa contida foi transferida para um balão de destilação com capacidade para 3 L, sendo submetido ao processo de hidrodestilação, utilizando um aparelho tipo Clevenger (figura 4), com duração de três horas, a partir do início do processo de refluxo da água condensada no tubo separador (Simões *et al.*, 2017).



Figura 4: Hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger.

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2018).

Os óleos obtidos (procedimento realizado em duplicata) foram coletados do tubo de separação com o auxílio de uma micropipeta, tipo Pasteur, sendo desidratados por adição de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrados e conservados em frascos de vidro, sendo armazenados sob baixa temperatura ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) para evitar a degradação e manter a reprodutibilidade das análises. Os cálculos de rendimento foram realizados anteriormente ao seu armazenamento, utilizando-se a relação entre o volume de óleo coletado (consequentemente se caracteriza na massa de óleo essencial) e a massa de material vegetal utilizada na extração (Teles, 2014).

3.3.1 Análise da Composição Química do Óleo Essencial das Folhas do Material Vegetal

Os compostos dos óleos essenciais das amostras vegetais foram analisados por Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a um detector de Ionização em Chama (CG/DIC) e Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas. A análise quantitativa dos constituintes foi realizada em um cromatógrafo modelo Varian CP-2280, com detector de ionização de chama (DIC) e coluna DB-5 ms (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). A temperatura do DIC e do injetor foi de 240°C e 220°C, respectivamente. A temperatura do forno foi programada para 60°C com aumento de 3°C/min até atingir 240°C, sendo mantida por 20 min nesta temperatura. O gás de arraste foi hélio, com fluxo de 1 mL/min, e modo de split de 1:50. Os resultados foram expressos em percentual relativo de cada constituinte, calculados pelo método da normalização (Teles, 2014).

A análise qualitativa foi realizada em cromatógrafo modelo Shimadzu GC-2010 model (Figura 5), acoplado a detector de massas modelo GC/MS-QP 2010 Shimadzu, e equipado com coluna capilar coluna RtX-5ms (30 m x 0,25 mm, espessura de filme 0,25 µm). O gás de arraste utilizado também foi o hélio (1mL/min) e as condições para a corrida cromatográfica foram: temperatura do forno – 60°C a 240°C (3°C/min), 20°C (20 min); temperatura do injetor 220°C; relação de Split de 1:10, temperatura da interface: 240°C; temperatura da fonte de ionização: 200°C; energia de ionização 70 eV; corrente de ionização: 0,7kV.



Figura 5: Cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010 acoplado a espectrômetro de massas QP-2010 Shimadzu.

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2018).

A identificação dos compostos foi realizada a partir de comparação com o banco de dados do CG/EM (NIST21 and NIST107), através de fontes de literatura (Adams, 2007) e injeções de padrões autênticos e do cálculo do Índice de Kovat's (fórmula abaixo), sendo este calculado pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de n-alcenos: C9-C24).

$$I_K = \frac{100 N + 100 \cdot (\log t'_{R(A)} - \log t'_{R(N)})}{(\log t'_{R(N+1)} - \log t'_{R(N)})}$$

Onde:

IK ou KI = Índice de Kovats

N = Número de átomos de carbono do padrão do alcano

(C9 a C24) $t'_{R(A)}$ = tempo de retenção do pico calculado

$t'_{R(N)}$ = tempo de retenção do alcano correspondente ao pico calculado

$t'_{R(N+1)}$ = tempo de retenção do alcano que elui posteriormente ao pico calculado

3.4 CULTIVO DOS ISOLADOS PARA OBTENÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

3.4.1 Preparo dos extratos em meio líquido em escala reduzida

Os isolados endofíticos foram cultivados em meio líquido, em frascos reagentes tipo *Schotts*, para a obtenção de metabólitos secundários. Estes foram repicados em placas contendo o meio de cultura no qual foram isolados (BDA ou EMA), incubados (7 dias, 28 °C). Após o crescimento das colônias, discos padronizados (6mm) de ágar foram transferidos das placas de Petri para frascos reagentes tipo *Schotts*, contendo 300 mL de meio de cultivo em caldo Batata Dextrose ou Extrato de Malte a 10 % (Schulz; Boyle, 2005). A quantidade de discos foi padronizada: 10 discos para cada 100 mL de meio de cultivo.

As culturas foram, então, mantidas sob agitação em uma Incubadora Refrigerada de Bancada ou *Shaker* (Cientec C TT – 712R), a 120 rpm, temperatura 28°C, por 15 dias. As massas miceliais obtidas foram transferidas para funis de Büchner e filtradas

em frascos Kitassatos com auxílio de sistemas de bombas de vácuo (Marconi MA 057/1). A biomassa úmida obtida era retida em círculos de papel de filtro (Whatman), previamente secos e pesados (2 h, 105 °C) e encaminhada para secagem (60 °C, 24 h). Ao fim desse período, foram pesadas em Balança Analítica (Shimadzu) e anotada a biomassa seca obtida (Ghormade; Pathan; Deshpande, 2017).

O filtrado das culturas foi submetido a procedimento de partição líquido-líquido pela adição do solvente acetato de etila (v/v), sendo filtrado com auxílio de funis de separação. Após o procedimento, os meios de culturas pós-extração puderam ser desprezados, enquanto o solvente contendo os extratos metabólicos de cada cultura foram acondicionados em frascos reagentes tipo *Schotts* devidamente identificados (Figura 6).



Figura 6: Etapas metodológicas utilizadas nas culturas fermentativas em meio líquido (BD e EM): cultivo em *Shaker* sob agitação orbital (120 rpm, 28 °C) (A); amostras obtidas após o cultivo (B); procedimento de filtração (C); seguida de secagem (D) e posterior pesagem da biomassa seca (E); partição líquido-líquido em funil de separação (F); extrato solvente + metabólitos obtidos após o processo (G).

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2018).

Os produtos da extração solvente + metabólitos foram filtrados, após a adição de uma quantidade mínima de Sulfato de Sódio Anidro (q.s.p) para retirada da parte aquosa, e as amostras foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório (Fisaton) a 45 °C até remoção da maior parte do solvente, seguida de evaporação espontânea do mesmo em capela de exaustão por 24 a 72 h (Figura 7) (Simões *et al.*, 2017).



Figura 7: Filtração dos extratos e rotaevaporação das amostras.
Fonte: Arquivos pessoais do autor (2019).

Os extratos brutos secos provenientes do metabolismo secundário dos fungos endofíticos obtidos através dessa metodologia foram utilizados nos experimentos de triagem da atividade antimicrobiana descritos na seção 3.5.

3.4.2 Preparo dos extratos dos fungos endofíticos em escala ampliada

Após as triagens das atividades antimicrobianas realizadas (seção 3.5), com o objetivo de selecionar o método de cultivo que propiciasse fornecimento de maior quantidade de rendimento final do extrato bruto e possibilidades analíticas dos metabólitos secundários para os fungos que demonstraram atividades antimicrobianas. Foram testadas as seguintes condições para o cultivo dos isolados endofíticos em escala ampliada:

- a) meio líquido – 15 frascos reagentes tipo *Schotts*, com 300 mL de meio, sob agitação orbital (conforme metodologia descrita na seção 3.4.1, ampliando a quantidade de frascos reagentes para 15). Essa metodologia de cultivo foi utilizada os isolados que demonstraram atividade antimicrobiana nos testes realizados, como descrito na seção 3.5;
- b) meio sólido – 15 placas de Petri (150 mm x 25 mm) para cada fungo. Tempo e temperatura de incubação: 15 dias, 28 °C;
- c) cultivo em meio fermentativo de arroz – 15 frascos reagentes tipo *Schotts*, realizado com os isolados LO C 3.2 e LO C 4.1.

3.4.2.1 Preparo dos extratos em meio sólido

Os meios sólidos utilizados para o cultivo em escala ampliada foram Batata dextrose ágar (BDA) e de Extrato Malte Ágar (EMA - Bahia Malte) e Extrato de Malte (EMA – Himedia) preparados de acordo com as orientações do fabricante. Os fungos endofíticos isolados de LO foram repicados em placas contendo meio EMA e BDA (de acordo com o meio de isolamento) e incubados por 7 dias a 28 °C. Para a cultura em escala ampliada, 10 discos miceliais de 06 mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri (150 mm x 25 mm), onde permaneceram por 15 dias de crescimento, a 28 °C (Figura 8). Foram produzidas 15 placas para cada isolado (Da Silva, 2014).



Figura 8: Cultivo em escala ampliada em meio sólido em placas de Petri (150 mm x 25 mm).

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2019).

Após o período de incubação, foi realizada a raspagem de toda a massa micelial produzida na superfície do meio de cultura, para cada isolado endofítico, e esta foi acondicionada em um frasco reagente tipo *Schott*, coberta, a seguir, com 300 mL de acetato de etila, para extração por maceração inerte, e mantida longe da presença de luz.

Após 48 horas, os macerados foram filtrados com auxílio de funil de Buchner. Todo o processo de maceração inerte utilizando o solvente acetato de etila foi repetido por duas vezes consecutivas, uma hora e duas horas após a primeira extração, repetindo o processo com 300 mL de solvente a cada extração.

O filtrado foi submetido a secagem com sulfato de sódio anidro (FMAIA) e o solvente foi removido sob pressão reduzida pelo evaporador rotatório (Fisaton) à temperatura de 45 °C para obtenção dos extratos brutos. A metodologia desde a extração em solvente até a obtenção do extrato concentrado em acetato de etila após a rotaevaporação são apresentadas na Figura 9.

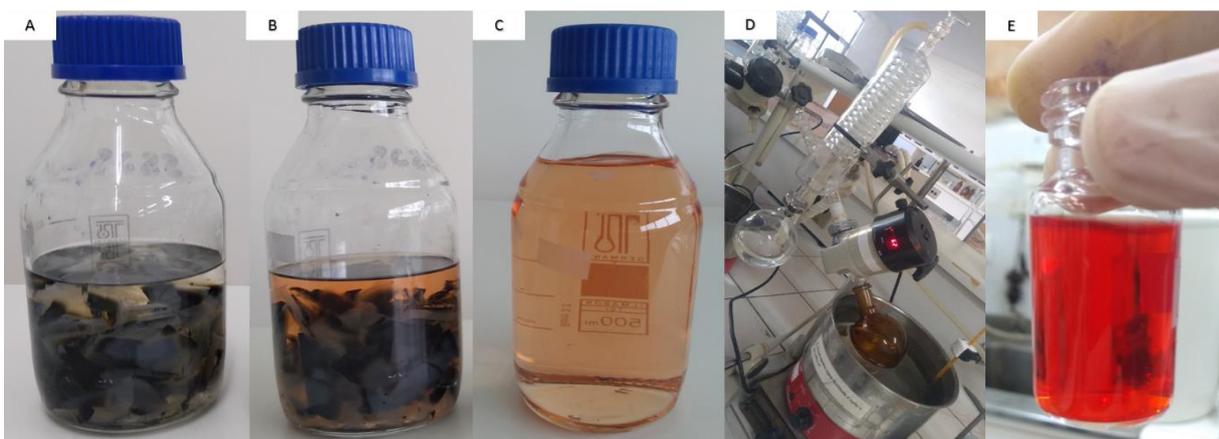


Figura 9: Obtenção do extrato. A – Massa micelial na presença de solvente extrator (acetato de etila); B – macerado após 48 horas; C – após filtração; D – processo de rotaevaporação; E – extrato concentrado após rotaevaporação.

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2019).

3.4.2.2 Cultivo e extração em meio fermentativo de arroz

Os fungos endofíticos foram repicados em placas de Petri (90 x 15 mm) contendo meio de cultura EMA, seguido de incubação por 7 dias, 28 °C. Até o momento, após triagens das atividades antimicrobianas, os isolados LO C3.2 EMA e

LO C4.1 EMA, foram cultivados seguindo essa metodologia com o objetivo de ampliação das massas dos extratos brutos produzidos, a fim de submetê-los às análises cromatográficas.

O meio de cultivo de arroz foi preparado pela adição de 80g arroz (branco, subgrupo polido, tipo 1) a 110 mL de água destilada em frascos reagentes tipo *Schotts* de 500 mL, os quais, após esterilização em autoclave a 121 °C, foram utilizados como meio de cultivo na forma sólida (Chagas *et al.*, 2017).

Para o cultivo, 04 discos miceliais (6 mm diâmetro) foram transferidos das placas de Petri para frascos reagentes, contendo 10 mL de meio BD. As culturas foram mantidas sob agitação em incubadora com agitação orbital (Marconi MA420) a 120 rpm, a 28°C. Os cultivos foram interrompidos após 4 dias. Então, foram transferidos para frascos reagentes tipo Schotts de 500 mL, contendo meio de cultivo de arroz (Figura 10).



Figura 10: Cultivo em escala ampliada em meio fermentativo de arroz, fungos LO C 3.2 e LO C 4.1 logo após a inoculação.

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2021).

Os frascos foram incubados por 30 dias, a 28°C, e, então, as culturas foram submetidas à extração com 300 mL acetato de etila, em processo de maceração inerte, como descrito também para o preparo dos extratos em meio sólido (3.7.2). Após filtração em funis de separação, o filtrado foi submetido a secagem com sulfato de sódio anidro (FMAIA) e remoção do solvente sob pressão reduzida pelo rotaevaporador (Fisaton), a 45° C, para obtenção dos extratos brutos.

3.5 TESTES ANTIMICROBIANOS

3.5.1 Difusão em disco de ágar (DDA)

O teste de Difusão em Disco – Kirby-Bauer (Hudzicki, 2009) foi realizado como técnica de triagem para avaliar a atividade antimicrobiana frente às linhagens bacterianas *Staphylococcus aureus* CCMB 263 (resistente a novobiocina), *Escherichia coli* CCMB261 (resistente a sulfonamida) e a levedura *Candida albicans* CCMB 286 (resistente a fluconazol e anfotericina B), provenientes da Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB – UEFS).

Os micro-organismos patogênicos acima descritos foram cultivados em meio Mueller Hinton Broth – MH (Himedia®) acrescido de 2,5 % de Ágar Bacteriológico (Himedia®), por 18-24 h de crescimento (37 °C), para as bactérias e em Ágar Sabouraud (Himedia®), por 48 h (28 °C), para a levedura, preparados de acordo com as orientações do fabricante. Colônias isoladas foram transferidas separadamente para tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,85%. A densidade das suspensões bacterianas foi ajustada com auxílio do aparelho Colorímetro (Biochrom® Libra S2), absorvância de 580 nm, para a concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹, na suspensão contendo a levedura para aproximadamente 5×10^5 UFC.mL⁻¹ (de acordo com condições previamente testadas). Após homogeneização, 100 µL da suspensão bacteriana foi espalhado com auxílio de alça de Drigalski em placas contendo Ágar MH (Peralta, 2010).

Para o preparo dos discos impregnados com os extratos fúngicos, os isolados de LO foram cultivados por 7 dias em meio BDA a 28°C em estufa de crescimento e, após incubação, 6 fragmentos miceliais padronizados (6 mm de diâmetro) de cada fungo foram transferidos para tubos de ensaio individuais estéreis, cobertos com papel alumínio e devidamente identificados. Os fragmentos miceliais foram macerados com bastão de vidro com a adição de 4 mL de acetato de etila, permaneceram em repouso por 24 h, à temperatura ambiente, para uma melhor ação do solvente e extração de metabólitos.

Após o repouso, o sobrenadante foi transferido para frascos sem tampa para a evaporação do solvente e ressuspensos em 1 mL do mesmo. Discos de 6 mm de

diâmetro de papel de filtro (Whatman), previamente esterilizados, foram impregnados com 5 µL dessa suspensão (9 discos para cada extrato), na concentração de 100 µg/disco, e dispostos nas placas inoculadas com o patógeno (de acordo com as técnicas supra-referidas). Após período de incubação (24 h à 37°C para as bactérias e 48 h à 28 °C para a levedura, em estufa de crescimento), os diâmetros dos halos de inibição, quando presentes, foram medidos com o auxílio de régua (Figura 6). A partir da literatura consultada (BrCAST, 2024, 2024; Radji *et al.*, 2011; Gong e Guo, 2009), os halos de inibição ao redor dos discos impregnados com extrato bruto dos isolados que apresentaram medidas de diâmetro ≥ 10 mm foram considerados positivos para a ação antimicrobiana do extrato testado.

Foram impregnados discos com os antibióticos Cloranfenicol (Sygma-Aldrich, 30 µg/disco), Eritromicina (Siensifar, 15 µg/disco), como o fungicida Nistatina (Neoquímica, 10 µg/disco), e com o solvente acetato de etila como controles para o experimento.

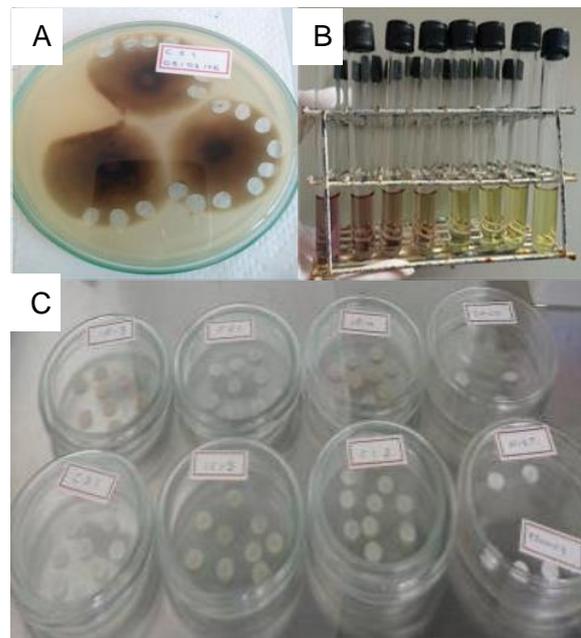


Figura 11: Etapas metodológicas da Difusão em Disco de Ágar: discos padronizados do isolado fúngico(A); extração dos metabólitos em Acetato de Etila (B); impregnação dos discos de papel de filtro com os extratos (C).

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2021).

3.5.2 Microdiluição em Caldo

Os extratos brutos dos isolados LO, obtidos a partir da extração em acetato de etila, foram testados individualmente para a determinação da CIM, sendo executada a microdiluição em caldo, seguindo as normas dos manuais *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017; 2012^a; 2008). Com a finalidade de obter soluções-mãe com concentração de 4 mg/mL, 4 mg de cada um dos extratos brutos a serem testados foram pesados em Eppendorfs previamente autoclavados e diluídos em 200 µL de Dimetilsufóxido 20% (DMSO) e, após solubilização, adicionados 800 µL de meio Muller-Hinton (MH).

Os efeitos antimicrobianos dos referidos extratos foram testados frente aos micro-organismos teste:

- Bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (resistente a meticilina e oxacilina) e *Candida albicans* ATCC 10231 (resistente a fluconazol e itraconazol), provenientes do Laboratório de Microbiologia Clínica da Universidade Federal da Bahia (UFBA), em Salvador-BA;
- Bactérias *Staphylococcus aureus* CCMB 263 (resistente a novobiocina) e *Escherichia coli* CCMB 261 (resistente a sulfonamida) e levedura *Candida albicans* CCMB 286 (resistente a fluconazol e anfotericina B), provenientes da Coleção de Cultura de Micro-organismos da Bahia (CCMB – UEFS), em Feira da Santana-BA;
- Fungos filamentosos dermatófitos: *Trichophyton mentagrophytes* URM6272; *T. tonsurans* URM4288; *Microsporum canis* URM6969 e *Epidermophyton floccosum* URM6209 cedidos pela Coleção de Culturas URM (*University Recife Mycology*) do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, em Recife-PE.

Inicialmente foram realizados procedimentos de triagem com as soluções-mãe dos extratos brutos dos isolados endofíticos, em microplacas estéreis de 96 poços, sem a realização da diluição seriada e com apenas um micropoço por extrato, em triplicata. Essa etapa foi realizada para selecionar os extratos com atividade antimicrobiana frente às bactérias e fungos patogênicos acima elencados, sendo determinante para reduzir a quantidade de extratos a serem testados posteriormente em procedimento de diluição seriada, em triplicata e com três repetições.

3.5.2.1 Testes com bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

As cepas bacterianas de *S. aureus* CCMB 263, *S. aureus* ATCC 43300 e *E. coli* CCMB 261 foram cultivadas em meio de cultura Muller-Hinton Ágar (MHA), a 35 a 37 °C, 18-24 h. Para o preparo dos inóculos, 3 a 5 colônias foram coletadas das placas de cultivo e transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina a 0,85%, sendo homogeneizados em Vórtex (Biomixer® QL-901), por 5 segundos. A densidade ótica da suspensão bacteriana foi ajustada à leitura de 0,10 nm, medida em Colorímetro (Biochrom® Libra S2), em faixa de 580 nm (Peralta, 2010), correspondente à concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ (equivalente ao tubo 0,5 da escala McFarland). De cada solução ajustada, foi tomado 1 mL e diluído em 149 mL de meio MH, resultando em concentrações de $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ das referidas bactérias (CLSI, 2012a; CLSI, 2008).

Os extratos selecionados na etapa de triagem foram testados em triplicata e com três placas de repetição (Figuras 12A). Em placas estéreis de microtitulação com 96 poços, foram adicionados, a cada poço, 50 µL de caldo MH e, na primeira fileira da microplaca, 50 µL da solução-mãe do extrato bruto a ser testado. A seguir, utilizando-se micropipeta multicanal, foi realizado o procedimento de diluição seriada, com igual volume de 50 µL sendo sucessivamente retirado e transferido para o poço seguinte, após homogeneização com movimentos de fluxo e refluxo, dispensando-se os 50 µL finais após a última fileira (Figura 13). Logo após, adicionados 50 µL de solução de inóculo em cada poço.

Aos poços da microplaca reservada para os controles de viabilidade e esterilidade, foram também adicionados 50 µL de cada substância: o antibiótico cloranfenicol (concentração de 1,2 mg/mL); DMSO (200 µL de DMSO e 800 µL de meio MH, obtendo-se 5% de concentração em cada poço); caldo MH; solução salina 0,85% e H₂O destilada e esterilizada; as soluções dos extratos e os inóculos dos microorganismos individualizados na última fileira das placas (Figura 12B). Todas as placas permaneceram sob incubação, em estufa de crescimento, por 18 a 24h, 35 a 37 °C.

Da solução inóculo, foram tomados 100 µL e espalhados em placas de Petri (90 x 15 mm) com o auxílio de alça de Drigalsky (técnica *spread-plate*), a fim de realizar o controle de crescimento do inóculo, em triplicata, sendo estas incubadas sob as mesmas condições de tempo e temperatura utilizados para as microplacas.

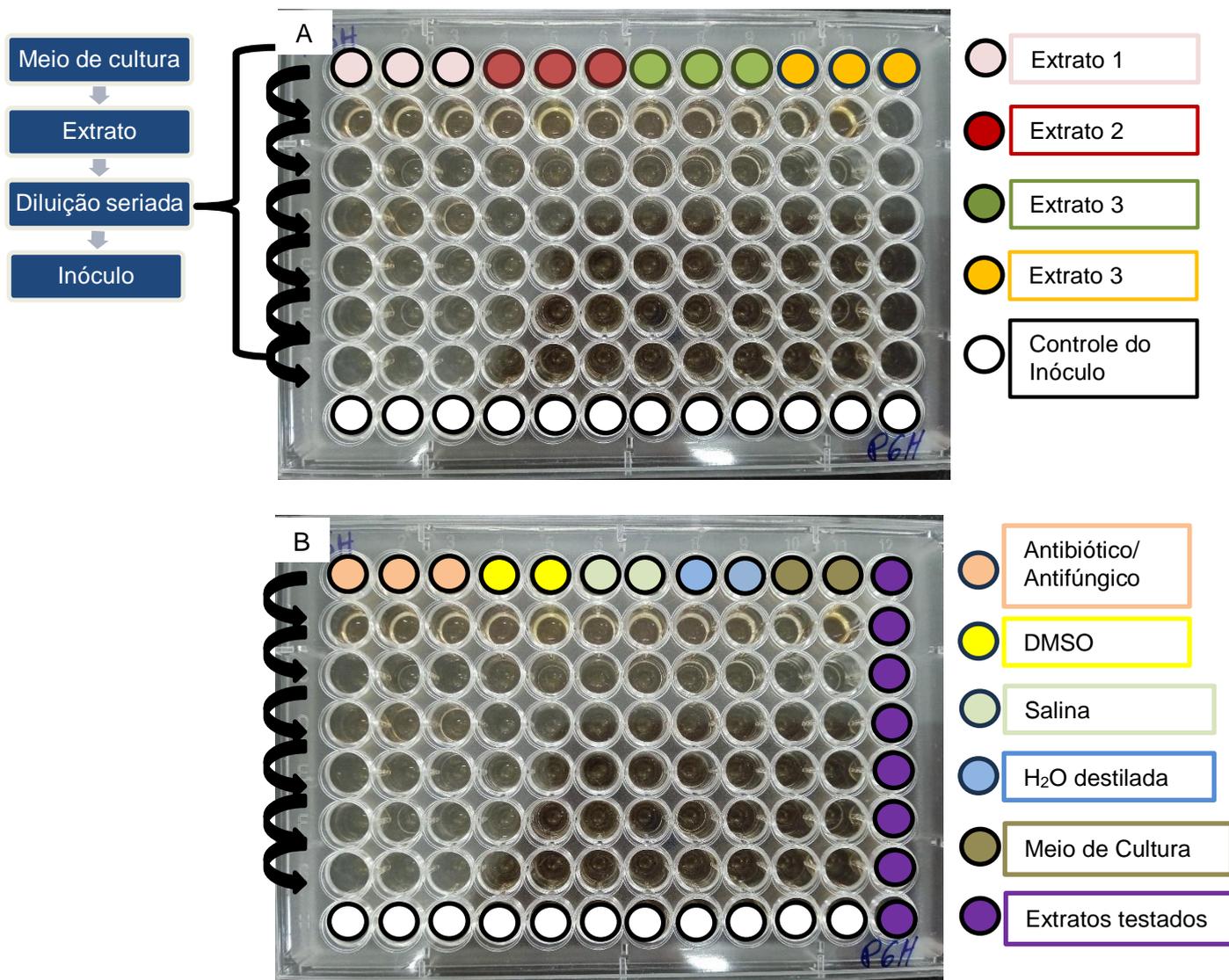


Figura 12: Esquema da metodologia da microdiluição em placa: A – placas de teste; B – placa de controles.

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).



Figura 13: Diluição seriada em placa de microtitulação.

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2021).

Após esse período, foram adicionados 30 μL /poço do revelador resazurina (Vetec®), a 0,01%, e as placas retornaram à incubação, por 3 horas, para posterior observação visual da presença ou ausência de crescimento bacteriano (Figura 14). A função do revelador é promover a percepção da presença de UFCs pela mudança de coloração, sendo mantida a cor azul na ausência destas e modificada para rosa na presença (Castilho *et al.*, 2015). A CIM foi considerada a menor concentração em que foi verificada a manutenção da coloração originalmente azul do revelador.

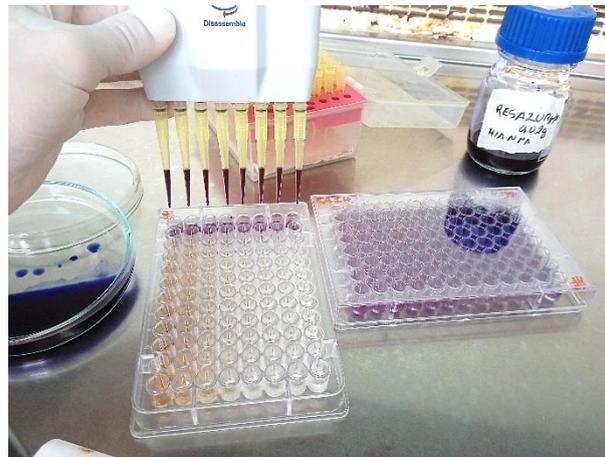


Figura 14: Microdiluição em caldo, testagem da atividade antimicrobiana dos extratos brutos dos isolados endofíticos frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, revelação com resazurina.

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2021).

Após o período de 3 horas de incubação, foram retirados 5 μL dos poços que mantiveram a coloração azul, plaqueados em MHA e incubados em estufa de crescimento (18 - 24 h, 35 a 37 $^{\circ}\text{C}$) para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM). A menor concentração na qual não foi observado crescimento de UFCs foi considerada a CBM, considerando as triplicatas e repetições.

3.5.2.2 Testes com a levedura *Candida albicans*

As leveduras *C. albicans* CCMB 286 e *C. albicans* ATCC 10231 foram cultivadas em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), em estufa de crescimento, sob temperatura

35 a 37 °C, 36-48 h. Para o preparo do inóculo, 3 a 5 colônias foram coletadas das placas de cultivo e transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina a 0,85%, sendo homogeneizados em Vórtex (Biomixer® QL-901), por 10 a 15 segundos. A densidade ótica da suspensão foi ajustada para a concentração aproximada $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ (equivalente 0,5 da escala McFarland), a partir da absorbância ajustada em 0,9 – 0,11 nm, medida em Colorímetro (Biochrom® Libra S2), em faixa de 580 nm. Dessa solução ajustadas, foi tomado 1mL e diluído em 49 mL de MH, resultando na concentração de $1,5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹ da levedura (CLSI, 2002).

Nas placas estéreis de microtitulação com 96 poços, foram adicionados em cada poço 100 µL de meio MH; na primeira fileira, foram dispostos 100 µL da solução-mãe do extrato bruto a ser testado; seguido da etapa de diluição seriada. Logo após, adicionados 100 µL de solução inóculo em cada poço. Os extratos selecionados na triagem foram testados em triplicata e com três placas de repetição.

Em microplaca distinta, foram adicionados os 100 µL dos controles: antifúngico nistatina (concentração de 0,4 mg/mL); solução DMSO; caldo MH; solução salina 0,85%; H₂O destilada estéril; os extratos individualizados e o inóculo na última fileira. Todas as placas foram incubadas em estufa a 35 a 37 °C, por 36 - 48h.

Após o período de incubação, verificou-se o crescimento positivo ou negativo de UFCs, observando-se as placas contra um foco de luz. Nestes testes não foram usados reveladores, optando-se pela análise visual, indicada pelo CLSI (2008). Dessa forma, a CIM foi definida como a menor concentração, nas triplicatas e suas repetições, em que não se observou presença de hifas indicando crescimento microbiano. A CIM final foi obtida pelo cálculo da média aritmética e desvio padrão de todas as triplicatas. A CIM foi considerada a menor concentração em que foi verificada a ausência de UFCs. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada através do plaqueamento, em meio ágar MH, de 5 µL dos tomados dos poços nos quais não foi detectada a presença de leveduras. As placas foram incubadas por 36 - 48h, 35 - 37 °C, sendo observado, após esse período, a presença ou ausência de UFCs. A CFM foi considerada a menor concentração em que foi verificada a ausência de UFCs após o período de incubação em placas de Petri, considerando as triplicatas e placas de repetições.

Da solução inóculo, foram tomados 100 µL e espalhados em placas de Petri (90

x 15 mm) com o auxílio de alça de Drigalsky (técnica *spread-plate*), a fim de realizar o controle de crescimento do inóculo, em triplicata, sendo estas incubadas sob as mesmas condições de tempo e temperatura das microplacas.

3.5.2.3 Testes com fungos filamentosos dermatófitos

Os fungos filamentosos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* 6272 (*T.m.* 6272); *T. tonsurans* 4288 (*T.t.* 4288); *Microsporum canis* 6969 (*M.c.* 6969) e *Epidermophyton floccosum* 6209 (*E.f.* 6209) foram cultivados em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) a 28 °C, por 07 dias.

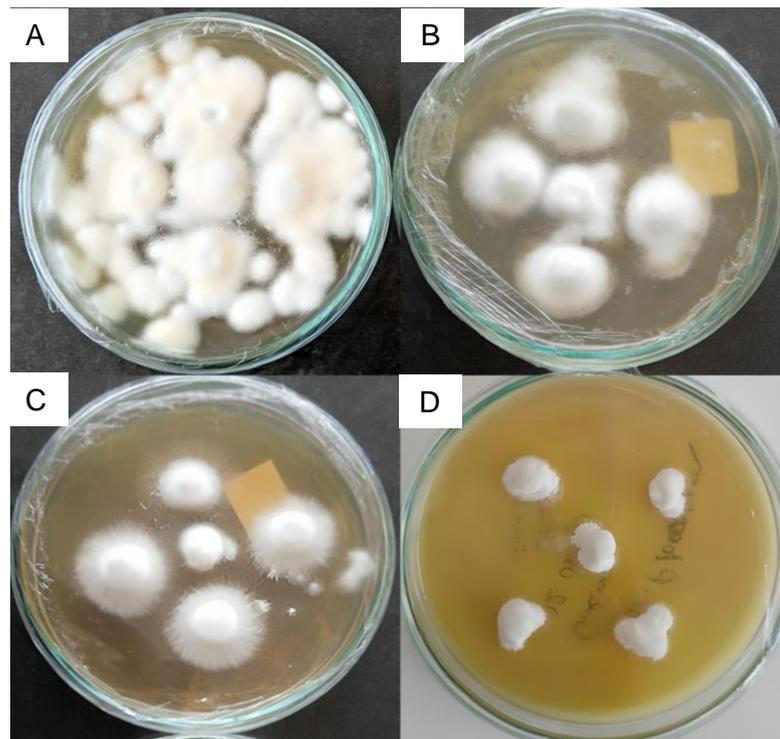


Figura 15: Fungos filamentosos dermatófitos cultivados em meio Sabouraud Dextrose Agar (SBA): A – *Trichophyton mentagrophytes* URM6272 (*Tm* 6272); B – *T. tonsurans* URM4288 (*Tt* 4288); C – *Microsporum canis* URM6969 (*Mc* 6969); D – *Epidermophyton floccosum* URM6209 (*Ef* 6209).

Fonte: Arquivos pessoais do autor, 2023.

Para o preparo dos inóculos dos dermatófitos, foram feitas raspagens sobre o micélio com o auxílio da alça de platina, sendo estes dispensados em tubos de ensaio estéreis contendo 5 mL de solução salina a 0,85%. Após agitação em Vórtex (Biomixer® QL-901) até a dissolução visual dos filamentos miceliais, as soluções permaneceram em repouso por 20 minutos, logo após, os sobrenadantes foram pipetados e transferidos para outros tubos de ensaio estéreis próprios para a leitura da densidade ótica em Colorímetro (Biochrom® Libra S2). Casa suspensão foi ajustada para uma leitura específica, a 580 nm, conforme o dermatófito testado, sendo: para o *Tm* 6272 – 0,10; enquanto para os demais, *Tt* 4288, *Mc* 6969 e *Ef* 6209 as suspensões foram ajustadas para uma leitura de 0,12.

Com o objetivo de preparo da solução inóculo (1:50), foi tomado 1 mL da suspensão ajustada e diluído em 49 mL de meio Sabouraud Dextrose (SD), de modo a obter uma concentração final entre $0,4 \times 10^4$ a $5,0 \times 10^4$ UFC/mL, sendo estas consideradas as soluções inóculo (CLSI, 2008).

Nas placas estéreis de microtitulação com 96 poços, foram adicionados, em cada poço, 100 µL de meio SD; na primeira fileira da microplaca foram dispostos 100 µL da solução-mãe do extrato bruto a ser testado; seguido da etapa de diluição seriada. Logo após, das soluções inóculo de cada dermatófito, foram pipetados, com auxílio de micropipeta multicanal, 100 µL para preencher cada poço das microplacas preparadas para a testagem.

Os testes de microdiluição em caldo foram realizados separadamente para cada dermatófito frente aos extratos brutos triados, poços em triplicata para cada extrato e com três placas de repetição

Em placa controle, foram também testados, nas mesmas condições descritas, atividade antifúngica do cetoconazol (concentração de 512 µg/mL); atividade inibitória da solução de DMSO; esterilidade do caldo SD, da solução salina 0,85% e da H₂O destilada estéril; esterilidade dos extratos individualizados e viabilidade dos inóculos. Todas as placas foram incubadas em estufa a 28 °C, por 72h. No caso dos dermatófitos *Mc* 6969 e *Ef* 6209, por 120 h.

Após o período de incubação, foi realizada leitura por método de análise visual, considerando-se a presença ou ausência de formação micelial no fundo da cavidade de cada poço, sendo a CIM definida como a menor concentração, nas triplicatas e suas repetições, em que não foi observada o crescimento fúngico.

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada como a menor

concentração testada capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento de fungos dermatófitos nos ensaios microbiológicos, considerando as triplicatas e suas repetições. Para isso, 10 µL de cada poço nos quais não foi visualizada a presença de hifas foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura SDA. As placas foram incubadas por 72h, a 28°C, após esse período, foi analisada a presença ou ausência de crescimento micelial. A CFM foi considerada a menor concentração em que foi verificada a ausência de micélio fúngico pós incubação (CLSI, 2008).

3.6 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS ENDOFÍTICOS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

3.6.1 Identificação morfológica dos isolados

Os isolados endofíticos obtidos, selecionados após triagem das atividades antimicrobianas descrita na seção 3.5, foram preparados para a identificação morfológica em meio Ágar-Água (Ágar Tipo I Himedia®, 15 g/L). Os cultivos foram encaminhados ao Laboratório de Micologia (LAMIC), da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), onde foram identificados em nível de gênero por Dr.^a Josiane Santana Monteiro, Dr.^a Taimy Cantillo e Prof. Dr. Luís Fernando Pascholati Gusmão.

A identificação morfológica dos fungos isolados foi realizada de acordo com chave taxonômica padronizada, a partir de literatura especializada sobre o grupo, incluindo diâmetro das colônias, textura, coloração, dimensões e morfologias das hifas e conídios. Pequenos fragmentos foram dissociados dos micélios, com o auxílio de lupa, e dispostos em lâminas de vidro, corados com Azul de Bromofenol e observados por microscopia ótica. As fotomicrografias foram feitas a partir de microscópio ótico Olympus BX51, com prismas de contraste de interferência diferencial (DIC), câmera DP25 acoplada.

3.6.2 Identificação molecular dos isolados

A identificação molecular dos fungos isolados de *L. origanoides* foi realizada no Laboratório de Sistemática Molecular de Plantas – LAMOL, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Os endofíticos foram cultivadas no meio em que foram isolados (BDA ou EMA), por 7 dias, em temperatura ambiente, até a obtenção da massa micelial. Após maceração dos micélios em nitrogênio líquido, o DNA genômico total foi extraído a partir da utilização do kit DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden), seguindo as especificações do fabricante.

A amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com um volume final de 15 µL, utilizando 1,3 µL de H₂O ultra pura de biologia molecular, 0,2 µL de cada primer (15 pmol), 3 µL de TBT-PAR (trealose, albumina bovina sérica e polissorbato-20), 0,3 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 0,6 U/ µL de Taq polimerase (TopTaq Master Mix Kit - Qiagen, Hilden) e 1 µL de DNA total (10 ng/ µL). Os pares de primers ITS5 / ITS4 (Seliger, 1990) e LR0R / LR5 (Rehner; Samuels, 1995, Vilgalys; Hester, 1990) foram usados para amplificar o espaçador transcrito interno ribossômico nuclear (nrITS) e sequências do gene da subunidade maior ribossômica nuclear (nrLSU), respectivamente (Sogin *et al.*, 2006). As sequências obtidas para as regiões nrITS e nrLSU para três dos isolados estão descritas no Quadro 3.

Código do Isolado endofítico	Regiões amplificadas	
	Espaçador transcrito interno ribossômico nuclear (nrITS)	Gene da subunidade maior ribossômica nuclear (nrLSU)
> <i>Alternaria_sp1__C1_3</i>	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTA ACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG GGA-----TCATTACAC---AAATA--- TGAAGGCGGG----- ----- CTGGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGCTG AATTATT--CACCTTGTC-TTTTGCG-- TACTTCTTGTTT-CCTTGGTGGGTT----- -----CGCCACCACT- AGGACAACATAAA----- CCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAG----- TAAC-AAATTAAT-- AATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGT TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG CGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGT GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG CCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCT---- TTGCTTGGTGTGGGCGTC---TTGTCTC-- TAGCTTTGC--- TGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCC GGC--CTACTGG-TTTCGGAGCGCAGCA-CA-- AGTCGCACCTCTATCAGC---AAAGGTCTA- GCATCC	GTAACGGCG- AGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAA TCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAAT TTGCAGAGGGCGCTTTGGCTTTGGCAGC GGTCCAAGTTCCTTGAACAGGACGTC CAGAGGGTGAGAATCCCGTACG-- TGGTCGCTGGCTATTGCCGTGTAAGCC CCTTCGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATG CAGCTCTAAATGGGAGGTACATTTCTTCT AAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAG CGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAA AGCACTTTGGAAAGAGAGTCAAACAGCAC GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCA GCCAGACTTGCTTACAGTTGCTCATCCGG G--TTTCTAC- CCGGTGCACTCTTCTGTAGGCAGGCCAG CATCAGTTTGGGCGGTAGGATAAAGGTCT CTGTCACGTACCTCCTTTCCGGGAGGCC TTATAG- GGGAGACGACATACTACCAGCCT---- GGACTGAGGTCCGCGCA--- TCTGCTAGGATGCTGGCGTAATGGCTGTA AGCGGCCCGTCTTGAACAC

Código do Isolado endofítico	Regiões amplificadas	
	Espaçador transcrito interno ribossômico nuclear (nrITS)	Gene da subunidade maior ribossômica nuclear (nrLSU)
>Alternaria_sp__2_C3_1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTA ACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG GGA-----TCATTACAC----AAATA--- TGAAGGCGGG----- ----- CTGGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGCTG AATTATT--CACCCCTGTC-TTTTGCG-- TACTTCTGTGTT-CCTTGGTGGGTT----- -----CGCCACCACCT- AGGACAACATAAA----- CCTTTTGAATTGCAATCAGCGTCAG----- TAAC-AAATTAAT-- AATTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT TCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG CGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGT GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCG CCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTT CGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCT---- TTGCTTGGTGTGGGCGTC--TTGTCTC-- TAGCTTTGC--- TGGAGACTCGCCTTAAAGTAA----- -----	GTAACGGCG- AGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAA TCTGGCTCTTTTAGAGTCCGAGTTGTAAT TTGCAGAGGGCGCTTTGGCTTTGGCAGC GGTCCAAGTTCTTGGAACAGGACGTCA CAGAGGGTGAGAATCCCCTACG-- TGGTCGCTGGCTATTGCCGTGTAAGCC CCTTCGACGAGTTCGAGTTGTTGGGAATG CAGCTCTAAATGGGAGGTACATTTCTTCT AAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAG CGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAA AGCACTTTGGAAAGAGAGTCAAACAGCAC GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCA GCCAGACTTGCCTACAGTTGCTCATCCGG G--TTTCTAC- CCGGTGCACCTTCTGTAGGCAGGCCAG CATCAGTTTGGGCGGTAGGATAAAGGTCT CTGTACGTACCTCCTTTGGGGAGGCC TTATAG- GGGAGACGACATACTACCAGCCT---- GGACTGAGGTCCGCGCA--- TCTGCTAGGATGCTGGCGTAATGGCTGTA AGCGGCCCGTCTTGAAACAC
>Drechslera_sp__C4_1	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTA ACAAGGTCTCCGTAGGTGAACCTGCGGAG GGA-----TCATTACACAA-- CAAAAATATGAGGGTGTG----- ----- -- GTTTGCTGGCAACAGCGTCCGCCCAAGTA T--TTTT--CACCCATGTC-TTTTGCG-- CACTTTTTGTTT-CCTGGGCGAGTT----- -----CGCTCGCCACC- AGGACCCAACCATAAACCTTTTTTTATGCA GTTGCAATCAGCGTCAG----TATAAT- AATTCAAT- TTATTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGG TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT CCGATACGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAG TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGT TCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCT---- TTGCTTGGTGTGGGCGTCTTTTTGTCTC-- TCCCCTTGTGGGGGAGACTCGCCTTAAAA CGATTGGCAGCCGAC-- CTAGTGGTTTTTCGGAGCGCAGCA-CA- AATTTGCGCCT-----TCC	GTAACGGCG- AGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAA TCGGGAC-- TTTAGAGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGG GCCTCTGGCTTTGGCAGCGTCCAAGT TCCTTGGAACAGGACGTACAGAGGGTG AGAATCCCCTACG-- TGGTCGCTGGATATTGCCGTGTAAGGCC CTTCGACGAGTTCGAGTTGTTGGGAATGC AGCTCTAAATGGGAGGTACATTTCTTCTA AAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGC GCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAA GCACCTTTGGAAAGAGAGTCAAACAGCAC GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCTTGCA GCCAGACTTGCCTACAGTTGCTCATCCGG G--TTTCTAC- CCGGTGCACCTTCTGTAGGCAGGCCAG CATCAGTTTGGGCGGTAGGATAAAGGTCT CTGTACGTACCTCCTTTGGGGAGGCC TTATAG- GGGAGACGACATACTACCAGCCT---- GGACTGAGGTCCGCGCA--- TCTGCTAGGATGCTGGCGTAATGGCTGTA AGCGGCCCGTCTTGAAACAC

Quadro 3: Sequências obtidas para as regiões nrITS e nrLSU referentes aos fungos endofíticos LO C 1.3, C 3.1 e C 4.1 EMA, isolados de *Lippia origanoides*.

Fonte: Dados do autor (2022).

A reação de PCR foi realizada em um 9700 Geneamp Thermocycler (Applied Biosystems®), de acordo com os parâmetros: desnaturação inicial a 94 ° C por 1 min, 35 ciclos (desnaturação a 94 ° C por 1 min, anelamento a 55 ° C por 1 min e extensão a 72 ° C por 3 min.), passo de extensão final a 72 ° C, por 3 min. Os produtos de PCR foram purificados utilizando sistema Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega). Os produtos de PCR purificados foram utilizados em reações de sequenciamento de 10 µL com o BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®) e sequenciados com o sequenciador automático ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer

(Applied Biosystems®) no Laboratório de Sistemática Molecular Vegetal – LAMOL (UEFS), seguindo o protocolo do fabricante (© 2012 Life Technologies Corporation).

Para investigar a localização filogenética do fungo, as sequências recém-obtidas foram editadas usando Staden Package v.1.7.0 (Staden, 1996), gerando um *contig* de consenso de ambas as sequências direta e reversa. Subsequentemente, as buscas do BLAST foram realizadas com sequências publicadas no NCBI GenBank, que mostraram altas afinidades ao táxon assexuado em Pleosporales. Assim, as sequências de Pleosporales foram adicionadas, e uma espécie foi selecionada como grupo externo (*Sporidesmium pyriformatum*). As sequências ITS e LSU foram alinhadas separadamente com o *software* MUSCLE (Edgar, 2004) no Seaview v.4.5.4 (Gouy *et al.*, 2010). O alinhamento foi verificado visualmente em Mesquite v.3.2 (Maddison, 2017).

Antes da análise filogenética, as matrizes ITS e LSU rDNA foram concatenadas no Seaview, uma vez que não foi encontrado nenhum conflito aparente entre os dois conjuntos de dados. Regiões ambíguas e íntrons foram delimitadas e excluídas do alinhamento final usando Gblocks (Talavera; Castresana, 2007). MrModeltest (Nylander, 2004) foi usado para obter os melhores modelos de evolução de nucleotídeos, que foram, GTR + G, K80 + I, HKY + G e GTR + I + G para ITS1, 5.8S, ITS2 e LSU, respectivamente.

Análises de Máxima Verossimilhança (ML) foram computadas no CIPRES Science Gateway v.3.3 (Miller *et al.* 2011), usando RaxML-HPC2 em XSEDE v.8.2.10 (Izquierdo-Carrasco, 2014). A análise ML foi realizada utilizando o modelo GTRGAMMA, com 1000 réplicas bootstrap.

As análises de Inferência Bayesiana (BI) foram realizadas usando MrBayes v.3.2.6 (Huelsenbeck; Ronquist, 2001) sob o modelo GTR + G no Portal CIPRES v.2.0 (Miller *et al.* 2010). Quatro cadeias independentes de MCMC foram executadas por 4 milhões de gerações para assegurar que o mesmo espaço de árvore fosse amostrado durante cada análise e que as árvores não estavam presas em locais ótimos. As árvores foram amostradas a cada milésima geração, resultando em 4.000 árvores no total. As probabilidades Bayesianas posteriores (BPP) foram determinadas a partir de uma árvore de consenso gerada após uma queima padrão de 25%. A árvore filogenética foi visualizada no Adobe Illustrator.

3.7 TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A triagem da atividade antioxidante foi realizada a partir da aplicação de solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). A solução foi aplicada em placas de sílica gel eluídas com os extratos a serem testados, por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Para o preparo da solução de concentração 40 µg/mL, 4 mg de DPPH foram dissolvidas em metanol, em balão volumétrico de 100 mL. A absorvância desta solução foi verificada a 517 nm, sendo considerada a leitura entre 0,9 e 1,1 (Oliveira, 2015).

Placas de sílica gel foram previamente ativadas (estufa de secagem, 100 °C, por 2 h) e as posições de aplicação dos extratos devidamente demarcadas. Os extratos brutos dos isolados foram inseridos à placa através de microtubo capilar. Como controles positivo e negativo, foram usados ácido ascórbico e metanol, respectivamente. O experimento foi realizado em triplicata.

Foi preparada uma solução com os solventes hexano e acetona (6:4). Em uma cuba cromatográfica contendo papel filtro para promover saturação e favorecer a eluição, foi vertida a solução hexano:acetona e posicionada, com o auxílio de uma pinça, a placa de sílica gel preparada, contendo os extratos. Após os extratos alcançarem o topo da eluição, a placa foi cuidadosamente retirada da cuba.

A placa de sílica eluída foi pulverizada por poucos segundos com a solução de DPPH preparada anteriormente. A possível presença da atividade antioxidante dos extratos brutos foi observada pela mudança de coloração de roxo para amarelo (Oliveira, 2015).

3.8 PERFIL FITOQUÍMICO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DOS ISOLADOS

Foi realizado rastreamento químico, por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a partir dos extratos brutos obtidos dos isolados endofíticos de LO. Os extratos fúngicos foram submetidos a triagem da composição química, com o intuito de revelar classes de metabólitos presentes nos extratos fúngicos testados. A técnica consiste em uma etapa de adsorção líquido-sólido em que a separação se dá pela diferença de

afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária., utilizada para a identificação de frações coletadas em cromatografia líquida clássica. Um parâmetro é o fator de retenção (R_f), a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel, os valores ideais para R_f estão entre 0,4 e 0,6 (Collins *et al.*, 2006).

Para a realização da CCD, as placas cromatográficas de alumínio cobertas por uma camada de sílica gel (MERCK 0,2 mm, 20 x 20 cm) foram cortadas em partes de 10 cm de altura por 10 a 15 cm de comprimento (variável de acordo com a quantidade de amostras), marcadas na borda inferior a 1 cm de altura para o local de aplicação das amostras e a 0,5 cm da borda superior. As placas foram, então, ativas em estufa de secagem (1 h, 100 °C).

Os extratos dos isolados endofíticos de LO foram eluidos em CCD, em solução de hexano e acetona (6:4). Sendo utilizadas as seguintes soluções: solução ácida de anisaldeído-sulfúrico (AS), solução de difenilboriloxietilamina e polietilenoglicol (NP-PEG), solução de Drangedorff (DRG) e solução de hidróxido de potássio (KOH) 5 %. Após o preparo das soluções as mesmas foram utilizadas na pulverização das placas de CCD, contendo os extratos com compostos bioativos.

As amostras foram aplicadas na linha marcada próximo à base inferior da placa de sílica (1 cm), utilizando microtubo capilar. Após a aplicação da(s) amostra(s), as placas foram introduzidas em cubas de vidro contendo a fase móvel supracitada, amparadas por uma folha de papel de filtro (Whatman) impregnada pelo mesmo sistema (Figura 16). A placa foi deixada na cuba até o solvente subir por capilaridade, alcançando a marca feita próximo à borda superior (0,5 da borda). Em sua corrida de ascensão, o solvente arrastou os compostos menos adsorvidos na fase estacionária, separando-os dos mais adsorvidos.

Após esse processo, as placas foram observadas em luz visível e em câmara acoplada com lâmpada ultravioleta e germicida. Após essa observação, as placas foram reveladas com o auxílio de reagentes que evidenciam colorimetricamente determinadas classes de compostos.

Seguem abaixo as metodologias de preparo dos reveladores:

- Solução de difenilboriloxietilamina e polietilenoglicol (NP-PEG): Preparada na proporção de 10 mL de uma solução de éster de metanol difenilborico- β -etilamino em concentração de 1%, seguida por 8 mL de polietilenoglicol-4000 etanólico a 5%.

- Solução de Anisaldeído-Sulfúrico (AS): 0,5 mL de anisaldeído foram adicionados em 10 mL de ácido acético glacial, acrescentados de 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico.
- Solução de Drangendorff (DRG): Preparada pela mistura das soluções A e B em proporção de 1:1. Solução A: 0,85 g de nitrato básico de bismuto, em 10 mL de ácido acético, e 40 mL de água sob aquecimento. Solução B: É dissolvida 8 g de iodeto de potássio em 30 mL de água. 1 mL de solução estoque é misturado com 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água.
- Solução de Hidróxido de Potássio 5 % (KOH): Preparada com 5 g de hidróxido de potássio, em solução etanólica.

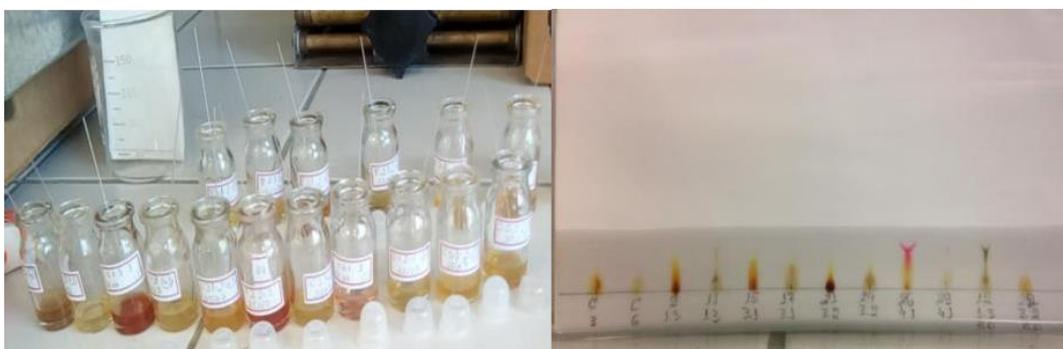


Figura 16: Metodologia utilizada na CCD: extratos aplicados e detalhes da placa de sílica na cuba cromatográfica.

Fonte: Arquivos pessoais do autor, 2022.

3.9 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Quatro isolados de LO em meio EMA – C 1.3, C3.1, C3.2 e C 4.1 – foram submetidos a cultivo em meio líquido, sob agitação orbital (27 °C) por 15 dias, tendo seus extratos submetidos a partição líquido-líquido em solvente acetato de etila. Cada isolado esteve replicado em 05 repetições, 05 frascos reagentes tipo *Schotts* consistiam do controle, contendo apenas o meio de cultura.

O conjunto de dados que compõe a matriz quimiométrica é formado basicamente por cinco grupos amostrais diferentes, onde temos quatro grupos que correspondem a amostras contendo fungos isolados de diferentes organismos biológicos (A, B, C e D) e um grupo denominado controle (CT) que é composto apenas pelo meio de cultura necessário para o cultivo de micro-organismos. Assim, este

conjunto de dados gerou uma matriz de cinco grupos distintos.

As amostras foram analisadas cromatograficamente em cinco réplicas biológicas, nos modos de ionização negativa (ESI-) e positiva (ESI+). Os sinais cromatográficos (variável, par tR-m/z) foram registrados nas amostras avaliadas, assim, foi construída uma matriz de dados relacionando sinais cromatográficos (variável) e amostras.

Os dados das análises cromatográficas de todas as amostras foram extraídos através da altura dos picos cromatográficos referentes ao par tR-m/z. O conjunto de dados foi organizado em uma planilha, onde os sinais cromatográficos foram dispostos em linhas e as amostras em colunas, formando assim a matriz de dados para realizar a análise quimiométrica. Para realizar a análise multivariada, a matriz quimiométrica foi submetida à plataforma online MetaboAnalyst 5.0 (www.metaboanalyst.ca) (Pang *et al.*, 2021; Xia; Wishart, 2011). As amostras foram normalizadas por soma e o conjunto de dados foi dimensionado por autoescalamento (centrado na média e dividido pelo desvio padrão de cada variável). Posteriormente, foi realizada análise multivariada não supervisionada: PCA (análise de componentes principais) e HCA (análise de cluster hierárquica).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. MICROBIOTA ENDOFÍTICA FÚNGICA ISOLADA.

A partir do plaqueamento do material vegetal desinfestado superficialmente, fungos endofíticos cresceram nos meios BDA e EMA. A figura 17 mostra alguns fungos em processo inicial de crescimento a partir de folhas e fragmentos de caules dispostos nos meios de cultura.

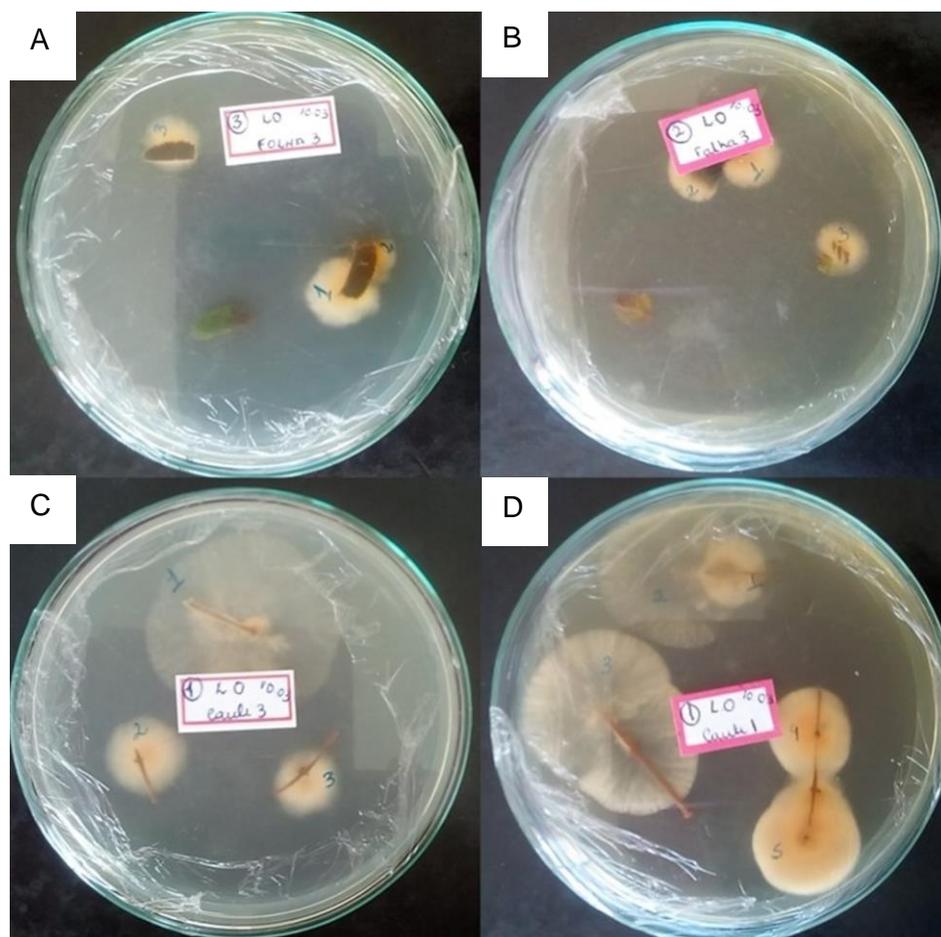


Figura 17: Fungos endofíticos em processo de crescimento a partir dos fragmentos de folhas e caules de de *Lippia origanoides* cinco dias após o plaqueamento. A e C – fragmentos de folhas e caules dispostos em meio BDA; B e D - fragmentos de folhas e caules dispostos em meio EMA.

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2017).

Os resultados de isolamento da microbiota fúngica endofítica obtidos nas coletas de material vegetal de *L. origanoides* seguem-se de acordo com as informações do Quadro 4:

Coleta	1ª coleta: 07/08/2015 (inverno)	2ª coleta: 10/03/2017 (verão)
Espécie LO	Folhas: 04 fungos (meio EMA). Caules: 11 fungos (meio EMA).	Folhas: 1º organismo (LO 1): 12 fungos (06 – meio BDA; 06 – meio EMA). 2º organismo (LO 2): 17 fungos (09 – meio BDA; 08 – meio EMA). 3º organismo (LO 3): 13 fungos (07 – meio BDA e 06 – meio EMA). Total: 42 fungos Caules: 1º organismo (LO 1): 21 fungos (10 – meio BDA e 11 – meio EMA). 2º organismo (LO 2): 31 fungos (16 – meio BDA e 15 – meio EMA). 3º organismo (LO 3): 20 fungos (11 – meio BDA e 09 – do meio EMA). Total: 72 fungos
Parcial:	15	114
Total:	129 fungos endofíticos isolados	

Quadro 4: Resultados dos isolamentos de fungos endofíticos a partir da coleta de material vegetal realizada.

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

4.1.1 Endofíticos isolados de *Lippia origanoides* (Kunth)

A partir dos plaqueamentos realizados, houve crescimento de isolados fúngicos da maioria das folhas e fragmentos de caules plaqueados, em período de 05 a 08 dias após a inoculação. Dessa forma, foram obtidos: 15 fungos endofíticos na primeira coleta, sendo 04 a partir das folhas e 11 dos caules; e 72 na segunda coleta, sendo 42 das folhas e 72 dos caules. Por problemas relacionados a contaminações das placas com meio BDA na primeira coleta, apenas os fungos isolados do plaqueamento realizado em meio EMA foram isolados e preservados, enquanto que, no isolamento realizado na segunda coleta, foram isolados e preservados os fungos dos dois tipos

de meios utilizados, BDA e EMA. Após o isolamento, 129 fungos endofíticos foram preservados pelo método Castellani em uma micoteca.

Os códigos identificadores dos isolados foram descritos no Quadro 5.

1ª coleta: 07/08/2015 (inverno)	2ª coleta: 10/03/2017 (verão)		
	Organismo 1	Organismo 2	Organismo 3
-----	Isolados de Folhas (Meio BDA): 1 LO – F 1.1 – BDA 1 LO – F 2.1 – BDA 1 LO – F 2.2 – BDA 1 LO – F 3.1 – BDA 1 LO – F 3.2 – BDA 1 LO – F 3.3 – BDA	Isolados de Folhas (Meio BDA): 2 LO – F1.1 – BDA 2 LO – F1.2 – BDA 2 LO – F1.3 – BDA 2 LO – F2.1 – BDA 2 LO – F2.2 – BDA 2 LO – F2.3 – BDA 2 LO – F3.1 – BDA 2 LO – F3.2 – BDA 2 LO – F3.3 – BDA	Isolados de Folhas (Meio BDA): 3 LO – F1.1 – BDA 3 LO – F1.2 – BDA 3 LO – F2.1 – BDA 3 LO – F2.2 – BDA 3 LO – F3.1 – BDA 3 LO – F3.2 – BDA 3 LO – F3.3 – BDA
Isolados de Folhas (Meio – EMA): LO – F 1.1 – EMA LO – F 2.1 – EMA LO – F 3.1 – EMA LO – F 5.1 – EMA	Isolados de Folhas (Meio – EMA): 1 LO – F1.1 – EMA 1 LO – F1.2 – EMA 1 LO – F2.1 – EMA 1 LO – F2.2 – EMA 1 LO – F3.1 – EMA 1 LO – F3.2 – EMA	Isolados de Folhas (Meio – EMA): 2 LO – F1.1 – EMA 2 LO – F1.2 – EMA 2 LO – F1.3 – EMA 2 LO – F1.4 – EMA 2 LO – F3.1 – EMA 2 LO – F3.2 – EMA 2 LO – F3.3 – EMA 2 LO – F3.4 – EMA	Isolados de Folhas (Meio – EMA): 3 LO – F1.1 – EMA 3 LO – F1.2 – EMA 3 LO – F2.1 – EMA 3 LO – F2.2 – EMA 3 LO – F3.1 – EMA 3 LO – F3.2 – EMA
-----	Isolados de Caules (Meio BDA): 1 LO – C1.1 – BDA 1 LO – C1.2 – BDA 1 LO – C1.3 – BDA 1 LO – C2.1 – BDA 1 LO – C2.2 – BDA 1 LO – C2.3 – BDA 1 LO – C2.4 – BDA 1 LO – C3.1 – BDA 1 LO – C3.2 – BDA 1 LO – C3.3 – BDA	Isolados de Caules (Meio BDA): 2 LO – C1.1 – BDA 2 LO – C1.2 – BDA 2 LO – C1.3 – BDA 2 LO – C1.4 – BDA 2 LO – C2.1 – BDA 2 LO – C2.2 – BDA 2 LO – C2.3 – BDA 2 LO – C2.4 – BDA 2 LO – C2.5 – BDA 2 LO – C2.6 – BDA 2 LO – C2.7 – BDA 2 LO – C3.1 – BDA 2 LO – C3.2 – BDA 2 LO – C3.3 – BDA 2 LO – C3.4 – BDA 2 LO – C3.5 – BDA	Isolados de Caules (Meio BDA): 3 LO – C1.1 – BDA 3 LO – C1.2 – BDA 3 LO – C1.3 – BDA 3 LO – C2.1 – BDA 3 LO – C2.2 – BDA 3 LO – C2.3 – BDA 3 LO – C2.4 – BDA 3 LO – C3.1 – BDA 3 LO – C3.2 – BDA 3 LO – C3.3 – BDA 3 LO – C3.4 – BDA

Quadro 5: Códigos identificadores dos fungos endofíticos isolados da espécie *Lippia origanoides* nas coletas realizadas.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Alguns representantes dos isolados na 1ª e 2ª coletas são mostrados nas Figuras 18 e 19.

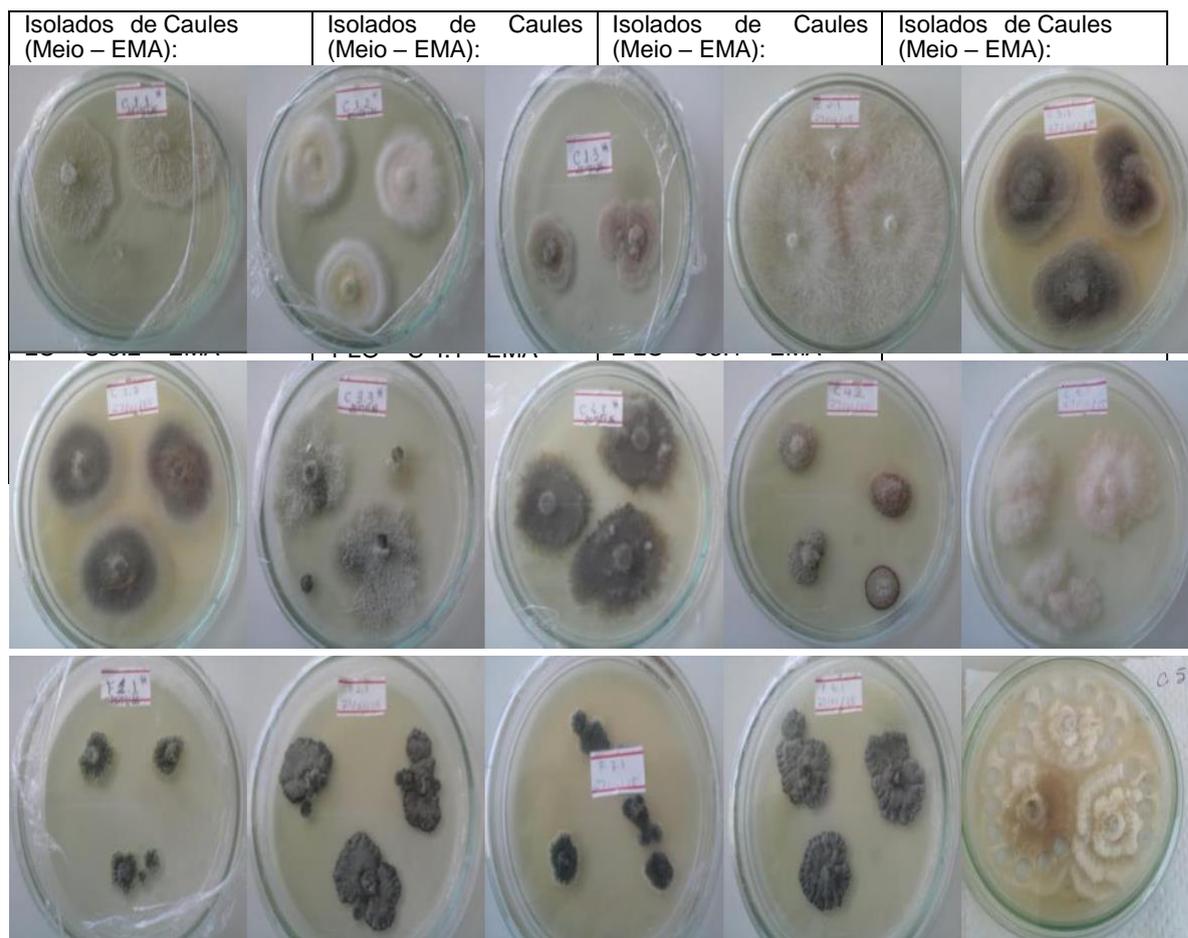


Figura 18: Fungos endofíticos de *Lippia origanoides* isolados em meio Ágar Extrato de Malte (EMA) na primeira coleta.

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2015).

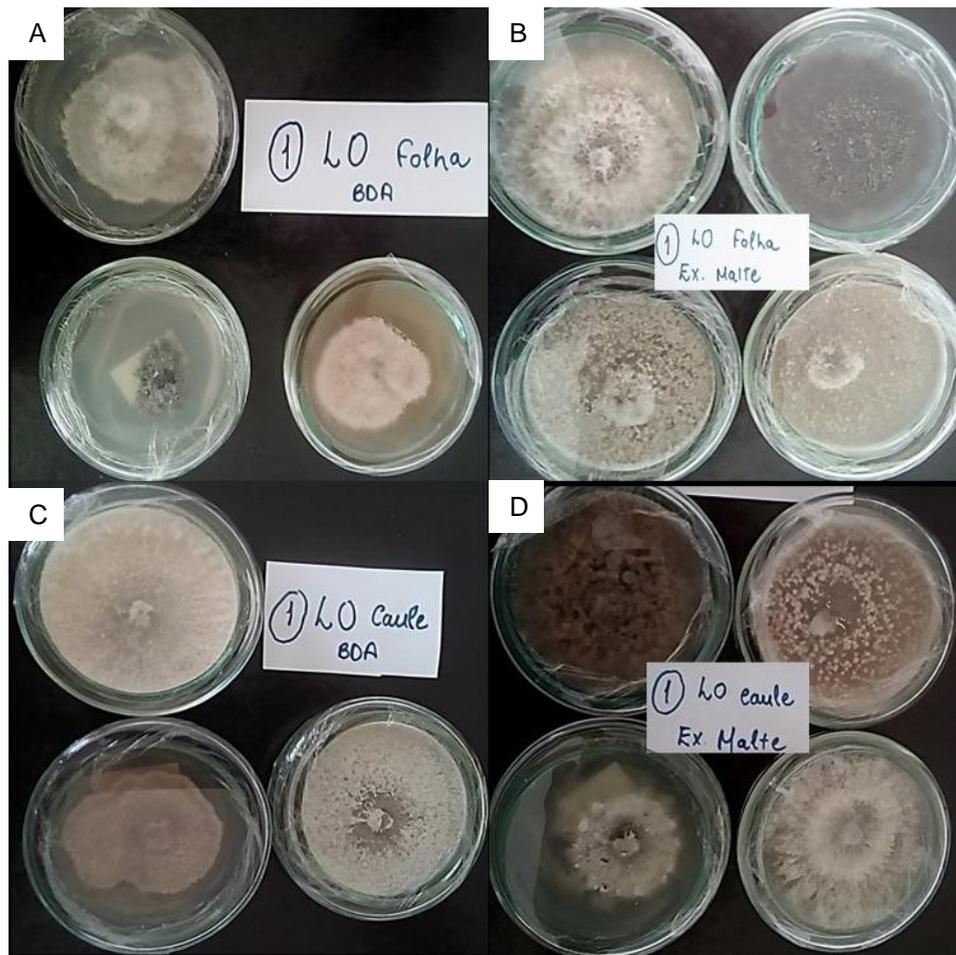


Figura 19: Representantes de fungos endofíticos isolados a partir de folhas e caules de um organismo de *Lippia organoides*, na segunda coleta, em meios Batata Dextrose Ágar (BDA) e Ágar Extrato de Malte (EMA).

Fonte: Arquivos pessoais do autor (2017).

4.2 SCREENING DAS RELAÇÕES ENTRE ENDOFÍTICOS NOS ORGANISMOS DE *Lippia organoides* COLETADOS

O total de isolados obtido a partir das duas coletas da espécie LO foi de 129 fungos endofíticos, sendo destes 46 provenientes de folhas (35,66%) e 97 dos caules (64,34%). Considerando a quantidade total de folhas plaqueadas na primeira coleta (= 15) e na segunda (45 em meio BDA e 45 em EMA), e o material vegetal que apresentou efetivo crescimento fúngico, foi obtida a taxa de colonização para as folhas (Tc F total) em cada coleta, respectivamente 26,7% e 46,7%. O mesmo foi realizado a partir dos fragmentos de caules (mesmas quantidades de descritas para as folhas),

sendo obtidas as taxas de colonização ($T_{C\ C\ total}$) em cada coleta, respectivamente, 73,3% e 80%.

A Tabela 1 apresenta as taxas de colonização para as partes vegetais de LO em cada coleta realizada.

Tabela 1: Taxas de Colonização dos fungos endofíticos isolados de folhas e caules da espécie *Lippia origanoides* na primeira e segunda coletas.

Folhas			Caules					
1ª coleta:		EMA (%)	$T_{C\ F\ total}$	1ª coleta:		EMA (%)	$T_{C\ C\ total}$	$T_{C\ total}$ 1ª coleta
$T_{C\ F}$	---	26,7	26,7	$T_{C\ C}$	----	73,3	73,3	50
2ª coleta	BDA (%)	EMA (%)	$T_{C\ F\ total}$	2ª coleta	BDA (%)	EMA (%)	$T_{C\ C\ total}$	$T_{C\ total}$ 2ª coleta
$T_{C\ FLO\ 1}$	40	40		$T_{C\ CLO\ 1}$	66,7	73,3		63,3
$T_{C\ FLO\ 2}$	60	53,3		$T_{C\ CLO\ 2}$	106,7	100		
$T_{C\ FLO\ 3}$	46,7	40		$T_{C\ CLO\ 3}$	73,3	60		
			46,7				80	

$T_{C\ F}$ – taxa de colonização das folhas; $T_{C\ C}$ – taxa de colonização dos fragmentos de caules; $T_{C\ F\ total}$ – taxa total de colonização das folhas; $T_{C\ C\ total}$ – taxa total de colonização dos fragmentos de caules; $T_{C\ total}$ – taxa de colonização total; $T_{C\ FLO\ 1}$ – taxa de colonização das folhas de *Lippia origanoides* organismo 1; $T_{C\ FLO\ 2}$ – taxa de colonização das folhas de *L. origanoides* organismo 2; $T_{C\ FLO\ 3}$ – taxa de colonização das folhas de *L. origanoides* organismo 3; $T_{C\ CLO\ 1}$ – taxa de colonização dos fragmentos de caules de *L. origanoides* organismo 1; $T_{C\ CLO\ 2}$ – taxa de colonização dos fragmentos de caules de *L. origanoides* organismo 2; $T_{C\ CLO\ 3}$ – taxa de colonização dos fragmentos de caules de *L. origanoides* organismo 3; BDA (%) – percentual encontrado em meio de cultura Batata Dextrose Ágar; EMA (%) – percentual meio de cultura Extrato De Malte Ágar.

Fonte: Dados do autor (2017).

Houve maior frequência de fungos endofíticos nos caules do que nas folhas, fato que sugere uma possível migração dos micro-organismos para diferentes tecidos das plantas, independentemente da sua porta de entrada (Souza *et al.*, 2004). Sun *et al.* (2008), em um estudo a respeito da diversidade e distribuição ecológica de fungos endofíticos associados às espécies de plantas medicinais *Dracaena cambodiana* e *Aquilaria sinensis*, coletadas no Jardim Botânico de Pequim (China), apontaram que as taxas de colonização dos isolados foram notavelmente mais altas em galhos do que em folhas nas seis plantas examinadas.

No estudo supracitado (Sun *et al.*, 2008), foram encontradas taxas de colonização de 47,9% a 63,1%, classificadas pelos autores como altas taxas.

Considerando os percentuais relacionados a folhas e a caules separadamente nos experimentos desta tese, o único abaixo da faixa apontada pelo estudo mencionado foi referente à taxa de colonização obtida para as folhas provenientes da 1ª coleta (26,7%). Aspectos relacionados à identidade das espécies fúngicas à planta hospedeira, à quantidade de amostra utilizada e/ou ao meio de isolamento são apontados por Gong e Guo (2009) como os principais fatores de efeito sobre as taxa de colonização e isolamento.

4.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DO MATERIAL VEGETAL

A comparação do perfil fitoquímico dos extratos metabólicos secundários dos fungos endofíticos isolados ao perfil fitoquímicos dos organismos de *L. organoides* coletados foi realizada a partir da análise dos constituintes do óleo essencial de LO referentes à primeira e à segunda coletas. Os constituintes dos óleos essenciais obtidos a partir da análise do organismo LO proveniente da primeira coleta, proveniente de Santa Terezinha, são mostrados na Tabela 2. Os compostos estão dispostos na ordem de eluição em coluna. Foram identificados 30 constituintes do óleo essencial da folha de *Lippia organoides* Kunth., sendo os compostos majoritários: carvacrol (40,80%), p-cimeno (11,68%), γ -terpineno (11,20%) e *e*-cariofileno (5,67%).

A composição química dos óleos essenciais de *L. organoides* apresenta variação fitoquímica, de acordo com os principais constituintes identificados. A ocorrência de diferentes perfis químicos nos óleos essenciais desta espécie tem sido relatada, incluindo hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênicos oxigenados e sesquiterpenos hidrocarbonetos como compostos principais, podendo sofrer variações em composição, dependendo do local, horário e estação do ano (Da Silva *et al.*, 2017).

A composição do óleo essencial do organismo LO, proveniente de Santa Terezinha-BA (1ª coleta), apresentou o carvacrol com proporção de 40,80%. O organismo 1 (2ª coleta) tem a mesma origem do organismo utilizado na 1ª coleta, portanto, os dados referentes à composição do óleo essencial demonstraram valores

muito próximos aos demonstrados na tabela acima. Os organismos 2, proveniente de Jaguarari-BA, e 3, de Santa Bárbara-BA, também apresentaram maior teor de carvacrol, respectivamente 49,42% e 33,41%, portanto, todos os organismos são representantes do quimiotipo B (Feijó, 2018).

Compostos	KI^a 1,2	KI^b	Concentração (%)*
α-tujeno	926-27	930	0,85
α-pineno	934-35	939	0,23
Canfeno	950	954	0,26
β-pineno	975	979	0,11
β-mirceno	988	990	2,18
α-felandreno	1003	1002	0,17
α-terpineno	1016	1017	1,89
<i>p</i>-cimeno	1024	1024	11,68
Limoneno	1028-29	1029	0,36
<i>Z</i>-β-ocimeno	1036	1037	0,11
<i>E</i>-β-ocimeno	1047	1050	0,11
γ-terpineno	1059	1059	11,20
NI	1087	-	-
Linalol	1096	1096	1,25
Cânfora	1144-43	1146	0,49
Borneol	1165	1169	0,33
Terpinen-4-ol	1176	1177	0,48
Éter metílico do timol	1233	1235	1,60
NI	1282	-	-
Timol	1288	1290	2,56
Carvacrol	1300-01	1299	40,80
Acetato de carvacrol	1370-69	1372	0,56
NI	1374	-	-
NI	1410	-	-
<i>E</i>-cariofileno	1421	1419	5,67
NI	1429	-	-
α-trans-bergamoteno	1436	1434	0,43
aromadendreno	1441	1441	1,96
NI	1445	-	-
α-humuleno	1456-55	1454	2,01
NI	1463-62	-	-
NI	1484	-	-

Compostos	KI ^a 1,2	KI ^b	Concentração (%)*
NI	1489-88	-	-
Viridifloreno	1496	1496	2,72
Biciclogermacreno	1496	1500	1,91
β -bisaboleno	1507	1505	0,18
NI	1519-18	-	-
NI	1524-23	-	-
NI	1568	-	-
Espatuleno	1578	1578	1,09
Óxido de cariofileno	1584	1583	0,87
Viridiflorol	1592	1592	0,43
NI	1602-01		
NI	1610-09		
NI	1624-23		
NI	1639-38		
NI	1660		
NI	1671-70		
Total de compostos identificados			89,95

Tabela 2: Composição química do óleo essencial das folhas de *Lippia origanoides* Kunth e suas respectivas concentrações, identificados a partir do organismo proveniente de Santa Terezinha-BA, na primeira coleta.

Fonte: Dados do autor (2017).

KI^a_{1,2} – Índice de retenção linear obtido através da equação de Índice de Kovats das amostras 1 e 2, respectivamente.

KI^b – Índice de retenção linear obtido na literatura (ADAMS, 2007).

NI – Compostos não identificados.

* – A quantificação dos compostos (concentração) foi realizada pela normalização da área dos picos obtidas por CG/DIC, calculada como a média de duas injeções.

Carvacrol consiste em um monoterpenóide fenólico, cujas ações bioativas abrangem atividades antimicrobianas, antioxidantes e anticancerígenas. É encontrado em óleos essenciais de diversas plantas (*Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Lepidium flavum*, *Lippia origanoides*, dentre outras), sendo bastante utilizado em aromaterapia e como conservante natural (Sharifi-Rad *et al.*, 2018). A literatura relata a associação de óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth ricos em carvacrol envolvidos em atividades antimicrobianas (Castillho *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2019; Sarrazin *et al.*, 2015).

O *p*-cimeno (*p*-cimol ou *p*-isopropiltolueno) trata-se de um composto aromático, relacionado à família dos terpenos, sendo um monoterpene monocíclico. Ocorre em óleos essenciais (OE) de várias plantas aromáticas e plantas alimentícias, como cenoura, laranja, toranja, tangerina, framboesa e especiarias diversas. As suas propriedades farmacológicas incluem atividades antioxidante, antiinflamatória, antiparasitária, antidiabética, antiviral antitumoral, antibacteriana, antifúngica, analgésica, antinociceptiva, imunomoduladora, vasorrelaxante, neuroprotetiva e anticancerígena (Balahbib *et al.*, 2021)

Os outros dois constituintes, em quantidades equivalentes no material vegetal (em torno de 11%) são γ -terpineno e *e*-cariofileno. O γ -terpineno trata-se de um terpeno encontrado em óleos essenciais de plantas, como o eucalipto, sendo também muito utilizado como aromatizante. Suas propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias têm sido estudadas, especialmente a atividade antioxidante em sinergismo com fenóis e polifenóis (Mollica *et al.*, 2022; Guo *et al.*, 2021). O *e*-cariofileno (ou β -cariofileno) é um sesquiterpeno encontrado como composto aromático em muitos óleos essenciais de plantas, especialmente em especiarias como pimenta-do-reino, cravo-da-índia, canela e alecrim. São relatadas atividades antiinflamatória, antitumoral, bactericida, dentre outras (Carneiro *et al.*, 2010).

Sarrazin *et al.* (2015) indicaram seis quimiotipos na espécie, descritos a partir de organismos ocorrentes na Amazônia brasileira e colombiana, sendo estes:

- quimiotipo A – rico em *p*-cimeno, com aroma cítrico, α - e β -felandreno e limoneno;
- quimiotipo B – rico em carvacrol, com aroma de orégano;
- quimiotipo C – timol, também com aroma de orégano;
- quimiotipo D – 1,8-cineol, com cheiro canforado;
- quimiotipo E – *e*-metil cinamato e *e*-nerolidol.

De acordo com Ribeiro *et al.* (2021), os quimiotipos de A, B e C de *L. origanoides* apresentam ocorrência na Amazônia brasileira e colombiana. O óleo do quimiotipo B tem aroma semelhante ao da planta *Origanum vulgare* L. (orégano), família Lamiaceae, tendo predominância de carvacrol (cerca de 40%), também *p*-cimeno (em torno de 13%), γ -terpineno e timol (ambos em aproximadamente 11%), à semelhança dos óleos dos exemplares existentes nos estados do Piauí e Pará, Brasil (Oliveira *et al.*, 2007).

Considerada espécie sinônima de *L. origanoides*, o óleo essencial de *L. schomburgkiana* Schauer contém alto teor de 1,8-cineol, tendo sido caracterizado como o quimiotipo (D) para esta espécie (Silva; Silva, 2009). Enquanto o quimiotipo E apresenta odor que remete aos aromas de canela, morango e madeira, sendo este quimiotipo relatado de uma área de amostragem ao sul do estado do Pará, região da Amazônia Oriental (Ribeiro *et al.*, 2021).

Em um estudo a partir de os óleos essenciais de indivíduos LO coletados em Chicamocha (Colômbia), Vega-Vela *et al.* (2013) relataram a presença de cinco quimiotipos (B, C, D, F e G) presentes no canion do rio Chicamocha; dois deles (C e E) estão presentes em Magdalena, destacando-se a caracterização de: quimiotipo F – rico em *p*-cimeno, eucaliptol (+ traço de β -felandreno) e timol éter metílico; e quimiotipo G – rico em timol metil éter, *p*-cimeno, timol e γ -terpineno (quimiotipo G).

Alguns estudos afirmam que a produção dos metabólitos secundários dos micro-organismos endofíticos também pode ser influenciada pelo perfil metabólico da planta (Maggini *et al.*, 2017). Os experimentos relacionados à análise do perfil fitoquímico da planta *L. origanoides* realizados nesta tese tiveram como objetivo investigar essa influência.

4.4 COMPARAÇÃO DO RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS NAS METODOLOGIAS DE CULTIVO TESTADAS

A comparação dos dados de rendimento da massa seca (g/L) dos extratos brutos obtidos por diferentes métodos de cultivo e extração, permitiu a observação de que os extratos do cultivo em meio líquido (meios BD e EM) resultaram em menor quantidade de rendimentos (figura 20); o grupo oriundo do cultivo em meio sólido de ágar (BDA, EMA, EMAS) (figura 21), rendimento intermediário e, por fim, o extrato obtido do meio fermentativo em arroz (figura 22) resultou em maior rendimento da massa seca.



Figura 20: Cultivo em escala ampliada em meio Batata Dextrose (BD), em frascos reagentes tipo *Schotts* (300 mL).
Fonte: Arquivos pessoais do autor (2021).



Figura 21: Cultivo em escala ampliada em meio sólido EMA (placas de Petri 150 mm x 25 mm).
Fonte: Arquivos pessoais do autor (2021).



Figura 22: Cultivo em escala ampliada em meio fermentativo de arroz, isolado LO C 4.1 EMA, demonstrando o crescimento após 15 dias.
Fonte: Arquivos pessoais do autor (2022).

A literatura relata as diferentes influências das condições de cultivo na produção dos metabólitos secundários (Kang *et al.*, 2014; Vandermolen *et al.*, 2013). As extrações por cultivo em meio sólido podem ter seu rendimento aumentado por serem obtidos, além dos metabólitos produzidos pelo fungo, elementos que compõem o ágar e a estrutura celular, resultando no incremento da sua massa; o que não é observado no meio líquido. O processo de obtenção dos extratos a partir de meio sólido apresentou vantagens frente à extração a partir de cultivo em meio líquido, tais como a redução da quantidade de solvente utilizada para a extração (acetato de etila) e de meio de cultura (BDA/EMA) utilizado, além de ser dispensada a realização da partição líquido-líquido, tornando-se um processo mais rápido e otimizando a obtenção de extratos.

No que diz respeito ao meio fermentativo de arroz, as análises realizadas até o momento permitiram a percepção de uma maior quantidade de ácidos graxos extraída pelo solvente acetato de etila, em comparação com os extratos brutos das outras duas metodologias testadas, tornando necessária a separação desses compostos para a obtenção de um extrato com maior quantidade efetiva de metabólitos secundários produzidos pelos isolados endofíticos. O emprego de técnicas para essa separação demonstrou ser essa metodologia mais dispendiosa em relação ao tempo empregado para a obtenção dos extratos purificados, tornando-se uma desvantagem para o uso desse processo de cultivo. Dessa forma, optou-se pela utilização da metodologia de cultivo em meio sólido (descrito na seção 3.4.2.1) para o cultivo dos endofíticos em escala ampliada.

A tabela 3 apresenta a massa média de extrato obtido por placa e a quantidade total de extrato obtida para os isolados cultivados meio sólido. A numeração conferida aos isolados na primeira coluna desta segue mantida nas tabelas seguintes, nas próximas seções de resultados, com o número entre parênteses após o código, a fim de facilitar a identificação destes quando mencionados no texto.

Os isolados que apresentaram maior quantidade de rendimento da massa total (mg) foram os isolados de Caule/BDA: 1LO – C 3.2 (nº 11 – 834,4 mg) e 3LO – C3.2 (nº 19 – 572,5 mg); seguidos do isolado do Caule/EMA, 1LO – C2.1 (nº 7 – 363,9). Os extratos obtidos foram utilizados nos testes relacionado às atividades antimicrobianas e antioxidantes, bem como ao perfil fitoquímico dos metabólitos secundários dos isolados.

Tabela 3: Massa média de extrato obtido por placa e quantidade total de extrato obtida para 31 isolados endofíticos fúngicos a partir da metodologia de cultivo em meio sólido.

Isolados endofíticos		Massa média /placa (mg)	Massa total obtida (mg)
Nº	Código		
Caule/EMA			
1	LO – C 1.1	4,3	43,9
2	LO – C 1.2	15,1	120,6
3	LO – C1.3	13,7	137,4
4	LO – C3.1	15,8	158,1
5	LO – C3.2	15,1	120,6
6	LO – C4.1	24,1	360,6
7	1LO – C2.1	40,4	363,9
8	2LO – C3.2	23,2	069,7
9	3LO – C3.3	28,9	086,6
Caule/BDA			
10	1LO – C3.1	27,6	332,1
11	1LO – C3.2	75,8	834,4
12	2LO – C1.1	17,6	194,1
13	2LO – C3.4	19,9	299,2
14	2LO – C1.3	34,5	344,5
15	3LO – C1.1	63,9	255,6
16	3LO – C2.1	8,7	96,7
17	3LO – C2.2	49	343,4
18	3LO – C2.3	22,1	199,4
19	3LO – C3.2	38,2	572,5
20	3LO – C3.3	10,1	111,6
Folha/BDA			
21	1LO – F1.1	16,7	184,0
22	1LO – F2.1	7,7	77,1
23	1LO – F3.1	25,7	231,6
24	2LO – F1.2	18,1	144,4
25	2LO – F2.1	43,8	438
26	2LO – F2.3	2,4	24,2
27	2LO – F3.1	54,1	216,7
28	2LO – F3.2	4,3	43,2
29	3LO – F2.1	47,8	287,2
30	3LO – F3.1	27,9	278,9
31	3 LO – F3.3	5,1	45,9

Fonte: Dados do autor (2021)

4.5 TESTES ANTIMICROBIANOS

Dos 129 fungos endofíticos isolados de *Lippia origanoides*, 31 apresentaram atividade antimicrobiana nos testes realizados para a triagem das atividades antimicrobianas frente a um ou mais dos agentes patogênicos selecionados. Estes foram submetidos às análises nas etapas posteriores deste trabalho; os demais

seguem armazenados na micoteca do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LAPRON), na Universidade Estadual de Feira de Santana, estando todos à disposição da equipe de pesquisa para futuras potenciais investigações.

A tabela 3 apresenta a relação completa dos fungos, os quais serão mantidos nas tabelas seguintes a partir dos resultados que demonstraram nas metodologias apresentadas em cada seção.

4.5.1 Difusão em Disco de Ágar (DDA)

Os isolados obtidos de LO foram submetidos ao teste de DDA com a finalidade de serem triados quanto à sua atividade antimicrobiana. Através da metodologia utilizada, 16 isolados demonstraram zonas de inibição à bactéria *Staphylococcus aureus* CCMB 263, com medidas diamétricas entre 09 e 18 mm. Os isolados LO – C3.1 EMA (nº 4), 3LO – C2.2 BDA (nº17) e 3LO – C3.2 BDA (nº19) e 1LO – F1.1 (nº 21) apresentaram, em média da triplicada, 18 mm.

Os antibióticos Cloranfenicol (30 µg/disco) e Eritromicina (15 µg/disco) foram testados como controles, os quais apresentaram halos de 26 e 35 mm, respectivamente, contra a cepa *S. aureus* CCMB 263 (Figura 23).

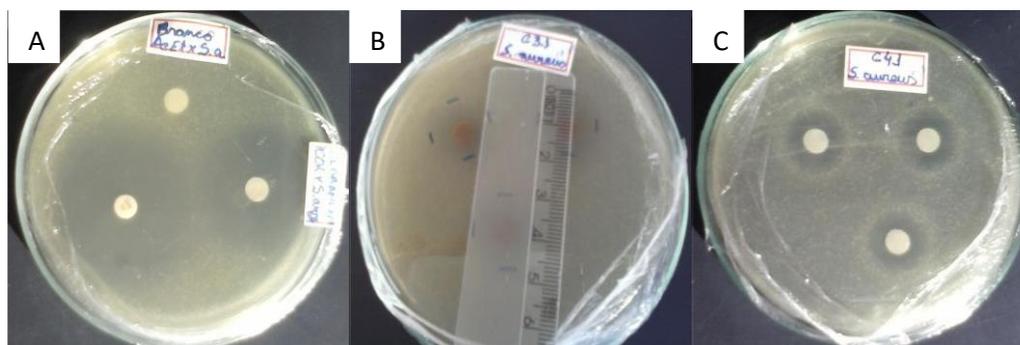


Figura 23: Teste de Difusão em Disco de Ágar frente à cepa *Staphylococcus aureus* CCMB 263. A – controles utilizados: Acetato de Etila (parte superior da imagem) – ausência de zona de inibição, Eritromicina (à esquerda da imagem) – diâmetro da zona de inibição 26 mm; e Cloranfenicol (à direita) – zona de inibição 35 mm; B – discos impregnados com extrato bruto do isolado LO C 3.1 EMA – zona de inibição 18 mm; C – discos impregnados com extrato bruto do isolado LO C 4.1 EMA – zona de inibição 14 mm.

Fonte: Arquivos do autor (2019).

Nesta metodologia, 18 isolados demonstraram zonas de inibição à *Candida albicans* CCMB 286, com diâmetro dos halos entre 09 e 13 mm. Os isolados 1LO – C3.1 EMA (nº 10), e os isolados em meio BDA 3LO – C2.1 (nº 16), 3LO – C2.2 (nº 17), 3LO – C3.2 (nº 19) e 1 F 1.1 (nº 21) e 2LO – F1.2 (nº 24) apresentaram zonas de inibição de 13 mm, na média da triplicata. O antifúngico Nistatina (10 µg/disco), utilizado como controle nos testes contra a levedura, apresentou média dos halos em 14 mm de diâmetro.

Os fungos endofíticos testados não apresentaram halos inibitórios à *Escherichia coli* CCMB 261. Apenas o disco de Eritromicina demonstrou inibição à cepa Gram-negativa testada, cuja medida foi de 15 mm de diâmetro. O solvente acetato de etila também foi testado, não demonstrando inibição ao crescimento de qualquer um dos micro-organismos testados.

Manuais de interpretação para o antibiograma manual padronizado, utilizado em laboratórios clínicos, indicam medidas aplicáveis aos diâmetros das zonas de inibição, com o objetivo de classificar os micro-organismos testados nas categorias: Sensível, Intermediário e Resistente. Os valores esperados para a ação do antibiótico Cloranfenicol (30 µg) frente a *S. aureus* situam-se nas faixas: ≤ 12 mm – Resistente; de 13 a 17 mm – Intermediário; ≥ 18 – Sensível; para a ação da Eritromicina (macrolídeo), situa-se em: ≤ 13 mm – Resistente; de 14 a 17 mm – Intermediário; ≥ 18 – Sensível (BrCAST, 2024; Oplustil, 2011).

A partir da literatura consultada (Balouiri *et al.*, 2016), neste trabalho foram consideradas “inibitórias” medidas de zonas de inibição ≥ 9 mm. Intervalos entre 3 a 8 mm foram considerados possivelmente “intermediários”, entretanto, não foram assim designados pela compreensão de que essa terminologia seja aplicável a drogas devidamente padronizadas. Zonas de inibição com medidas ≤ 8 mm foram considerados insuficientes para que o micro-organismo testado (*S. aureus* ou *C. albicans*) fosse “sensível” aos possíveis efeitos antimicrobianos do extrato.

A tabela 4 apresenta as médias das triplicatas (em mm) obtidas a partir das leituras das zonas de inibição, nos testes de DDA, para os isolados endofíticos testados mediante a impregnação dos discos de papel de filtro por seus extratos brutos frente aos micro-organismos *S. aureus* CCMB 263 e *C. albicans* CCMB 286.

Tabela 4: Zonas de inibição (mm) apresentadas pelos isolados endofíticos de *Lippia origanoides* frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus* CCMB 263 e *Candida albicans* CCMB 286 na técnica Difusão em Disco de Ágar (DDA).

Isolados endofíticos		Diâmetro da zona de inibição (mm)	
Nº	Código	<i>S. aureus</i> CCMB 263	<i>C. albicans</i> CCMB 286
Caule/EMA			
1	LO – C 1.1	<8	<8
2	LO – C 1.2	<8	<8
3	LO – C1.3	17	12
4	LO – C3.1	18	11
5	LO – C3.2	13	9
6	LO – C4.1	14	9
7	1LO – C2.1	9	10
8	2LO – C3.2	<8	10
9	3LO – C3.3	16	12
Caule/BDA			
10	1LO – C3.1	14	13
11	1LO – C3.2	<8	<8
12	2LO – C1.1	<8	<8
13	2LO – C1.3	<8	<8
14	2LO – C3.4	<8	<8
15	3LO – C1.1	<8	<8
16	3LO – C2.1	16	13
17	3LO – C2.2	18	13
18	3LO – C2.3	17	R
19	3LO – C3.2	18	13
20	3LO – C3.3	14	12
Folha/BDA			
21	1LO – F1.1	18	13
22	1LO – F2.1	<8	<8
23	1LO – F3.1	<8	<8
24	2LO – F1.2	17	13
25	2LO – F2.1	<8	<8
26	2LO – F2.3	<8	<8
27	2LO – F3.1	17	11
28	2LO – F3.2	17	12
29	3LO – F2.1	16	10
30	3LO – F3.1	17	11
31	3 LO – F3.3	< 8	<8

< 8 mm = não sensível.

Fonte: Dados dos autor (2019).

Li *et al.* (2005) realizaram um estudo de bioprospecção para fungos endofíticos com atividades antitumorais e antifúngicas, descrevendo que as zonas de inibição encontradas variaram de 9 a 25 mm, sendo que a maior parte dos metabólitos testada levou à formação de halos situados na faixa 10 a 14 mm. Cui *et al.* (2011) isolaram fungos endofíticos de *Aquilaria sinensis* para determinar agentes

com atividades antitumorais e antimicrobianos, classificando zonas de inibição a partir de 8 mm de diâmetro como positivas.

Gong e Guo (2009) isolaram fungos endofíticos de *Dracaena cambodiana* (família Asparagaceae) e relatam testes de triagem para a atividade antibiótica em que encontraram halos de inibição que variaram de 7 a 27 mm de diâmetro. Radji *et al.* (2011), selecionando fungos endofíticos isolados de *Garcinia mangostana* família Clusiaceae, na Indonésia, com atividade antibacteriana, referem ter encontrado medidas que variaram de 6,5 a 14,7 mm.

Em uma revisão a respeito dos métodos *in vitro* para avaliação da atividade bacteriana, Balouiri *et al.* (2016) afirmam que testes como o DDA proporcionam resultados qualitativos, não permitindo distinguir os efeitos bactericidas e bacteriostáticos, além disso, não é apropriado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). No entanto, o ensaio de difusão em disco ainda oferece muitas vantagens em relação a outros métodos, como: simplicidade, baixo custo, a capacidade de testar grande número de micro-organismos e agentes antimicrobianos e a facilidade de interpretação dos resultados fornecidos.

Os relatos de pesquisa e triagem da ação antibiótica de micro-organismos, considerando a semelhança das metodologias utilizadas, demonstraram zonas de inibição semelhantes às encontradas neste trabalho.

4.5.2 Microdiluição em caldo

4.5.2.1 Testes com bactérias patogênicas Staphylococcus aureus e Escherichia coli

Dos 31 extratos brutos testados pela metodologia de triagem por microdiluição em caldo, 15 apresentaram atividade antimicrobiana frente aos patógenos *S. aureus* ATCC 43300 e *S. aureus* CCMB 263, com Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) entre 15,625 a 500 µg/mL (Figura 24D), e Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) entre 31,25 e ≤ 500 µg/mL. Nenhum dos extratos apresentou atividade frente à *E. coli* CCMB 261. O antibiótico Cloranfenicol resultou em CIM ≤ 15,625 µg/mL, reproduzindo

este resultado nas demais repetições. Os dados obtidos para as CIM e CBM dos extratos brutos testados frente às linhagens de *S. aureus* nos testes de diluição seriada realizados seguem descritos na tabela 5.

Tabela 5: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) e Concentração Bactericida Mínima ($\mu\text{g/mL}$) apresentadas pelos extratos brutos dos isolados endofíticos de *Lippia organoides* frente às cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 e *S. aureus* CCMB 263, em testes de microdiluição em caldo.

Extrato LO (AcEt)	<i>S. aureus</i> ATCC 43300		<i>S. aureus</i> CCMB 263		
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	
Folha	250	500	250	250	
Caule	250	500	250	250	
Isolados endofíticos					
Nº	Código				
	Caule/EMA				
1	LO – C 1.1	500	500	500	500
2	LO – C 1.2	500	> 500	500	> 500
3	LO – C1.3	31,25	62,5	15,625	31,25
4	LO – C3.1	500	500	250	500
5	LO – C3.2	62,5	125	15,625	31,25
6	LO – C4.1	125	250	62,5	125
7	1LO – C2.1	500	> 500	500	> 500
8	2LO – C3.2	500	> 500	500	> 500
9	3LO – C3.3	250	500	250	250
	Caule/BDA				
10	1LO – C3.1	250	500	125	250
11	1LO – C3.2	500	> 500	500	500
12	2LO – C1.1	> 500	> 500	> 500	> 500
13	2LO – C1.3	> 500	> 500	> 500	> 500
14	2LO – C3.4	500	> 500	500	> 500
15	3LO – C1.1	500	500	500	500
16	3LO – C2.1	125	250	125	250
17	3LO – C2.2	125	250	62,5	125
18	3LO – C2.3	250	500	125	250
19	3LO – C3.2	125	250	62,5	125
20	3LO – C3.3	500	> 500	500	> 500
	Folha/BDA				
21	1LO – F1.1	125	250	31,25	62,5
22	1LO – F2.1	> 500	> 500	> 500	> 500
23	1LO – F3.1	250	500	125	250
24	2LO – F1.2	62,5	250	62,5	125
25	2LO – F2.1	500	> 500	500	500
26	2LO – F2.3	500	> 500	500	> 500
27	2LO – F3.1	62,5	250	62,5	125
28	2LO – F3.2	62,5	125	125	125
29	3LO – F2.1	125	250	125	250
30	3LO – F3.1	125	250	62,5	250
31	3 LO – F3.3	> 500	> 500	> 500	> 500
	Clo	15,625	15,625	15,625	15,625

Extrato LO AcEt – Extrato de *Lippia organoides* em acetato de etila; *S. a.* ATCC 43300 – *Staphylococcus aureus* linhagem ATCC 43300; *S. a.* CCMB 263 – *Candida albicans* linhagem CCMB 263; CIM – Concentração Inibitória Mínima; CBM – Concentração Bactericida Mínima; $\mu\text{g/mL}$ – micrograma por mililitro; CLO – antibiótico Cloranfenicol (controle).

Fonte: Dados do autor (2023).

Os resultados de uma das repetições da técnica de microdiluição em caldo para teste da linhagem *S. aureus* CCMB 263 frente aos extratos brutos dos isolados podem ser visualizados nas Figuras 24 e 25. A figura 24 mostra a ação antimicrobiana dos extratos brutos de 11 isolados frente à cepa *S. aureus* CCMB 263, na qual os isolados que demonstraram maior atividade inibitória potencial foram 3 isolados em EMA: LO C 1.3 – CIM 15,625 $\mu\text{g/mL}$ (nº 3); LO C 3.2 – CIM 15,625 $\mu\text{g/mL}$ (nº 5); e LO C 4.1 – CIM 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (nº 6). A figura 25 apresenta a ação de 16 outros isolados também frente à cepa *S. aureus* CCMB 263. Nesta, o isolado 1 LO F 1.1 BDA (nº 21) apresentou a menor CIM, 31,25 $\mu\text{g/mL}$, enquanto outros 9 isolados resultaram em CIM de 62,5 $\mu\text{g/mL}$.

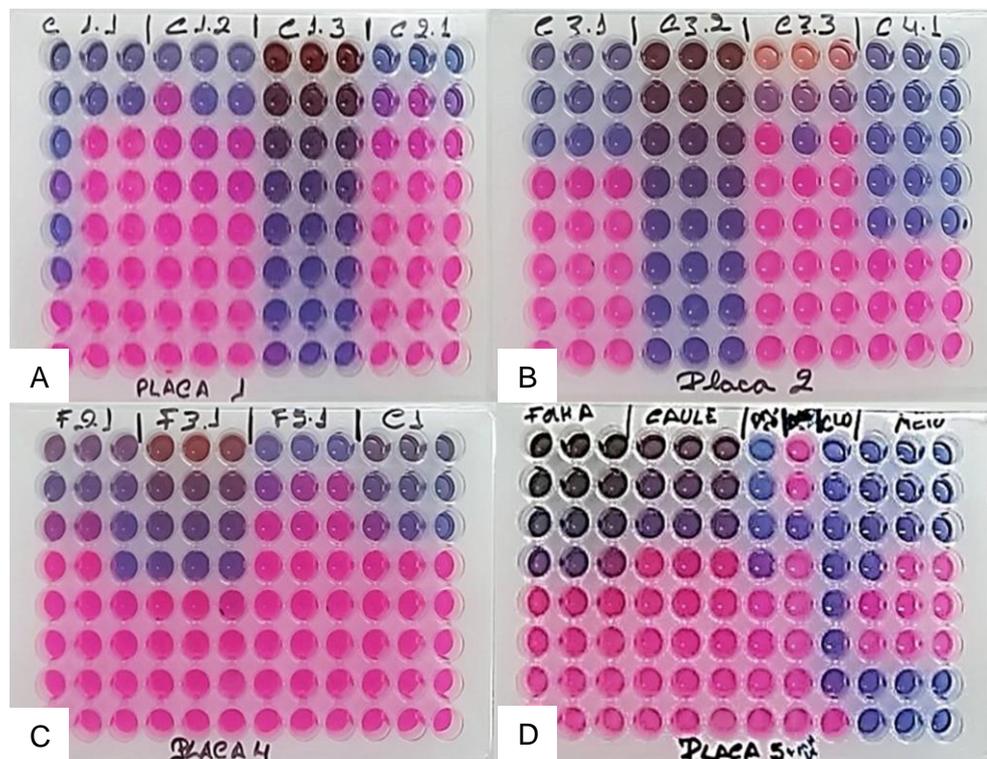


Figura 24: Microdiluição em caldo para teste da linhagem *S. aureus* CCMB 263 frente aos efeitos dos extratos brutos de 11 isolados e extratos de *Lippia organoides*, utilizando revelação com resazurina. A – LO C 1.1 EMA (Fileiras 1 a 3); LO C 1.2 EMA (Fileiras 4 a 6); LO C 1.3 EMA (Fileiras 7 a 9); 1 LO C 2.1 EMA (Fileiras 10 a 12); B – LO C 3.1 EMA (Fileira 1 a 3); LO C 3.2 EMA (Fileiras 4 a 6); LO C 3.3 EMA (Fileiras 7 a 8); LO C 4.1 EMA (Fileiras 10 a 12); C – 2 LO F 2.1 BDA (Fileira 1 a 3); 1 LO F 3.1 BDA (Fileiras 4 a 6); LO F 5.1 EMA (Fileiras 7 a 9); Extrato de Caule LO (Fileiras 10 a 12); D – Extrato de Folhas (Fileiras 1 a 3); Extrato de Caule (Fileiras 4 a 6); Cloranfenicol (Fileira 9); Poços controles positivos e negativos (Fileiras 7 a 12).

Fonte: Dados do autor (2023).

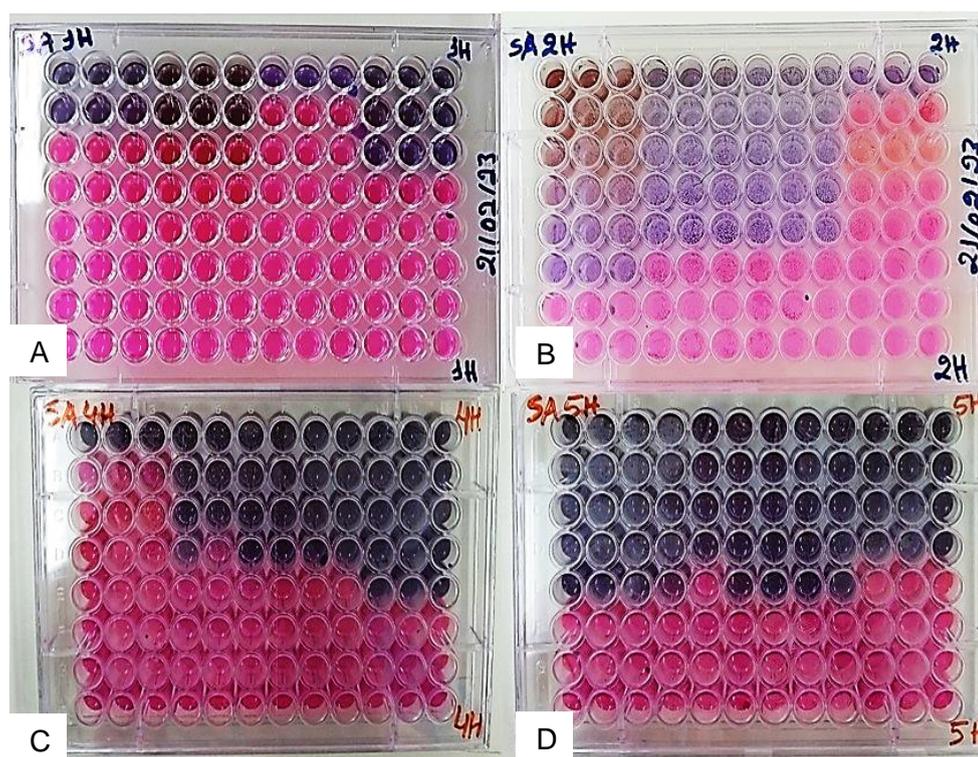


Figura 25: Microdiluição em caldo para teste da linhagem *S. aureus* CCMB 263 frente aos efeitos dos extratos brutos de 16 isolados, utilizando revelação com resazurina. A – 2 LO C 3.2 EMA (Colunas 1 a 3); 1 LO C 3.2 BDA (Colunas 4 a 6); 3 LO C 1.1 BDA (Colunas 7 a 9); 1 LO C 3.1 BDA (Colunas 10 a 12); B – 1 LO F 1.1 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 1.2 BDA (Colunas 4 a 6); 2 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 8); 2 LO C 3.2 EMA (Colunas 10 a 12); C – 2 LO F 2.1 BDA (Colunas 1 a 3); 3 LO C 3.3 EMA (Colunas 4 a 6); 3 LO C 2.1 BDA (Colunas 7 a 9); 3 LO C 2.2 BDA (Colunas 10 a 12); D – 3 LO C 3.2 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 3.2 BDA (Colunas 4 a 6); 3 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); 3 LO F 2.1 BDA (Colunas 10 a 12).

Fonte: Dados do autor (2023).

O valor da CIM é definido como o valor mais baixo da concentração do agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível do micro-organismo testado. A determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração de agente antimicrobiano necessária para matar 99,9% do inóculo final após incubação durante 24 h, sendo subjetivamente definida como a concentração mais baixa na qual 99,9% do inóculo final é morto (Balouiri *et al.*, 2016). Portanto, a CBM é útil na classificação da concentração em que o agente/extrato testado pode ser considerado bactericida, abaixo dessas condições, o extrato agiria apenas inibindo a reprodução ou o crescimento do micro-organismo, em ação bacteriostática.

O solvente acetato de etila demonstrou eficácia na extração dos metabólitos secundários dos extratos fúngicos, em concordância com as afirmações de Sadrati *et al.* (2023), que citam diversas vantagens relacionadas à utilização desse solvente, dentre elas: possuir polaridade média e poder dissolver compostos ativos polares e não polares; a capacidade de extrair seletivamente uma ampla gama de substâncias, como compostos polifenólicos com alto e com baixo peso molecular; facilidade na evaporação e secagem devido ao seu baixo ponto de ebulição.

Em consonância com os resultados obtidos neste trabalho, os autores supracitados relatam que o extrato bruto de acetato de etila aparentou ter uma ação antibacteriana mais potente contra bactérias Gram-positivas do que contra Gram-negativas. Diferenças na estrutura e composição da parede celular, bem como a presença do sistema de efluxo em bactérias Gram-negativas, auxiliam na sua resistência aos agentes antibióticos, impedindo que metabólitos bioativos adentrem pela parede celular destas, mais complexa que a das Gram positivas, por apresentar uma camada fina de peptidoglicano próxima à membrana citoplasmática e uma membrana externa adicional, composta de fosfolípidios e lipopolissacarídeos (Taufiq; Darah, 2020).

Outros resultados relacionados a testagem de atividade antimicrobiana a partir de extratos brutos de fungos endofíticos foram obtidos a partir da literatura a fim de embasar possíveis interpretações para os valores de CIM obtidos neste trabalho, as quais são citadas adiante.

Em relação aos testes de microdiluição em caldo, o efeito de filtrados e extratos de fungos endofíticos em *Phytophthora cinnamomi* foi avaliado *in vitro* e *in planta*, em *Lupinus luteus*. Os filtrados dos endófitos identificados como *Drechslera biseptata* e *Epicoccum nigrum* inibiram completamente o crescimento micelial do patógeno, demonstrando o que os autores classificaram como uma baixa concentração inibitória mínima (CIM) e alta atividade inibitória, respectivamente 150 e 300 µg/mL (García-Latorre *et al.*, 2022).

Dentre os fungos endofíticos isolados de *Coffea arabica* L., o extrato bruto do fungo *Alternaria alternata* apresentou intervalos de CIM entre 50-100 µg/mL para *S. aureus* e 400-800 µg/mL para *E. coli*, não apresentando atividade nas concentrações testadas para *C. albicans* (Fernandes *et al.*, 2009).

Chatterjee *et al.* (2019) relataram valores de CIM na faixa de 300-400 µg/mL nos testes contra Bactérias Gram positivas (*Bacillus subtilis* MTCC

121, *Listeria monocytogenes* MTCC 657, *Staphylococcus aureus* MTCC 96 and *Staphylococcus epidermidis* MTCC 2639) e Gram negativas (*Salmonella typhimurium* MTCC 98, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 741 e *Escherichia coli* MTCC 1667) testadas frente à fração de acetato de etila do fungo endofítico *Alternaria alternata* (AE1), isolado de folhas de *Azadirachta indica* A. Juss.

Como na referência citada acima, os extratos brutos deste trabalho também foram extraídos em solvente acetato de etila, com 15 extratos brutos apresentando $CIM \leq 250 \mu\text{g/mL}$. Os valores encontrados para a CIM dos 15 isolados permitem inferir atividade antimicrobiana desses extratos às cepas de *S. aureus* nas condições testadas.

4.5.2.2 Testes com linhagens da levedura *Candida albicans*

A partir dos resultados de triagem, foram testados 31 extratos brutos pela metodologia de microdiluição em caldo em diluição seriada frente às linhagens de *Candida albicans* ATCC 10231 e *C. albicans* CCMB 286. Na figura 26, pode ser observado o desenvolvimento fúngico, mais visível nas colunas de 2 a 4; enquanto na figura 27 este desenvolvimento não se destaca na análise visual. Os resultados tornaram-se melhor observáveis a partir da etapa de plaqueamento de alíquotas dos poços, relacionadas à obtenção da Concentração Fungicida Mínima (CFM) (Figura 28).

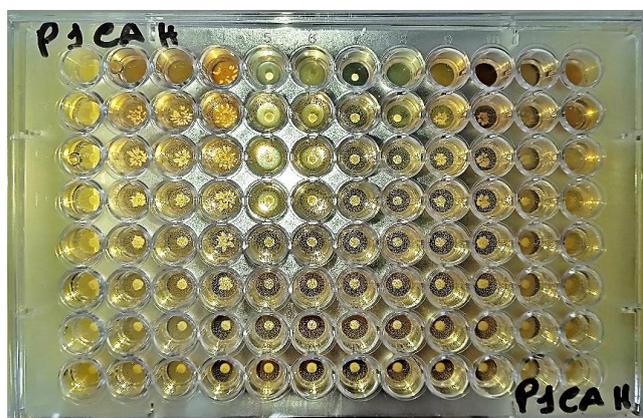


Figura 26: Microdiluição em caldo para teste da linhagem *C. albicans* ATCC 10231, observação contra foco de luz, destacando-se o desenvolvimento fúngico mais visível nas colunas de 2 a 4.

Fonte: Arquivos do autor (2023).

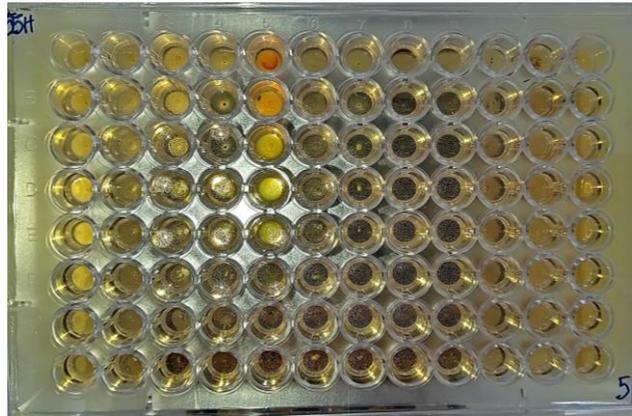


Figura 27: Microdiluição em caldo para teste da linhagem *C. albicans* CCMB 286, observação contra foco de luz, desenvolvimento fúngico pouco visível
Fonte: Arquivos do autor (2023).

A figura 28 mostra o resultado de uma das etapas do experimento, relacionada ao do plaqueamento de alíquotas dos poços para placa de microtitulação, a fim de ser obtida a CFM. Nessa etapa, o desenvolvimento das leveduras nas placas de Petri pôde ser observado, facilitando o registro dos dados.

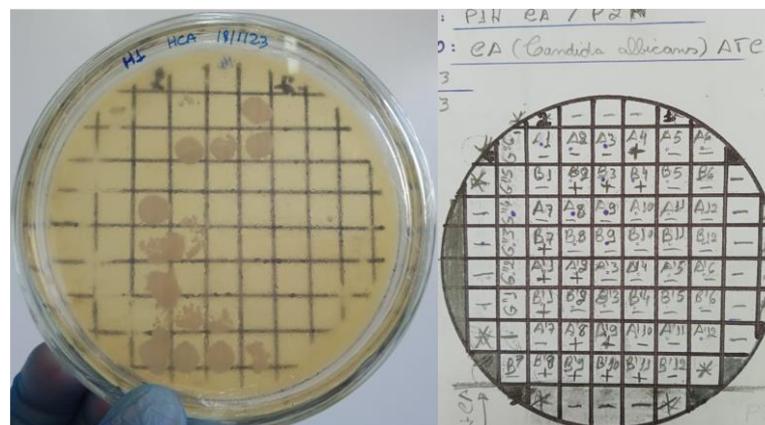


Figura 28: Concentração Fungicida Mínima dos extratos brutos testados frente a *Candida albicans* ATCC 10231, obtida a partir do plaqueamento de alíquotas (10 µL) dos poços da microplaca de titulação, após a incubação por 48 – 72 h. À direita da imagem, esquema de registro de dados.

Fonte: Dados do autor (2023).

A tabela 6 apresenta os dados obtidos para as CIM e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) de 31 extratos brutos. A CIM média dos extratos em acetato de etila foi menor frente à linhagem CCMB 286, 07 dos isolados apresentaram CIM $\leq 31,25$ frente a esta, enquanto para a linhagem ATCC 10231

apenas os extratos brutos 3LO – C2.3 (nº 18) e 1LO – F1.1 (nº 19) dos isolados em meio BDA apresentaram CIM 250 µg/mL nas triplicatas, e CFM de 500 µg/mL. Nos poços onde foi aplicado o antifúngico Nistatina, não houve desenvolvimento das leveduras.

Tabela 6: Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) e Concentração Fungicida Mínima (µg/mL) apresentadas pelos extratos brutos dos isolados endofíticos de *Lippia organoides* frente às linhagens *Candida albicans* ATCC 10231 e CCMB 263, em testes de microdiluição em caldo.

Extrato LO (AcEt)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231		<i>C. albicans</i> CCMB 286	
	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
Folha	500	>1000	500	500
Caule	500	>1000	500	500
Isolados endofíticos				
Nº	Código Caule/EMA			
1	LO – C 1.1	500	> 500	500
2	LO – C 1.2	500	> 500	500
3	LO – C1.3	500	> 500	62,5
4	LO – C3.1	500	> 500	62,5
5	LO – C3.2	> 500	> 500	62,5
6	LO – C4.1	500	> 500	250
7	1LO – C2.1	500	> 500	500
8	2LO – C3.2	500	> 500	500
9	3LO – C3.3	500	500	250
	Caule/BDA			
10	1LO – C3.1	500	500	31,25
11	1LO – C3.2	500	> 500	500
12	2LO – C1.1	> 500	> 500	> 500
13	2LO – C1.3	> 500	> 500	> 500
14	2LO – C3.4	500	> 500	500
15	3LO – C1.1	500	500	500
16	3LO – C2.1	> 500	> 500	31,25
17	3LO – C2.2	> 500	> 500	31,25
18	3LO – C2.3	250	500	125
19	3LO – C3.2	500	> 500	31,25
20	3LO – C3.3	> 500	> 500	125
	Folha/BDA			
21	1LO – F1.1	250	250	31,25
22	1LO – F2.1	> 500	> 500	> 500
23	1LO – F3.1	250	500	125
24	2LO – F1.2	500	500	31,25
25	2LO – F2.1	500	> 500	500
26	2LO – F2.3	500	> 500	500
27	2LO – F3.1	500	> 500	62,5
28	2LO – F3.2	> 500	> 500	31,25
29	3LO – F2.1	> 500	> 500	125
30	3LO – F3.1	> 500	> 500	62,5
31	3 LO – F3.3	> 500	> 500	> 500
	Nis	<4,68	<4,68	<4,68

Extrato LO AcEt – Extrato de *Lippia organoides* em acetato de etila; *C. a.* ATCC 10231 – *Candida albicans* linhagem ATCC 43300; *C. a.* CCMB 286 – *Candida albicans* linhagem CCMB 286; CIM – Concentração Inibitória Mínima; CFM – Concentração Fungicida Mínima; µg/mL – micrograma por mililitro; Nis – antifúngico Nistatina (controle).

Fonte: Dados do autor (2023).

Em um estudo com plantas medicinais, Xu *et al.* (2016) descreveram uma nova lactona monoterpene isolada de *Pestalotiopsis foedan*, fungo endofítico obtido de caule de *Bruguiera sexangula*, na China. O composto exibiu atividade antifúngica contra *Botrytis cinerea* e *Phytophthora nicotianae*, com valores de CIM de 3,1 e 6,3 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, respectivamente, valores próximos à CIM do antifúngico cetoconazol (3,1 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$); contra *Candida albicans*, a atividade antifúngica demonstrada foi considerada modesta, com valor de CIM 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.

Comparados aos valores relatados no estudo citado, as CIM relacionadas aos extratos brutos dos isolados deste trabalho também demonstraram atividade antifúngica através da metodologia utilizada. É necessário considerar também as distinções entre os princípios ativos isolados e o extrato bruto, uma vez que este traz uma gama de substâncias que precisam ser separadas a fim de ser obtido o metabólito responsável pela ação antimicrobiana.

4.5.2.3 Testes com fungos filamentosos dermatófitos

A partir da triagem realizada, 19 extratos brutos testados por microdiluição em caldo com diluição seriada apresentaram potencial fungistático e fungicida frente aos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* URM6272; *T. tonsurans* URM4288; *Microsporum canis* URM6969 e *Epidermophyton floccosum* URM6209. Não houve desenvolvimento micelial nos poços onde foi aplicado o antifúngico Cetoconazol, demonstrando uma CIM $\leq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ para a metodologia testada.

Uma das repetições do experimento evidencia o desenvolvimento do micélio fúngico em poços da microplaca cujas concentrações dos extratos não foram suficientes para inibir o seu crescimento. O registro de imagem foi realizado 10 dias após a realização do experimento (figura 29); neste estágio, o crescimento dos micélios de *T. mentagrophytes* URM6272 possibilitou a análise visual.

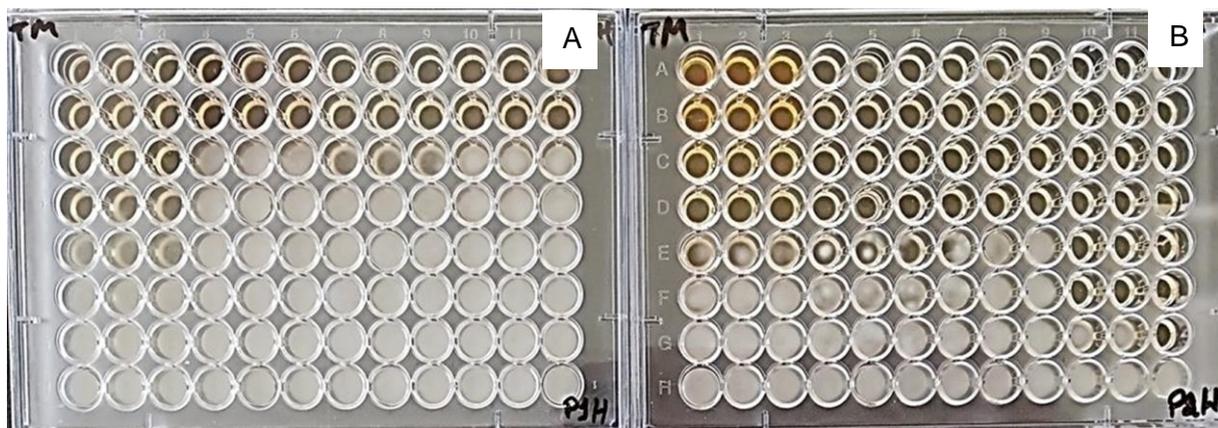


Figura 29: Microdiluição em caldo para teste dos efeitos dos extratos brutos de *Lippia organoides* em relação ao dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* URM6272, 10 dias após o início do experimento. Os extratos brutos dos isolados correspondem à seguinte ordem: A – LO C 1.3 EMA (Colunas 1 a 3); LO C 3.2 EMA (Colunas 4 a 6); LO C 4.1 EMA (Colunas 7 a 9); 1 LO C 3.1 BDA (Colunas 10 a 12); B – 1 LO F 1.1 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 1.2 BDA (Colunas 4 a 6); 2 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); Cetozonazol (Colunas 10 a 12).

Fonte: Arquivos do autor (2023).

A figura 30 mostra os resultados de uma das repetições da técnica microdiluição em caldo tendo como inóculo o dermatófito *T. tonsurans* URM4288. Os extratos brutos seguem a mesma ordem da figura 29. De maneira geral, os efeitos antifúngicos dos isolados testados foram similares para as duas espécies do gênero *Trichophyton*.

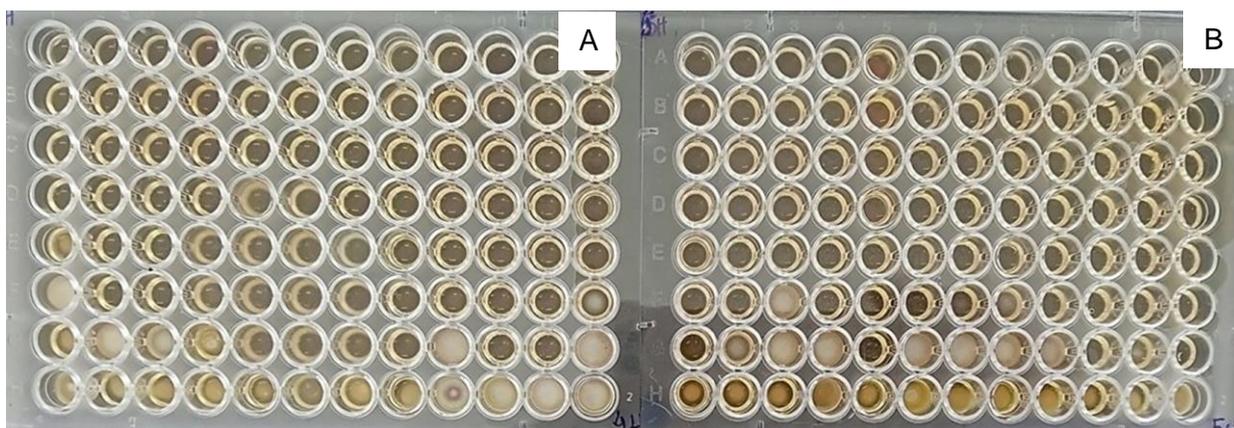


Figura 30: Microdiluição em caldo para teste dos extratos brutos de *Lippia organoides* em relação ao dermatófito *Trichophyton tonsurans* URM4288, 10 dias após o início do experimento. Os extratos brutos dos isolados correspondem à seguinte ordem: A – LO C 1.3 EMA (Colunas 1 a 3); LO C 3.2 EMA (Colunas 4 a 6); LO C 4.1 EMA (Colunas 7 a 9); 1 LO C 3.1 BDA (Colunas 10 a 12); B – 1 LO F 1.1 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 1.2 BDA (Colunas 4 a 6); 2 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); Cetozonazol (Colunas 10 a 12).

Fonte: Arquivos do autor (2023).

As ações fungicida e fungistática foram observadas para os extratos brutos descritos na tabela 7, a partir dos dados obtidos para as CIM e CFM das amostras testadas. Destacaram-se os isolados 3LO – C3.3 EMA (nº 9); 1LO – F1.1 BDA (nº 21); 2LO – F1.2 BDA (nº 24); 2LO – F3.1 BDA (nº 27), que apresentaram médias de CIM $\leq 125 \mu\text{g/mL}$ e CFM $\leq 250 \mu\text{g/mL}$ para os quatro dermatófitos testados.

As figuras 31 e 32 apresentam imagens da microdiluição em caldo, tendo como inóculos os dermatófitos *M. canis* URM 6969 e *E. floccosum* URM 6209, respectivamente.

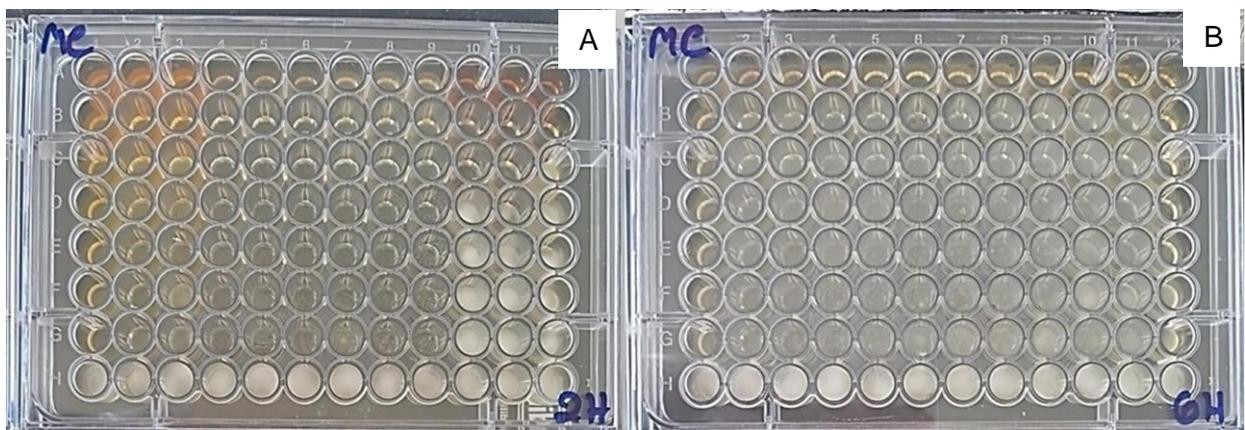


Figura 31: Microdiluição em caldo para teste dos extratos brutos de *Lippia organoides* frente ao dermatófito *Microsporum canis* URM 6969, 10 dias após o início do experimento. Os extratos brutos dos isolados correspondem à seguinte ordem: A – 1 LO F 1.1 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 1.2 BDA (Colunas 4 a 6); 2 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); 2 LO C 3.2 EMA (Colunas 10 a 12); B – 3 LO C 3.2 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 3.2 BDA (Colunas 4 a 6); 3 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); Ketoconazol (Colunas 10 a 12).
Fonte: Arquivos do autor (2023).



Figura 32: Microdiluição em caldo para teste dos efeitos dos extratos brutos de *Lippia organoides* em relação ao dermatófito *Epidermophyton floccosum* URM 6209, 10 dias após o início do experimento. Os extratos brutos dos isolados correspondem à seguinte ordem: A – 1 LO F 1.1 BDA (Colunas 1 a 3); 2 LO F 1.2 BDA (Colunas 4 a 6); 2 LO F 3.1 BDA (Colunas 7 a 9); 2 LO C 3.2 EMA (Colunas 10 a 12). **Fonte:** Arquivos do autor (2023).

Tabela 7: Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) e Concentração Fungicida Mínima ($\mu\text{g/mL}$), em testes de microdiluição em caldo, apresentadas pelos extratos brutos dos isolados endofíticos de *Lippia organoides* frente aos fungos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* URM6272; *T. tonsurans* URM4288; *Microsporum canis* URM6969 e *Epidermophyton floccosum* URM6209.

Extrato LO (AcEt)	<i>T.mentagrophytes</i> URM 6272		<i>T.tonsurans</i> URM 4288		<i>M.canis</i> URM 6969		<i>E. floccosum</i> URM 6209		
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	
Folha	500	> 500	250	500	125	250	125	250	
Caule	500	> 500	250	500	125	250	125	250	
Isolados endofíticos									
Nº	Código								
	Caule/EMA								
1	LO – C 1.1	500	500	500	500	500	500	500	500
2	LO – C 1.2	500	> 500	500	> 500	500	> 500	500	> 500
3	LO – C1.3	125	250	250	500	15,625	31,25	62,5	125
4	LO – C3.1	250	500	250	500	15,625	62,5	15,625	62,5
5	LO – C3.2	500	> 500	250	500	15,625	31,25	31,25	62,5
6	LO – C4.1	500	> 500	500	500	15,625	15,625	15,625	31,25
7	1LO – C2.1	125	250	250	500	15,625	31,25	31,25	62,5
8	2LO – C3.2	125	250	250	500	15,625	15,625	15,625	31,25
9	3LO – C3.3	62,5	125	62,5	125	15,625	31,25	15,625	31,25
	Caule/BDA								
10	1LO – C3.1	500	> 500	31,25	62,5	125	250	31,25	62,5
11	1LO – C3.2	500	> 500	500	> 500	500	> 500	500	> 500
12	2LO – C1.1	500	> 500	500	> 500	500	> 500	500	> 500
13	2LO – C1.3	500	> 500	500	> 500	500	> 500	500	> 500
14	2LO – C3.4	500	> 500	500	> 500	500	> 500	500	> 500
15	3LO – C1.1	500	> 500	500	> 500	500	> 500	500	> 500
16	3LO – C2.1	250	500	250	500	31,25	62,5	15,625	31,25
17	3LO – C2.2	250	500	125	250	15,625	31,25	15,625	31,25
18	3LO – C2.3	500	> 500	250	500	31,25	62,5	31,25	62,5
19	3LO – C3.2	250	500	250	500	15,625	31,25	15,625	31,25
20	3LO – C3.3	62,5	125	62,5	125	31,25	62,5	31,25	62,5
	Folha/BDA								
21	1LO – F1.1	125	250	62,5	125	15,625	31,25	15,625	31,25
22	1LO – F2.1	500	> 500	500	> 500	500	> 500	500	> 500
23	1LO – F3.1	500	> 500	500	> 500	500	> 500	500	> 500
24	2LO – F1.2	125	250	62,5	125	15,625	31,25	15,625	31,25
25	2LO – F2.1	500	> 500	500	> 500	500	> 500	500	> 500
26	2LO – F2.3	500	> 500	500	> 500	500	> 500	500	> 500
27	2LO – F3.1	125	250	62,5	125	15,625	31,25	15,625	31,25
28	2LO – F3.2	250	500	125	250	62,5	125	15,625	31,25
29	3LO – F2.1	250	500	250	500	15,625	31,25	15,625	31,25
30	3LO – F3.1	500	> 500	250	500	15,625	31,25	15,625	31,25
31	3 LO – F3.3	250	500	125	250	125	250	15,625	15,625
	Cet	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8	<8

Extrato LO AcEt – Extrato de *Lippia organoides* em acetato de etila; *T.m.* URM 6272 – *Trichophyton mentagrophytes* URM6272; *T.t.* URM 4288 – *T. tonsurans* URM4288; *M.c.* URM 6969 – *Microsporum canis* URM6969; *E.f.* URM 6209 – *Epidermophyton floccosum* URM 6209; CIM – Concentração Inibitória Mínima; CFM – Concentração Fungicida Mínima; $\mu\text{g/mL}$ – micrograma por mililitro; Cet – antifúngico Cetoconazol (controle)

Fonte: Dados do autor (2023).

A CIM média dos extratos brutos em acetato de etila foi comparativamente menor frente às linhagens de *M. canis* e *E. floccosum*, no entanto, alguns deles demonstraram ação antifúngica contra os quatro dermatófitos.

Savarirajan *et al.* (2021) afirmam que as infecções fúngicas podem ser difíceis de tratar em humanos, devido às semelhanças que os patógenos fúngicos compartilham com suas células hospedeiras, tornando mais desafiador o desenvolvimento de novos antifúngicos pela indústria farmacêutica. Nesta perspectiva, Deshmukh *et al.* (2018) citam compostos cujas ações se estendem a dermatófitos, a exemplo de griseofulvina, isolada do fungo *Xylaria sp.*, com ação em infecções dermatofíticas causadas por espécies de *Trichophyton* e *Epidermophyton*.

Kumari *et al.* (2021) trabalharam com extratos brutos e fracionados de um fungo endofítico, o *Penicillium citrinum*, isolado da planta medicinal *Azadirachta indica* (amargosa, nim), da família Meliaceae. Extratos foram testados contra os patógenos fúngicos *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* e *Microsporum gypseum*. A atividade antifúngica, devido à metodologia utilizada, foi medida pela observação das zonas de inibição frente aos patógenos.

Em outro trabalho, a partir de endofíticos isolados dessa mesma planta, Verma *et al.* (2008) isolaram seis fungos endofíticos, cujos extratos foram testados contra dermatófitos dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* pela metodologia de microdiluição em caldo, encontrando resultados de CIM que variaram de 125-400 µg/mL para *Trichophyton* e 200-350 µg/mL para *Microsporum*, enquanto a CFM variou de 230 a 425 µg/mL. Os autores afirmam que os resultados de CIM e CFM variaram significativamente, demonstrando que o MIC não foi suficiente para medir a atividade fungicida; a CFM variou cerca de duas vezes o valor encontrado para o CIM. A atividade fungicida pode ser avaliada como um múltiplo dos valores de CIM. A afirmação desses autores corrobora com os valores de CIM e CFM sumarizados na tabela 7 do presente trabalho.

Extratos de acetato de etila de fungos endofíticos isolados de *Abies numidica* (abeto da Argélia), da família Pinaceae, foram testados contra *C. albicans* e os dermatófitos *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *E. floccosum*. Os valores de CIM para os dermatófitos testados nesse estudo variaram entre 100 e 3.200 µg/mL (Sadрати *et al.*, 2023). Os valores de CIM e CFM encontrados neste trabalho podem ser considerados compatíveis com os resultados presentes na literatura para potencial atividade antifúngica dos extratos testados.

4.6 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS

4.6.1 Identificação Morfológica dos Isolados Endofíticos

Devido ao grande número de isolados e à complexidade da identificação, foram priorizados os isolados que apresentaram potencial atividade antimicrobiana nas etapas de triagem para os estudos adicionais com base nesses resultados preliminares, tendo sido realizadas análises morfológicas de 31 fungos.

A tabela 8 apresenta as associações entre os isolados endofíticos e os gêneros fúngicos. As imagens associadas a alguns dos gêneros podem ser visualizadas na figura 33. Determinadas associações foram confirmadas pela identificação molecular, outras seguem aguardando resultados.

Tabela 8: Identificação morfológica de fungos endofíticos isolados da espécie *Lippia origanoides* com atividades antimicrobianas.

Nº	Isolados endofíticos Código	Identificação morfológica
	Caule/EMA	
1	LO – C 1.1	<i>Diaporthe</i> sp.
2	LO – C 1.2	<i>Pestalotiopsis</i> sp
3	LO – C1.3	<i>Alternaria alternata</i> species complex.
4	LO – C3.1	<i>Alternaria alternata</i> species complex
5	LO – C3.2	<i>Alternaria</i> sp.
6	LO – C4.1	<i>Drechslera</i> sp.
7	1LO – C2.1	<i>Fusarium</i> sp.
8	2LO – C3.2	<i>Alternaria citri</i>
9	3LO – C3.3	<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>
	Caule/BDA	
10	1LO – C3.1	<i>Phoma</i> -like
11	1LO – C3.2	<i>Fusarium</i> sp.
12	2LO – C1.1	Ascomiceto
13	2LO – C1.3	Ascomiceto
14	2LO – C3.4	<i>Mycelia sterilia</i>
15	3LO – C1.1	Ascomiceto
16	3LO – C2.1	<i>Penicillium</i> spp.
17	3LO – C2.2	<i>Myrmecridium</i> sp
18	3LO – C2.3	Ascomiceto com anamorfo <i>Phoma</i> -like
19	3LO – C3.2	<i>Mycelia sterilia</i>
20	3LO – C3.3	<i>Phoma</i> -like
	Folha/BDA	
21	1LO – F1.1	<i>Mycelia sterilia</i>
22	1LO – F2.1	Ascomiceto
23	1LO – F3.1	<i>Colletotrichum</i> sp
24	2LO – F1.2	<i>Phomopsis</i> sp
25	2LO – F2.1	<i>Mycelia sterilia</i>
26	2LO – F2.3	<i>Mycelia sterilia</i>
27	2LO – F3.1	<i>Penicillium</i> spp
28	2LO – F3.2	<i>Alternaria</i> sp.
29	3LO – F2.1	<i>Mycelia sterilia</i>
30	3LO – F3.1	<i>Colletotrichum</i> sp
31	3LO – F3.3	<i>Drechslera</i> sp.

Fonte: Dados do autor (2023).

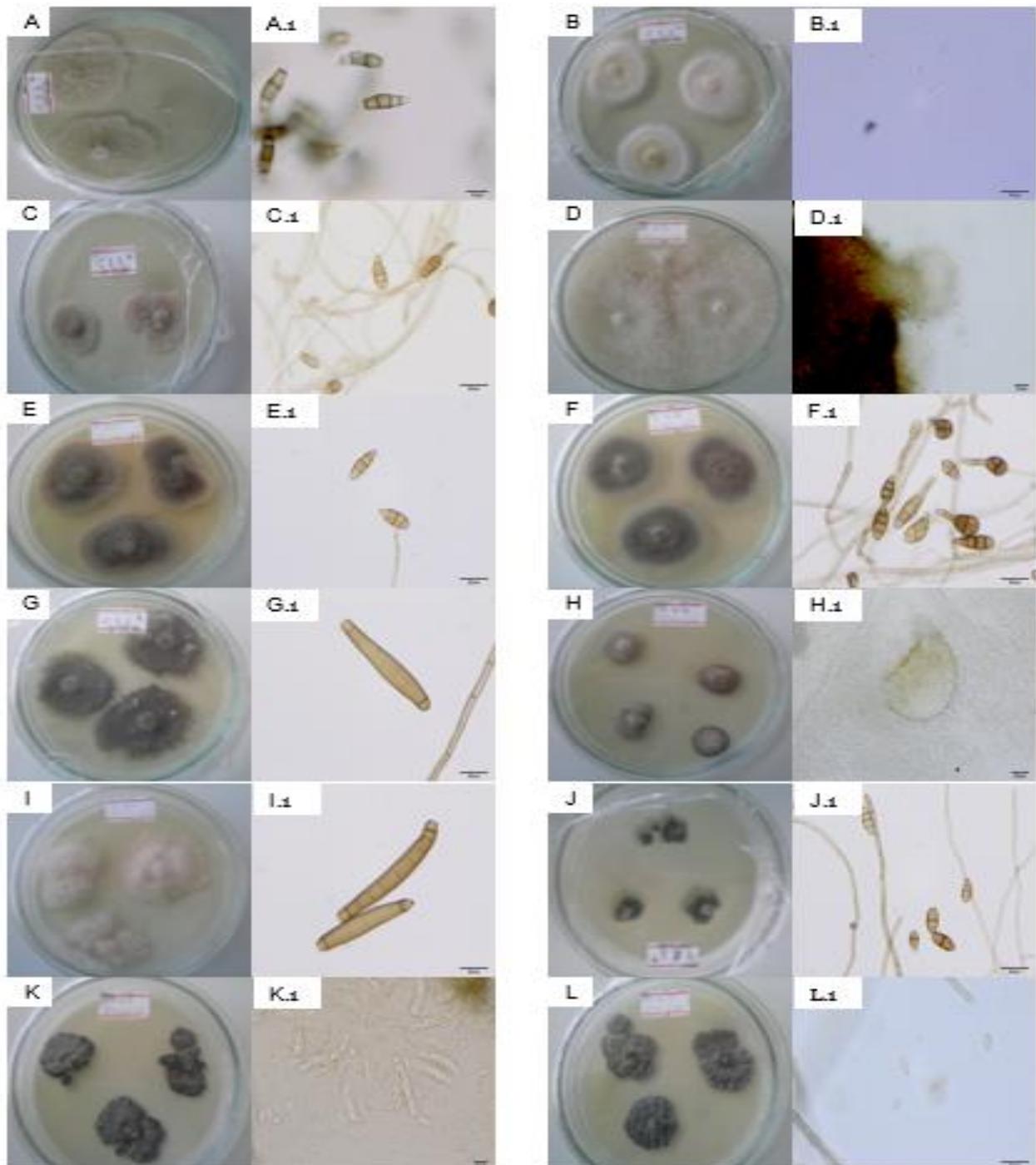


Figura 33: Fungos endofíticos isolados de *Lippia origanoides* identificados morfologicamente, morfologia das colônias e conídios: LO C1.1 EM – *Diaporthe* sp. (A e A₁); LO C1.2 EM – *Pestalotiopsis* sp (B e B₁); LO C1.3 EM – *Alternaria* sp.(C e C₁); LO C2.1 EM – *Phoma*-like (D e D₁); LO C3.1 EM – *Alternaria* sp. (E e E₁); LO C3.2 EM – *Alternaria* sp.(F e F₁); LO C4.1 EM – *Drechslera* sp.(G e G₁); 1LO C3.1 BDA – *Phoma*-like (H e H₁); 1LO C3.2 BDA – *Fusarium* sp.(I e I₁); 3LO – C2.3 BDA – 3LO C2.2 BDA – *Myrmecridium* sp (J e J₁); 3LO C2.2 BDA – Ascomiceto com anamorfo *Phoma*-like (K e K₁); 3LO C3.3 BDA – *Phoma*-like (detalhes em microscopia ótica, 400 a 1000x).

Fonte: Arquivos do autor (2023)

Algumas percepções acerca dos dados de macro e micromorfologia das colônias que foram considerados significativos para a associação das características das hifas e conídios observados ao gênero fúngico seguem descritas abaixo:

- LO C 1.3 EMA, LO C 3.1 EMA e LO C 3.2 EMA – Três isolados foram identificados como pertencentes a *Alternaria alternata species complex* por apresentarem colônias em cultura acinzentadas, tornando-se escuras, cinza escuro com borda clara. Planas, felpudas a lanosas com hifas aéreas curtas acinzentadas. Conidióforos simples, flexuosos, septados, marrom claro, largura: 15-26 μm . Conídios solitários ou em cadeias curtas de até 2 a 3 conídios, obclavados a ovais, rostrados, lisos a verruculosos, compreendendo 1 a 7 septos transversais, 6 –24 μm x 4 –13 μm (Figura 34).



Figura 34: Conídios solitários flexuosos, septados, marrom claro, largura: 15-26 μm . característicos de *Alternaria alternata species complex*. À esquerda da imagem, conídio do isolado LO C 1.3 EMA e, à direita, isolado LO C 3.2 EMA.

Fonte: Arquivos do autor (2023).

- 1 LOC 2.1 EMA – provável *Fusarium oxysporum complex*. Apresenta micélio aéreo branco, tornando-se rosa a roxo claro após 30 dias. Os conidióforos são monofiálides laterais curtos e solitários inicialmente, posteriormente organizados em aglomerados densamente ramificados. Macroconídios fusiformes, ligeiramente curvados, pontiagudos na ponta, principalmente trisseptados, células basais pediceladas, 23-54 x 3-4,5 μm . Microconídios são abundantes, nunca em cadeias, principalmente não septados, elipsoidais a cilíndricos, retos ou frequentemente curvos, 5-12 x 2,3-3,5 μm . Clamidósporos não observados nas hifas. Após 40 dias de crescimento em cultura, foi possível observar início de

formação clamidósporos nos extremos de alguns macroconídios, assim como a germinação lateral dos mesmos (Figura 35).



Figura 35: Macroconídios fusiformes, ligeiramente curvados, pontiagudos na ponta, principalmente três septados, células basais pediceladas característicos do gênero *Fusarium spp.*

Fonte: Arquivos do autor (2023).

- 2 LO C 3.2 EMA – *Alternaria citri*. Colônias em cultura branco acinzentado, tornando-se escuras, cinza escuro com borda clara. Planas, felpudas a lanosas com hifas aéreas curtas acinzentadas. Conidióforos simples, flexuosos, septados, marrom claro, largura: 3–5 μm . Conídios solitários ou em cadeias curtas de até 3, obclavados a ovais, rostrados, lisos a verruculosos, com até 8 septos transversais, e 1-2 (até 3) septos longitudinais. 6–24 (av. 17) μm x 2,5–6 μm . Identificação preliminar: *Alternaria citri*, pelas rugosidades e tamanho do conídio.
- 3 LOC 3.3 EMA *Aspergillus section Flavi cf.* – apresentando colônias granulares, planas, amarelas no início, mas rapidamente tornando-se amarelo mais escuro com a idade. Fiálides suportadas diretamente na vesícula (uniseriadas). Os estipes dos conidióforos são hialinos e ligeiramente rugosos, mais perceptíveis perto da vesícula e com aumentos de 100x. Os conídios são globosos a subglobosos (3-6 μm de diâmetro), amarelo claros a brilhantes (Figura 36).



Figura 36: Fiálides suportadas diretamente na vesícula, conídios globosos, amarelo claros a brilhantes, característicos do gênero *Aspergillus*.
Fonte: Arquivos do autor (2023).

4.6.2 Identificação Molecular dos Isolados Endofíticos

A identificação por análises moleculares foi finalizada para três isolados – LO C1.3, 3.1 e 4.1 EMA, permitindo resultados concordantes para as sequências gênicas nrITS e nrLSU analisadas, resultando em um clado adequadamente suportado, na família *Pleosporaceae*, ordem *Pleosporales* (Figura 34). Os demais isolados seguem sob análise.

Dois isolados – LO C1.3 e C3.1 EMA – foram identificados pelas características morfológicas como fungos da espécie *Alternaria alternata*, o que foi reforçado pelas sequências moleculares analisadas, que forneceram uma similaridade de sequência de 99% àquelas acessíveis no BLAST (Quadro 6).

Um deles, LO C4.1 EMA, foi classificado em nível de gênero, comprovando as análises morfológicas que o classificaram como representante do gênero *Drechslera* sp., no entanto, o nível de similaridade das sequências encontradas não chegou à identificação da espécie.

Quadro 6: Dados de acesso e número do *Genbank* utilizados para comparação das sequências ITS e LSU.

Espécies	Número de acesso	Número do <i>Genbank</i>	
		ITS	LSU
<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	MFLUCC 17-1230	/	MG818327_1
<i>Alternaria</i> sp1 C1 3	C1.3	2A1R8T4N013	2A2JNXWX016
<i>Alternaria</i> sp 2 C3 1	C3.1	2A2EN46Y013	2A2UV7RP016
<i>Drechslera</i> sp C4 1	C4.1	2A2X0DKD016	2A3EKDZK013
<i>Drechslera andersenii</i> A. Lam	CBS 967.87	AY004805	JN940084_1
<i>D. brizae</i> (Y. Nisik.) Subram. & B.L. Jain	CBS 190.29	NR 153992 1	NG_059122_1
<i>D. erythrospila</i> (Drechsler) Shoemaker	CHTAE7	JF773591 1	JF773591_1
<i>D. phlei</i> (J.H. Graham) Shoemaker	CBS 315.69	AY004807 1	JN940077_1
<i>Phaeosphaeriopsis musae</i>	A2S2-7	KJ780762	DQ885894 1
<i>Roussoella pseudohysterioides</i> D.Q. Dai & K.D.	MFLU 15-1209	NR 155723 1	NG 059672 1
<i>R. tuberculata</i> D.Q. Dai & K.D.	MFLU 15-1211	NR 155724 1	NG 059673 1
<i>Sporidesmium pyriformatum</i> Jiao Yang & K.D. Hyde	MFLU 15-1155	NR 154440 1	NG 059722 1

Fonte: Dados do autor (2022).

A figura 37 mostra a árvore filogenética de máxima verossimilhança obtida usando RaxML servidor CIPRES, baseado em sequência nrITS e nrLSU obtidas para os isolados identificados. Os isolados *A. alternata* LO C 1.3 e C 3.1 EMA estão no mesmo clado e não existe ramo para diferenciá-los.

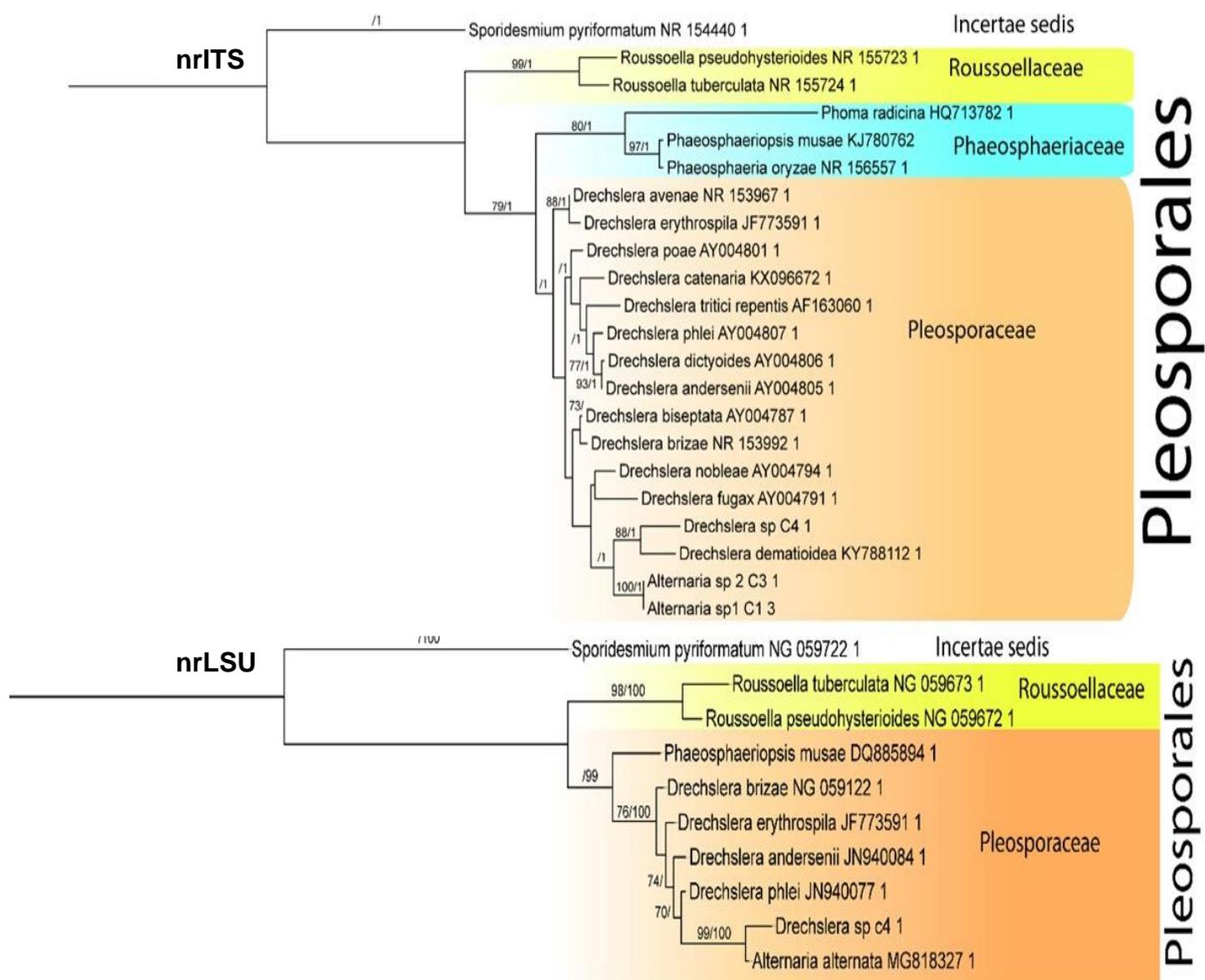


Figura 37: Árvore filogenética de máxima verossimilhança obtida usando RaxML no servidor CIPRES baseado em seqüências do espaçador transcrito interno ribossômico nuclear (nrITS) (acima) e seqüências do gene da subunidade maior ribossômica nuclear (nrLSU) (abaixo). Números acima dos ramos indicam o valor de *bootstrap* $\geq 70\%$ e valores de probabilidade posterior na análise Bayesiana iguais ou superiores a 0,95, respectivamente.

Fonte: Arquivos do autor (2022).

4.7 TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A capacidade antioxidante dos extratos, analisada pela solução do composto DPPH, sugere que a maioria dos extratos brutos que apresentaram atividade antimicrobiana resultaram-se também positivas para atividade antioxidante. As exceções foram os extratos em meio BDA 2LO – C1.1 (nº 12) e 1LO – F2.1 (nº 23), que não demonstraram atividade antimicrobiana nas condições testadas, no entanto, apresentaram resultado positivo para a atividade antioxidante.

A solução do DPPH apresenta coloração violeta. Devido à presença de compostos antioxidantes, que agem como doadores de um átomo de hidrogênio reduzindo o radical DPPH, a hidrazina é formada, propiciando assim a mudança de coloração para amarelo claro (Oliveira, 2015), como perceptível na figura 38.

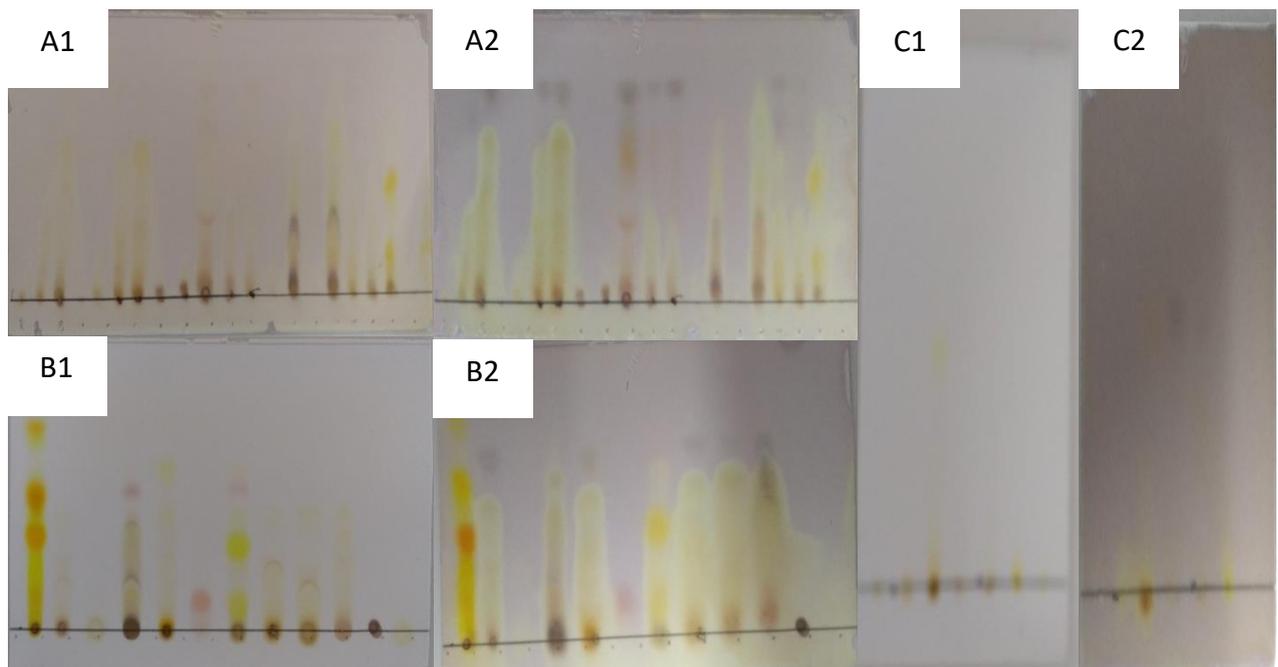


Figura 38: Placas de sílica gel contendo extratos eluidos (A1: Caule/BDA, B1: Folha/BDA e C1:Caule/EMA). E placas reveladas com solução de DPPH. (A2: Caule/BDA, B2: Folha/BDA e C2: Caule/EMA).

Fonte: Arquivos do autor (2022)

A produção de radicais livres (Espécies Reativas de Oxigênio; em inglês – *Reactive Oxygen Species*, sigla ROS) – tais como radical hidroxila, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical óxido nítrico, oxigênio singlete e radical hipoclorito – é

considerada um processo metabólico normal em todas as células. A capacidade de eliminá-los pode inibir ou retardar o dano celular, podendo ser obtida a partir da dieta ou mesmo de agentes exógenos. Devido à implicação de ROS na patogênese de diversas doenças crônicas, incluindo processos neoplásicos, a busca por produtos naturais com ação antioxidante que possam atuar na prevenção desses efeitos tem se mostrado necessária. Compostos antioxidantes naturais desempenham um papel significativo na redução do estresse ou dano oxidativo, bem como, potencializam as funções imunológicas através da inibição de doenças, eliminando radicais livres (Tan et al. 2018). A produção de metabólitos secundários capazes de apresentar atividade antioxidante por fungos endofíticos tem sido relatada na literatura.

Em estudo sobre a diversidade e atividades biológicas da comunidade fúngica endofítica da planta *Distylium chinense*, Duan et al. (2019), avaliaram atividades antioxidantes e outras atividades bioativas de 154 fungos endofíticos, desses, 99 (64,3%) apresentaram atividade antioxidante significativa. Praptiwi et al. (2019) avaliaram atividades antibacteriana e antioxidante de 40 fungos endofíticos isolados de 10 espécies de plantas medicinais pertencentes às famílias Urticaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Zingiberaceae, Piperaceae, Lamiaceae e Verbenaceae coletadas em Palolo, na Indonésia. Dentre os extratos analisados, 23 tiveram avaliação positiva da atividade antioxidante.

Ibrahim et al. (2021) avaliaram a atividade antioxidante de fungos endofíticos de oito plantas etnomedicinais nigerianas (*Acalypha ornata*, *Albizia zygia*, *Alchornea cordifolia*, *Chrysophyllum albidum*, *Ficus exasperata*, *Gomphrena celosioides*, *Millettia thonningii* e *Newbouldia laevis*). Dezoito extratos brutos dos fungos endofíticos isolados das folhas dessas espécies vegetais foram selecionados quanto à atividade antioxidante usando eliminação e redução do radical 2, 2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) de ensaios de íon férrico. Os autores afirmam que os resultados sugerem que substâncias produzidas por estes isolados podem ser uma fonte potencial de compostos bioativos usados no desenvolvimento de drogas antioxidantes.

4.8 PERFIL FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Os perfis fitoquímicos de 31 extratos brutos dos isolados endofíticos triados para atividades antimicrobianas e antioxidantes foram avaliados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). Os resultados, no sistema de solventes hexano:acetona, demonstraram a detecção de terpenos e esteróides em todos os extratos brutos t estados; compostos fenólicos detectados em 29; e cumarinas presentes em apenas 05 extratos. Alcalóides não foram detectados em nenhum dos extratos (Tabela 9).

A composição química dos extratos fúngicos é decorrente do metabolismo secundário destes micro-organismos, contendo as moléculas responsáveis pela atividade biológica apresentada por estes. Os produtos naturais extraídos de fungos endofíticos apresentam amplo espectro de atividade biológica e podem ser agrupados em várias categorias, dentre elas alcaloides, esteroides, terpenoides, isocumarinas, quinonas, fenilpropanoides e lignanas, fenol e ácidos fenólicos, compostos alifáticos, flavonóides, lactonas, peptídeos entre outros (Zhang *et al.*, 2006).

Tabela 9: Perfil Fitoquímico Por Cromatografia Em Camada Delgada (CCD) de 30 extratos brutos em acetato de etila, obtidos – de fungos endofíticos isolados de *Lippia organoides*.

Extratos LO (AcEt)		Terpenos e Esteroides	Compostos Fenólicos	Cumarinas	Alcalóides
Folha		+	+	–	–
Caule		+	+	–	–
Isolados endofíticos					
Nº	Código				
Caule/EMA					
1	LO – C 1.1	+	+	–	–
2	LO – C 1.2	+	+	–	–
3	LO – C1.3	+	+	+	–
4	LO – C3.1	+	+	+	–
5	LO – C3.2	+	+	+	–
6	LO – C4.1	+	–	–	–
7	1LO – C2.1	+	+	–	–
8	2LO – C3.2	+	+	+	–
9	3LO – C3.3	+	+	–	–
Caule/BDA					
10	1LO – C3.1	+	+	+	–
11	1LO – C3.2	+	+	–	–
12	2LO – C1.1	+	+	–	–
13	2LO – C1.3	+	+	–	–
14	2LO – C3.4	+	+	–	–
15	3LO – C1.1	+	+	–	–

16	3LO – C2.1	+	+	–	–
17	3LO – C2.2	+	+	–	–
18	3LO – C2.3	+	+	–	–
19	3LO – C3.2	+	+	–	–
20	3LO – C3.3	+	+	+	–
	Folha/BDA				
21	1LO – F1.1	+	+	–	–
22	1LO – F2.1	+	+	–	–
23	1LO – F3.1	+	+	–	–
24	2LO – F1.2	+	+	–	–
25	2LO – F2.1	+	+	–	–
26	2LO – F2.3	+	+	–	–
27	2LO – F3.1	+	+	–	–
28	2LO – F3.2	+	+	+	–
29	3LO – F2.1	+	+	–	–
30	3LO – F3.1	+	+	–	–
31	3 LO – F3.3	+	–	–	–

Fonte: Dados do autor (2022).

A escolha dos solventes é fundamental para obtenção da separação dos compostos numa corrida cromatográfica, especialmente em se tratando de misturas heterogêneas e de composição desconhecida, como é o caso dos extratos metabólicos de micro-organismos e de plantas. O processo inicial à corrida cromatográfica consiste na solubilização da substância química, o que resulta da sua interação com o solvente, uma vez que a solubilidade de uma substância orgânica está diretamente relacionada à sua estrutura molecular. Compostos apolares ou fracamente polares são solúveis em solventes apolares ou de baixa polaridade, enquanto que compostos de alta polaridade são solúveis em solventes também polares (Salem, 2020).

As classes de metabólitos detectadas através dessa metodologia nos extratos fúngicos testados estão apresentadas de acordo com o revelador.

O Revelador Anisaldeído Ácido Sulfúrico (AS) é usado para revelar saponinas, terpenos, esteroides e propilpropanoides, cujas zonas podem variar de alaranjadas a tonalidades amarelo-amarronzadas, enquanto manchas rosas podem indicar presença de esteroides e triterpenos. Em luz visível, placa revelada com o AS demonstra a presença de compostos na tonalidade amarela a marrom, as quais são intensificadas pela visualização em luz UV (365 nm). Em placas de sílica pulverizadas com o revelador anisaldeído-ácido sulfúrico, as bandas com manchas rosas, azuis, lilases e roxas indicam a presença de esteroides e terpenos, como apresentado na figura 39. Todos os extratos apresentaram presença de terpenos e esteroides,

evidenciados pelas colorações róseas, roxas e amareladas (em luz visível) e fluorescência amarelada e azulada (UV 365 nm).

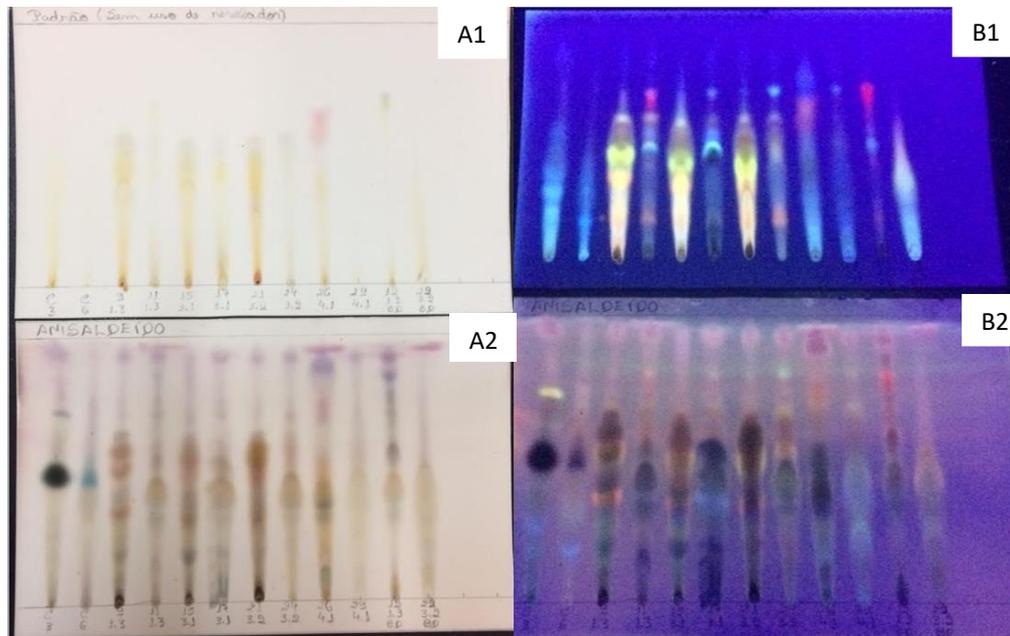


Figura 39: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placa padrão (A1 e B1) e revelada com Reagente Anisalaldeído Ácido Sulfúrico (AS) (A2 e B2), em luz visível (A1 e A2) e em UV (365 nm) (B1 e B2).

Fonte: Arquivos do autor (2023).

A presença de compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) é evidenciada com a pulverização da solução reveladora de NP-PEG nas placas eluidas com os extratos, sendo indicada pela presença de fluorescência amarelo/laranja/azul sob a luz UV-365 nm. O Revelador NP (Difenilboriloxietilamina) é utilizado na revelação de substâncias fenólicas, reagindo com estes e formando complexos derivados fluorescentes; enquanto o Polietilenoglicol (PEG) é usado como intensificador de fluorescência. Zonas amarelo-intensas/ laranjas revelam flavonoides, em zonas azul-verde, sobre luz ultravioleta de comprimento de onda de 365 nm, as cumarinas (Rodrigues *et al.*, 2009).

Na faixa de comprimento de ondas entre 254 e 366 nm, a cor azul sugere presença de ácidos carboxílicos, compostos fenólicos e cumarinas; cor azul-esverdeada, presença de cumarinas; cor esverdeada, presença de taninos complexos; laranja, presença de flavona e flavonol; verde-escuro, de glicosídeos de

flavonas; alaranjada ou amarela, de glicosídeos de flavonol, quercetina; vermelho-alaranjado, presença de quercetina, flavonoides (Rojas; Ojeda., 2009). A presença de compostos fenólicos foi detectada em 29 extratos, com exceção apenas dos isolados LO C4.1 EMA (nº 6) e 3 LO – F3.3 BDA (nº31). Também foram detectados nos extratos de folhas e caules de LO, pela presença de compostos fluorescentes no ponto de aplicação, após ser utilizado o revelador (Figura 40).

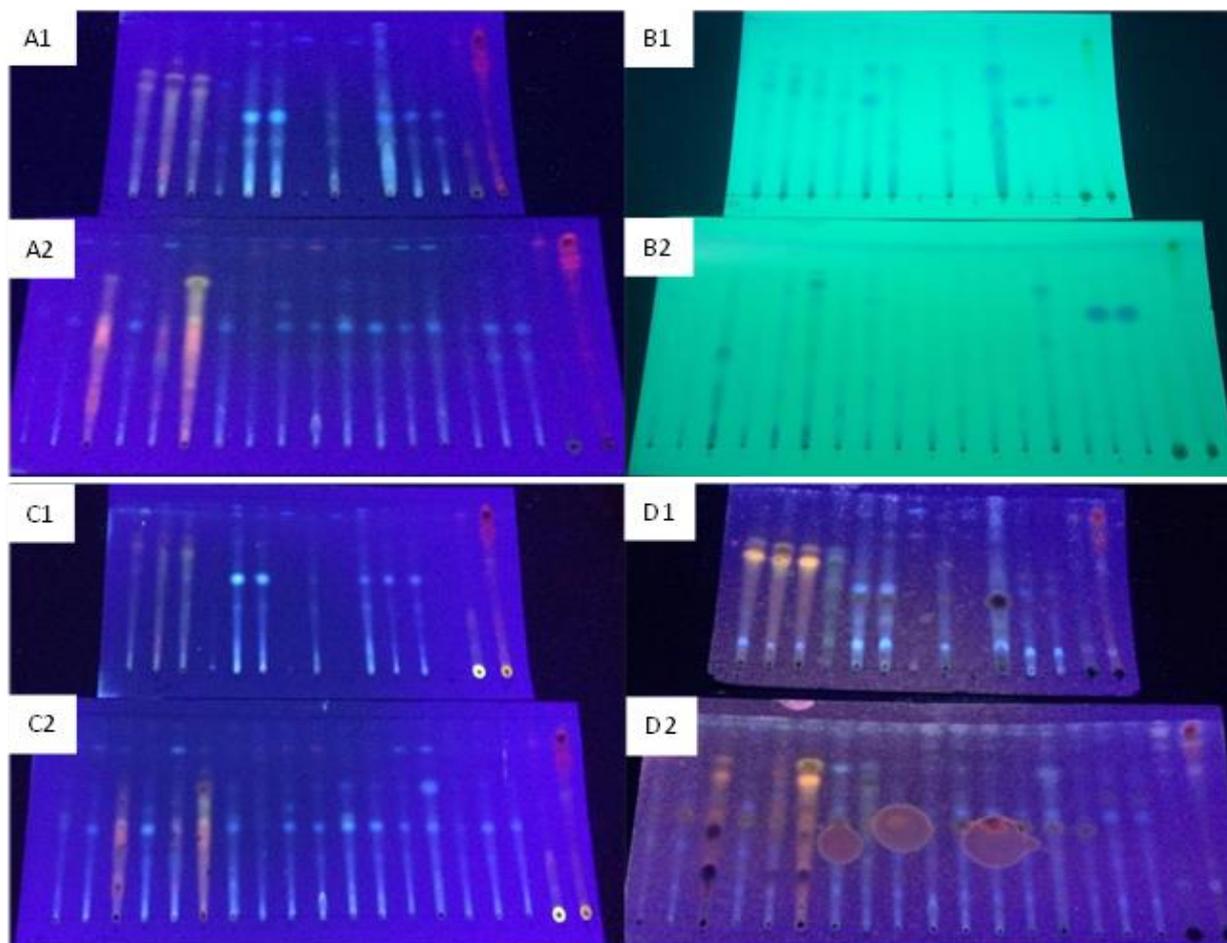


Figura 40: Cromatografia em Camada Delgada de extratos provenientes do cultivo em caldo Batata Dextrose (A1, B1, C1 e D1) e Caldo Extrato de Malte (A2, B2, C2 e D2), sendo mostradas nas imagens as placas: padrão, sem o uso de reveladores, em luz UV (365 nm) (A1 e A2) e em lâmpada germicida (B1 e B2); após a aplicação dos reveladores Reagente de Produtos Naturais (NP-PEG) (C1 e C2) e Anisaldeído Sulfúrico (AS) (D1 e D2), ambos em luz UV, na mesma faixa de absorbância (365 nm).

Fonte: Arquivos do autor (2023).

Pela revelação com solução reagente de KOH 5% é possível detectar compostos como cumarinas pela intensificação da fluorescência azul/verde em luz UV-365 nm. O revelador Hidróxido de Potássio (KOH), aplicado sobre a placa cromatográfica após a eluição permite a detecção dos seguintes compostos quando observadas em UV

(365 nm): zonas vermelhas que emitem fluorescência revelam antraquinonas; zonas azuis fluorescentes brilhantes revelam cumarinas; zonas verdes-azuladas, amarelas a marrons demonstram furanos e piranocumarinas (Maciel *et al.*, 2006). As cumarinas normalmente se apresentam como uma mancha azul ou verde brilhante sob luz UV-365 nm, foram observadas nos isolados em meio EMA – LO C1.3 (nº 3), LO C3.1 (nº 4), LO C3.2 (nº 5), 2LO – C3.2 EMA (nº8); e os isolados em meio BDA 1LO – C3.1 (nº10), 3LO – C3.3 BDA (nº 20) e 2LO – F3.2 (nº28) (figura 41).

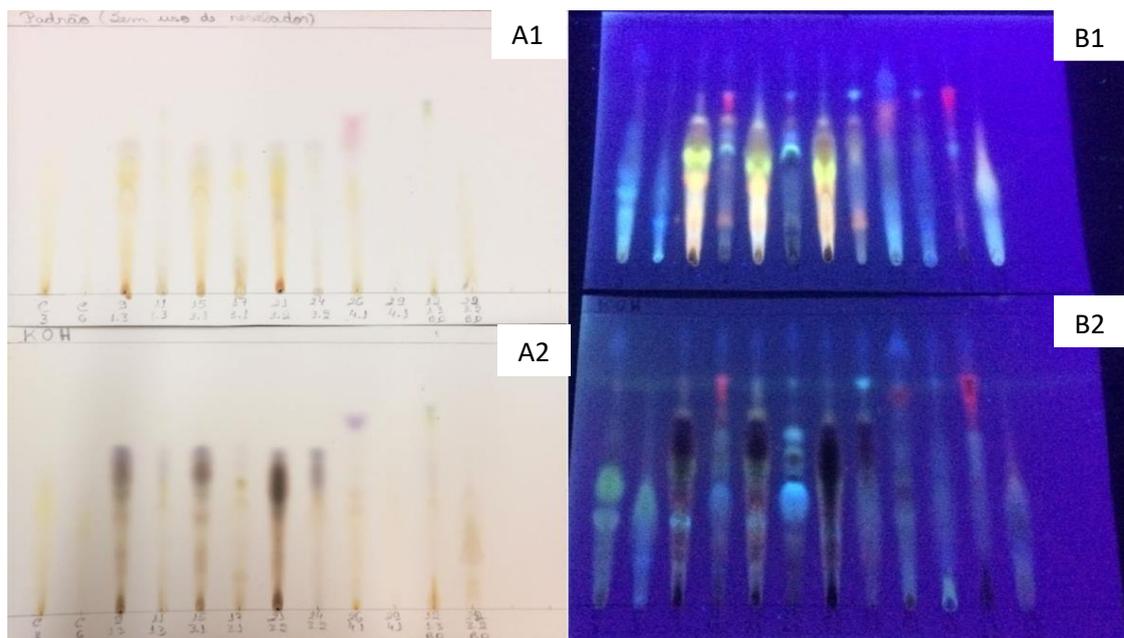


Figura 41: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placa padrão (A1 e B1) e revelada com Reagente Hidróxido de Potássio (KOH) (A2 e B2), em luz visível (A1 e A2) e em UV (365 nm) (B1 e B2).
Fonte: Arquivos do autor (2023).

O reagente de Dragendorff (DRG) é usado na detecção de alcaloides, compostos azotados heterocíclicos e aminas terciárias numa determinada amostra. Na presença destes compostos, dá-se a formação de precipitados alaranjados, cuja cor varia de acordo com o tipo de composto (desde amarelo a vermelho acastanhado), sendo a detecção feita por simples adição do reagente à amostra. Em condições ácidas, as aminas terciárias ficam no seu estado protonado e a adição do reagente leva à formação de um precipitado corado, no entanto, caso as concentrações de aminas terciárias e quaternárias seja muito baixa, não se observa a formação do precipitado, podendo interferir na interpretação do resultado (Rodrigues *et al.*, 2009; Collins *et al.*, 2006).

Zonas vermelhas a marrons demonstram alcaloides, cuja coloração pode ser instável, contudo, a observação da placa cromatográfica após a revelação com o DRG não evidencia tal faixa de coloração (Figura 42).

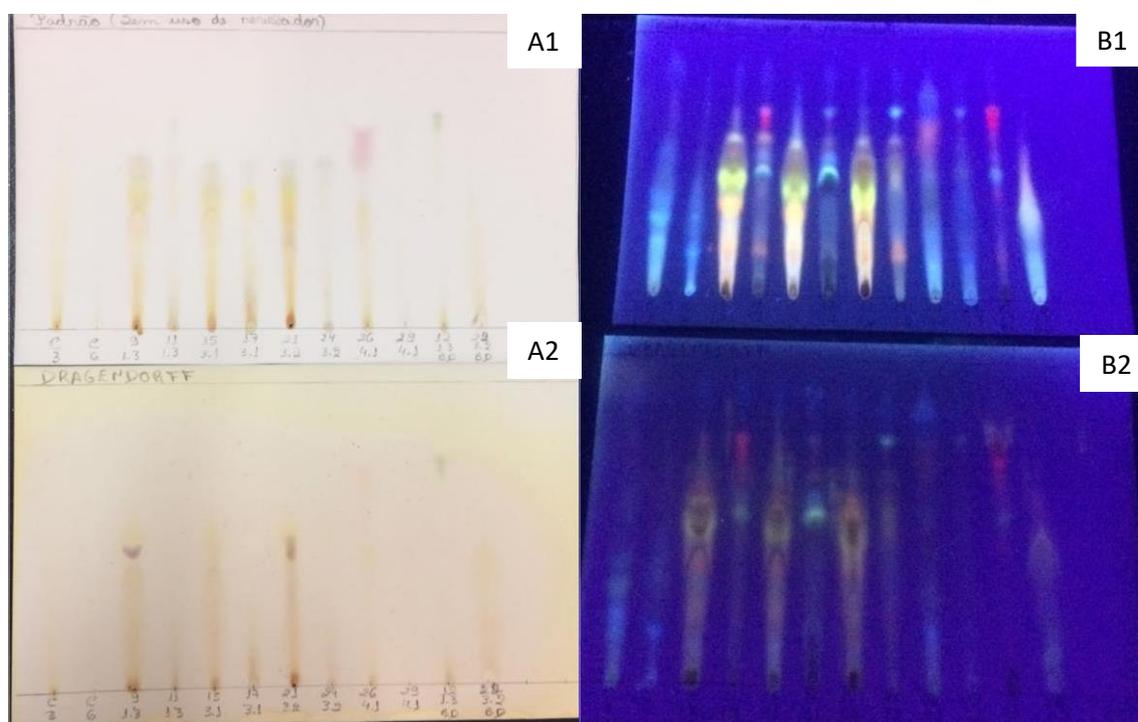


Figura 42: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em placa padrão (A1 e B1) e revelada com Reagente Dragendorff (A2 e B2), em luz visível (A1 e A2) e em UV (365 nm) (B1 e B2).

Fonte: Arquivos do autor (2023)

Alguns fungos apresentaram semelhança no perfil cromatográfico e nos testes de triagem da antioxidante e antimicrobiana, sugerindo produzir perfis fitoquímicos. O mesmo ocorre em relação aos extratos de folhas e caules do material vegetal, este também positivo para terpeno, esteroides e compostos fenólicos. Apesar das diferenças entre as metodologias, os resultados estão de acordo com as análises realizadas por CG-MS (seção 4.3), na qual foram relatados os constituintes majoritários no óleo essencial do material vegetal *L. origanoides* coletado, representante do quimiotipo B, como os compostos terpenoides: carvacrol (monoterpenóide fenólico), p-cimeno (monoterpeno monocíclico), γ -terpineno (monoterpeno) e e-cariofileno (sesquiterpeno).

De modo geral, os perfis fitoquímicos obtidos por CCD permitem inferir a presença de compostos fenólicos, terpenos e esteroides e, em alguns extratos, também cumarinas. Será necessária a análise dos extratos dos isolados por outros métodos analíticos e isolamento dos metabólitos para a elucidação dos mesmos.

4.9 ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

A quantidade de extrato obtida a partir das metodologias de cultivo adotadas revelou-se um fator limitante para as análises dos extratos por metodologias que exigissem grande quantidade de massa. Dessa forma, as análises quimiométricas foram empregadas com o objetivo de identificar semelhanças e diferenças entre os extratos, agrupando-os e permitindo elucidar suas classificações.

4.9.1 Avaliação da análise multivariada

Neste trabalho, foi desenvolvida uma matriz quimiométrica de alta complexidade, composta por 25 cromatogramas (combinação ESI- e ESI+) representando os cinco grupos amostrais distintos x 22.061 pares tR-m/z para os extratos dos isolados em meio EMA – C 1.3 (nº), C3.1 (nº 4), C3.2 (nº 5) e C 4.1 (nº 6) analisados, sendo cinco cromatogramas por extrato. Assim, a análise multivariada foi utilizada para avaliar a complexa matriz de dados, a fim de determinar variações e relações entre os grupos amostrais. A análise multivariada não supervisionada tem a vantagem de reduzir a complexidade do conjunto de dados sem prejudicar as informações nele contidas (Guedes *et al.*, 2018). Por meio da análise não supervisionada de PCA (análise de componentes principais) e HCA (análise de cluster hierárquica) foi possível avaliar as paridades e disparidades entre os grupos amostrais.

4.9.2 Quimiometria não supervisionada

De maneira geral, por meio do gráfico dos escores da PCA é possível observar uma variância explicada total (PC 1 x PC 2) de 20,7%. Na Figura 43(a) está ilustrado PC 1 x PC 2, onde é possível verificar que não há uma distinção clara e completa entre os cinco grupos de amostras avaliadas.

No entanto, algumas observações e conclusões podem ser inferidas da PCA

através do gráfico de escores representado na Figura 43. De modo geral, podemos observar a formação de três aglomerados de amostras, mostrando assim que existem diferenças químicas entre os três aglomerados formados, representando as amostras: os isolados A – LO C 1.3 (nº 3), B – LO C 3.1 (nº 4) e C – LO C 3.2 (nº 5), em um mesmo *cluster*; D – LO C 4.1 (nº 6) – em *cluster* distinto; e CT – representando as amostras controle (CT), em outro *cluster*.

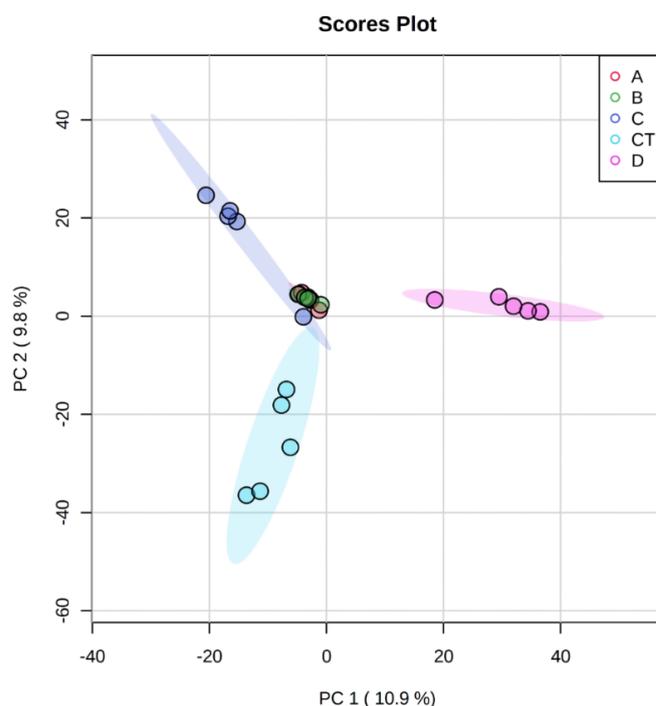


Figura 43: Análise de componentes principais (PCA), gráficos de pontuação PC 1 vs PC 2.
Fonte: Dados do autor (2023).

O *cluster* observado no PC 2 negativo reúne as amostras que correspondem ao grupo controle (CT), que contém apenas o meio de cultura necessário para o cultivo de micro-organismos. Apresentando o resultado esperado de que esse conjunto de amostras fosse quimicamente diferente dos demais grupos de amostras avaliados.

O *cluster* formado pelas amostras que compõem o grupo D corrobora a evidência de que este grupo de amostras se distingue dos demais grupos estudados neste trabalho. As análises de identificação obtidas nos mostraram que as amostras que compõem o grupo D são um fungo do gênero *Drechslera* spp., o isolado LO C 4.1 EMA (nº 6).

Por fim, podemos observar um único *cluster*, positivo para PC 2 e negativo para PC 1, composto por amostras que representam os grupos A, B e C. Com isso, em geral, podemos inferir que os três grupos de amostras apresentam muitas semelhanças químicas. Este fato corrobora com dados experimentais que revelaram que os micro-organismos isolados dos três diferentes organismos biológicos A e B são isolados da mesma espécie, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl (1912), correspondendo aos isolados LO C 1.3 EMA (nº3) e LO C3.1 EMA(nº4). Dessa forma, podemos verificar que existe uma uniformidade entre as amostras dos grupos A e B, fato não observado nas amostras que correspondem ao grupo C, correspondente ao isolado LO C 3.2 EMA (nº4), visto que é possível observar uma pequena dispersão do grupo, que é causada por uma única amostra em comparação com as outras.

O HCA, bem como o PCA, forneceu uma análise não supervisionada dos cinco grupos de amostras. Assim, o algoritmo de agrupamento euclidiano de distância e *ward* foi utilizado para construir um dendrograma, que classifica todas as amostras analisadas, concebendo agrupamentos com base em semelhanças e dissimilaridades, o que está representado na Figura 44.

À semelhança do que foi verificado e observado através do PCA, no HCA é possível verificar a grande similaridade química entre as amostras que compõem os grupos A e B e C. Assim, é importante mencionar que o ACS corrobora com as observações concebidas por meio do PCA. As amostras que representam os grupos A e B são misturadas, formando basicamente um único grupo que, juntamente com as amostras do grupo C, dão origem a um único *cluster*.

Além disso, por meio do HCA também podemos observar os dois grupos de amostras D e CT completamente diferentes dos demais grupos avaliados, o que corrobora a avaliação concebida por meio do PCA e os experimentos que foram responsáveis pela identificação dos micro-organismos característicos de cada grupo de amostra.

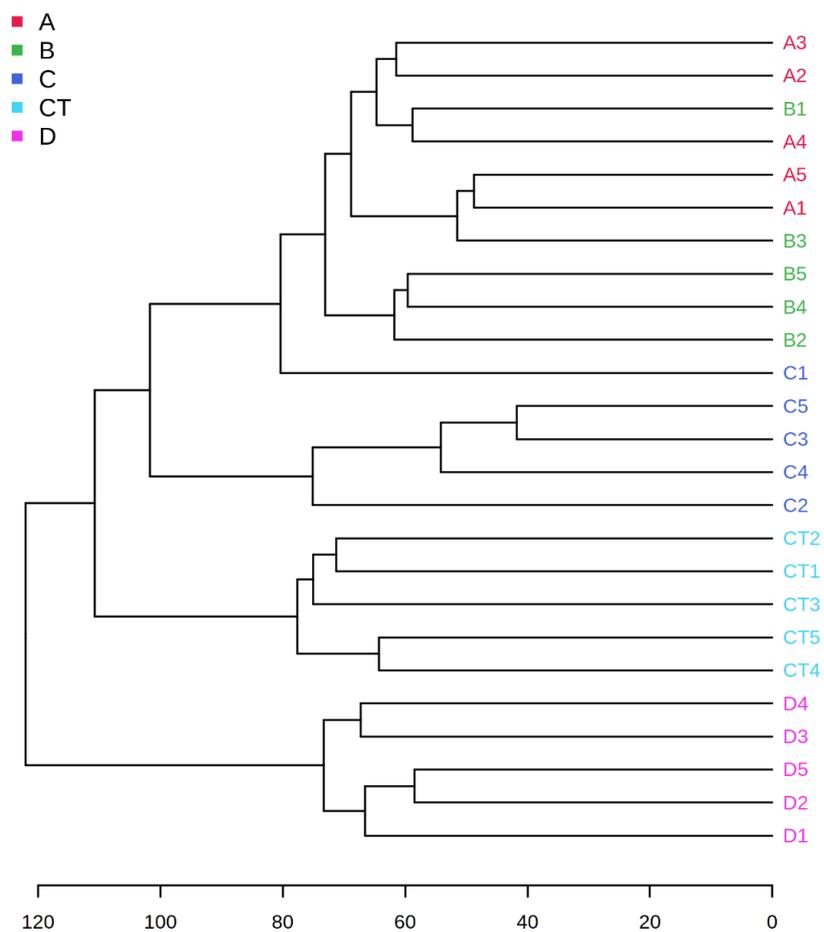


Figura 44: Dendrograma representando relações de similaridade de composição química entre diferentes grupos de amostras.

Fonte: Dados do autor (2023).

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi isolada a microbiota endofítica fúngica da espécie *Lippia origanoides* Kunth. Métodos analíticos foram empregado a fim de verificar a potencial produção de metabólitos secundários com atividades antimicrobianas por estes micro-organismos. Um total de 129 fungos foi isolado, sendo destes 46 (35,66%) a partir de folhas e 83 (64,34%) a partir de fragmentos dos caules, tendo sido encontrada correspondência na literatura para as taxas de colonização obtidas em duas coletas do material vegetal realizadas.

A composição química do óleo essencial dos organismos vegetais de *L. origanoides* Kunth foi analisada por cromatografia gasosa (CG-MS), resultando em seus compostos majoritários, dentre os quais, o carvacrol, um monoterpenoide fenólico, que resultou em percentuais entre 33,41 a 49,42%, permitindo a caracterização desses organismos como sendo representantes do quimiotipo B. Análises por cromatografia em camada delgada também permitiram a detecção da presença de compostos fenólicos nos extratos em acetato de etila obtidos a partir das folhas e caules da planta. Estes metabólitos estão associados na literatura às aplicações medicinais da planta, dentre elas atividades antimicrobianas.

Os fungos endofíticos isolados foram cultivados a partir de diversas metodologias, dentre estas, foi adotado para a escala ampliada o cultivo em meio sólido, por apresentar vantagens em relação ao meio líquido e ao meio fermentativo em arroz, também testados. No entanto, a metodologia exige a produção de grande quantidade de placas por isolado a fim de possibilitar um rendimento médio que possibilite a análise dos extratos a partir de metodologias cromatográficas.

Algumas metodologias de produção de extratos em escala ampliada, a exemplo do uso de biorreatores, têm sido utilizadas em alguns institutos de pesquisa e para a produção fermentativa em escala industrial com o objetivo de ampliação do rendimento dos extratos. No entanto, devido à indisponibilidade deste método, foi utilizado o cultivo clássico, em placas de Petri.

Os testes antimicrobianos realizados a partir dos extratos brutos em acetato de etila dos isolados fúngicos permitiram a triagem de 31 extratos com atividade antimicrobiana frente a um dos micro-organismos patogênicos testados. Na metodologia por microdiluição em caldo, considerando níveis de CIM $\leq 125 \mu\text{g/mL}$, 12

isolados inibiram o crescimento de ambas as cepas de *S. aureus* testadas (ATCC 43300 e CCMB 263), 16 apresentaram a mesma faixa de CIM frente à linhagem *C. albicans* CCMB 286; e 06 apresentaram essa concentração frente aos quatro dermatófitos testados.

Dentre os isolados, o 1LO – C3.1 BDA (*Phoma*-like), destacou-se por apresentar CIM $\leq 31,25$ $\mu\text{g/mL}$ frente à levedura *C. a.* CCMB 286 e a dois dermatófitos testados, o *T. tonsurans* URM 4288 e *E. floccosum* URM 6209. Este isolado apresentou atividade antioxidante nos testes de triagem, tendo sido detectados compostos fenólicos, terpenos e esteroides e cumarinas em seu perfil fitoquímico. Os isolados LO C 1.3 EMA (*Alternaria alternata* species complex) e LO C 3.2 EMA (*Alternaria* sp.) apresentaram CIM $\leq 15,625$ frente à cepa *S. aureus* CCMB 263, e ao dermatófito *M.canis* URM 6969, inibindo o crescimento de *E. floccosum* URM 6209 em CIM 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, tendo sido detectados compostos fenólicos, terpenos e esteroides e cumarinas em seu perfil fitoquímico, bem como atividade antioxidante positiva. Os resultados obtidos nos testes antimicrobianos permitem inferir a existência de moléculas bioativas nos metabólitos secundários desses isolados, classificando-os como promissores para a continuidade das análises.

Dos 31 fungos avaliados, 06 apresentaram micélio estéril (*mycelia sterilia*), prejudicando a identificação morfológica, enquanto 04 puderam ser classificados como representantes do filo Ascomycota. As análises das morfologias coloniais e dos esporos permitiram a identificação de 21 fungos em nível de gênero, três deles foram confirmados pela análise das regiões nrITS e nrLSU como *Alternaria alternata* (isolados LO C1.3 e LO C3.1 EMA) e *Drechslera* sp. (isolado LO C 4.1 EMA). Os demais fungos seguem sob análise para a identificação molecular.

Alguns estudos têm optado por metodologia de caracterização genética a partir da análise de sequências de DNA do *pool* microbiano (metagenômica), permitindo a classificação geral dos gêneros fúngicos presentes na amostra. Neste estudo, optou-se pela identificação individual dos fungos a partir da análise de regiões intergênicas, uma metodologia reconhecidamente mais lenta e trabalhosa, no entanto, que leva a resultados de identificação em nível de espécie de cada isolado individualmente.

As análises quimiométricas foram realizadas como uma metodologia alternativa para a análise dos grupos de compostos presentes nos extratos dos isolados. A metodologia apresentou como vantagem a utilização de poucos miligramas de massa;

entretanto, a interpretação dos resultados foi melhor obtida à luz de outras análises já realizadas. Dessa forma, apenas quatro dos isolados foram analisados a partir desse método.

Neste estudo de bioprospecção, os perfis fotoquímicos de 31 extratos produzidos por isolados fúngicos de *L. origanoides* Kunth foram analisados, em todos eles foram identificadas atividades antioxidantes e a presença de terpenos e esteroides, em 29 deles atividade antimicrobiana frente a um ou mais dos micro-organismos patogênicos testados, sugerindo a presença de moléculas bioativas nos metabólitos produzidos pelos isolados. Os perfis produzidos pelos extratos analisados também sugerem a possível presença de compostos semelhantes aos produzidos pelo organismo vegetal do qual foram isolados.

Como perspectivas para este estudo, podem ser apontadas: a continuidade da identificação dos isolados em nível de espécie e a produção de extratos em escala ampliada, a fim de possibilitar o fracionamento dos extratos e as análises por métodos que permitam a identificação dos metabólitos e a caracterização química das substâncias bioativas.

REFERÊNCIAS

- ABOOBAKER, Z. *et al.* Endophytic fungi isolated from *Pelargonium sidoides* DC: antimicrobial interaction and isolation of a bioactive compound. **South African Journal of Botany**, v. 122, p. 535-542, 2019.
- ADAMS, Robert P. *et al.* Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **Allured publishing corporation**, 2007.
- ADELEKE, Bartholomew Saanu; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Pharmacological potential of fungal endophytes associated with medicinal plants: A review. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 147, 2021.
- ALI, Sajid *et al.* Endophytic fungi from *Caralluma acutangula* can secrete plant growth promoting enzymes. **Fresenius Environ Bull**, v. 28, p. 2688-2696, 2019.
- ALMEIDA, J. R. M.; COLLARES, D. G.; BARBOSA, PFD. Bioprospecção microbiana. **Embrapa Agroenergia**, 2015.
- ALMEIDA, Milene C. *et al.* Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp.(Verbenaceae). **BMC research notes**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2018.
- BALAHBIB, Abdelaali *et al.* Health beneficial and pharmacological properties of p-cymene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 153, p. 112259, 2021.
- BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016.
- BASHYAL, Bharat P. *et al.* Globosumones A– C, cytotoxic orsellinic acid esters from the Sonoran desert endophytic fungus *Chaetomium globosum*. **Journal of natural products**, v. 68, n. 5, p. 724-728, 2005.
- BEDOYA, O. A. *et al.* Actividad inhibitoria del aceite esencial de *Lippia organoides* HBK sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans*. **Acta Agronómica**, v. 64, n. 2, p. 116-124, 2014.
- BERNARDINI, S. *et al.* Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. **Natural product research**, v. 32, n. 16, p. 1926-1950, 2018.
- BEZERRA, Jadson DP *et al.* Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 49-57, 2015.
- BHATTACHARJEE, Arunima *et al.* Visualizing microbial community dynamics via a controllable soil environment. **Msystems**, v. 5, n. 1, p. e00645-19, 2020.

BOUGHTON, Berin A.; THINAGARAN, Dinaiz. Mass spectrometry imaging (MSI) for plant metabolomics. In: **Plant metabolomics**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 241-252.

BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 2. Ed.. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2021. 222 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n. 971**, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS). Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (BrCAST). Tabela de pontos de corte para testes de sensibilidade a antimicrobianos. [S.l.]: BrCAST, 2024. Disponível em: <https://brcast.org.br>. Acesso em: 30 mar. 2024.

BRITO, M.P.*et al.* (2020). Bioprospecção como ferramenta para a descoberta de novos insumos farmacológicos. DOI:10.46420/9786599120879cap5.

CAMILO, Cicera Janaine *et al.* Traditional use of the genus *Lippia* sp. and pesticidal potential: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 102296, 2022.

CANUTO, Gisele AB *et al.* Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, p. 75-91, 2018.

CARDOSO, Pedro Henrique *et al.* An update of the Verbenaceae genera and species numbers. **Plant Ecology and Evolution**, v. 154, n. 1, p. 80-86, 2021.

CARDOSO, V. M. *et al.* Biotechnological applications of the medicinal plant *Pseudobrickellia brasiliensis* and its isolated endophytic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 4, p. 926-934, 2020.

CARVALHO, Camila Rodrigues de *et al.* Bioactive compounds of endophytic fungi associated with medicinal plants. In: **Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi**. Springer, Cham, 2019. p. 303-361.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungal in sterile distilled water for researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.70, p.181- 184, 1967.

CASTILHO, Aline Lemes *et al.* Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. **Journal of microbiological methods**, v. 111, p. 119-121, 2015.

CASTILHO, Caroline VV *et al.* In vitro propagation of a carvacrol-producing type of *Lippia origanoides* Kunth: A promising oregano-like herb. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 491-498, 2019.

CECH, Nadja B.; OBERLIES, Nicholas H. From plant to cancer drug: lessons learned from the discovery of taxol. **Natural Product Reports**, 2023.

CHAGAS, Mardonny Bruno de Oliveira *et al.* Antimicrobial activity of cultivable endophytic fungi associated with *Hancornia speciosa* gomes bark. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, p. 179, 2017.

CHANNABASAVA, R.; GOVINDAPPA, M. First report of anticancer agent, lapachol producing endophyte, *Aspergillus niger* of *Tabebuia argentea* and its in vitro cytotoxicity assays. **Bangladesh J. Pharmacol.** 2014, 9, 129–139.

CHATTERJEE, Sohini; GHOSH, Ranjan; MANDAL, Narayan Chandra. Production of bioactive compounds with bactericidal and antioxidant potential by endophytic fungus *Alternaria alternata* AE1 isolated from *Azadirachta indica* A. Juss. **PLoS One**, v. 14, n. 4, p. e0214744, 2019.

CHEN, Xiaomei *et al.* Spirobisnaphthalene analogues from the endophytic fungus *Preussia* sp. **Journal of natural products**, v. 72, n. 9, p. 1712-1715, 2009.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INTERNACIONAL – CLSI publication. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing** . Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, M100-S21, 2011.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INTERNACIONAL – CLSI publication. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically**, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INTERNACIONAL – CLSI publication. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Filamentous Fungi**, Approved Standard, 2nd ed., CLSI document M38-A2, 950 West Valley Roadn Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INTERNACIONAL – CLSI publication. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**, Approved Standard, 2nd ed., NCCLS document M27- A2. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898, USA, 2002.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INTERNACIONAL – CLSI publication. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3**. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INTERNACIONAL – CLSI publication. **Methods for dilution in antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard M07-A9, 9 ed., n. 2. Pennsylvania: CLSI, 2012a. 68p.

COBIAN, Gerald M.; EGAN, Cameron P.; AMEND, Anthony S. Plant–microbe specificity varies as a function of elevation. **The ISME journal**, v. 13, n. 11, p. 2778-2788, 2019.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia. Campinas.** SP: Editora da Unicamp, 2006.

COSTA, Sônia Carine Cova; GUTIÉRREZ, Ingrid Estefania Mancía (Orgs.). **Plantas Medicinais e seus usos.** Feira de Santana-BA: UEFS Editora, 2016.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Natural products as sources of anticancer agents: Current approaches and perspectives. **Natural products as source of molecules with therapeutic potential**, p. 309-331, 2018.

CUI, Jin-long; GUO, Shun-xing; XIAO, Pei-gen. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of *Aquilaria sinensis*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 12, n. 5, p. 385-392, 2011.

DA SILVA, Alessandra P. *et al.* Tyrosinase inhibitory activity, molecular docking studies and antioxidant potential of chemotypes of *Lippia origanoides* (Verbenaceae) essential oils. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0175598, 2017.

DA SILVA, Alice Ferreira *et al.* **Diversidade e bioprospecção de fungos endofíticos associados aos cactos *Melocactus ernestii* e *Opuntia humifusa* presentes em ecossistemas do Brasil e dos Estados Unidos.** 2014. 146p. 2014. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG. (Acesso em: 05/04/2023). Download: <http://hdl.handle.net/1843/30887>.

DAVID, Bruno; WOLFENDER, Jean-Luc; DIAS, Daniel A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.

DE SIQUEIRA, Virginia Medeiros *et al.* Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. **Symbiosis**, v. 53, n. 2, p. 89-95, 2011.

DE SOUZA, Ana Valéria Vieira *et al.* Bioprospecção de plantas da Caatinga com potencial para produção de fitomedicamentos. **Rev. Fitos**, v. 16, n. Supl. 2, 212-226, 2020.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, v. 7, n. 1, 1998.

DESHMUKH, Sunil K. *et al.* Endophytic Fungi: A Source of Potential Antifungal Compounds. **Fungal Endophytes in Plants**, p. 130, 2018.

DESHMUKH, Sunil Kumar *et al.* Anti-inflammatory and anticancer activity of ergoflavin isolated from an endophytic fungus. **Chemistry & biodiversity**, v. 6, n. 5, p. 784-789, 2009.

DEWICK, Paul M. (2009) **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**, 3rd. ed., Wiley, Great Britain.

DING, Chang-Hong *et al.* Screening for differentially expressed genes in endophytic fungus strain 39 during co-culture with herbal extract of its host *Dioscorea nipponica* Makino. **Current microbiology**, v. 69, n. 4, p. 517-524, 2014.

DOS SANTOS, Igor Romeiro *et al.* Insights into the bioprospecting of the endophytic fungi of the medicinal plant *Palicourea rigida* Kunth (Rubiaceae): Detailed biological activities. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 689, 2021.

DUAN, Xiaoxiang *et al.* Diversity and bioactivities of fungal endophytes from *Distylium chinense*, a rare waterlogging tolerant plant endemic to the Three Gorges Reservoir. **BMC microbiology**, v. 19, p. 1-14, 2019.

EBADA, Sherif S. *et al.* The fungal endophyte *Nigrospora oryzae* produces quercetin monoglycosides previously known only from plants. **ChemistrySelect**, v. 1, n. 11, p. 2767-2771, 2016.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

ELFITA, E. *et al.* Antibacterial and antioxidant activity of endophytic fungi isolated from *Peronema canescens* leaves. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 23, n. 9, 2022.

EL-HAWARY, S. S. *et al.* Solamargine production by a fungal endophyte of *Solanum nigrum*. **Journal of applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 900-911, 2016.

EL-SAYED, Ashraf SA *et al.* Exploiting the biosynthetic potency of taxol from fungal endophytes of conifers plants; genome mining and metabolic manipulation. **Molecules**, v. 25, n. 13, p. 3000, 2020.

EYBERGER, Amy L.; DONDAPATI, Rajeswari; PORTER, John R. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 8, p. 1121-1124, 2006.

FADIJI, Ayomide Emmanuel; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 467, 2020.

FANG, Kai *et al.* Tissue-specific and geographical variation in endophytic fungi of *Ageratina adenophora* and fungal associations with the environment. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2919, 2019.

FEIJÓ, Emily Verônica Rosa da Silva. **Caracterização Ecogeográfica, Morfo-Agrônômica, Molecular e Fitoquímica de Acessos de *Lippia origanoides* Kunth Ocorrentes no Estado da Bahia**. 2018. 167 f. 2018. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA. Acesso: 05/06/2019. Download: https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/vieWTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=10872785

FERNANDES, Maurette dos Reis Vieira *et al.* Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian journal of pharmaceutical sciences**, v. 45, p. 677-685, 2009.

FERREIRA, Eskálath Morganna Silva *et al.* Endophytic fungi associated with medicinal plants of Amazonian forest. In: **Neotropical Endophytic Fungi**. Springer, Cham, 2021. p. 177-197.

FERREIRA, Talita Pereira de Souza *et al.* Fungistatic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. against *Curvularia lunata*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 13, n. 14, p. 704-713, 2018.

FERREIRA, Talita Pereira de Souza *et al.* Secondary metabolites from endophytic fungus from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 16, p. 296-306, 2017.

FUNARI, Cristiano Soleo *et al.* Metabolomics, an optimized approach for the rational exploitation of Brazilian biodiversity: state of the art, new scenarios, and challenges. **Quimica Nova**, v. 36, p. 1605-1609, 2013.

GALVES, Jeane Macelino; OLIVEIRA, Diná Almeida de; CORREIA, Kelly Bárbara dos Santos. **Bioprospecção na Amazônia: um mapeamento sistemático dos recursos biológicos e genéticos**. 2021. Download: <http://repositorioinstitucional.uea.edu.br//handle/riuea/3303>. Acesso: 08/fev/2024.

GAMES, Ellen *et al.* Structurally Related Monoterpenes p-Cymene, Carvacrol and Thymol Isolated from Essential Oil from Leaves of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) Protect Mice against Elastase-Induced Emphysema. **Molecules**, v. 21, p. 1390, 2016.

GARCÍA-LATORRE, Carlos; RODRIGO, Sara; SANTAMARIA, Oscar. Protective Effects of Filtrates and Extracts from Fungal Endophytes on *Phytophthora cinnamomi* in *Lupinus luteus*. **Plants**, v. 11, n. 11, p. 1455, 2022.

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

GHORMADE, V.; PATHAN, E. K.; DESHPANDE, M. V. Can fungi compete with marine sources for chitosan production?. **International journal of biological macromolecules**, v. 104, p. 1415-1421, 2017.

GOLPARYAN, Fahimeh; AZIZI, Ali; SOLTANI, Jalal. Endophytes of *Lippia citriodora* (Syn. *Aloysia triphylla*) enhance its growth and antioxidant activity. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, n. 3, p. 759-768, 2018.

GÓMEZ, Omar Cabezas; LUIZ, Jaine Honorata Hortolan. Endophytic fungi isolated from medicinal plants: future prospects of bioactive natural products from *Tabebuia/Handroanthus* endophytes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 21, p. 9105-9119, 2018.

GONG, L.; GUO, S. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 5, 2009.

GOUY, Manolo; GUINDON, Stéphane; GASCUEL, Olivier. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 2, p. 221-224, 2010.

GU, C. B. *et al.* Characterization, culture medium optimization and antioxidant activity of an endophytic vitexin-producing fungus *Dichotomopilus funicola* Y3 from pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.]. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 4, p. 1054-1065, 2018.

GUEDES, Jhonyson Arruda Carvalho *et al.* Metabolic profile and cytotoxicity of non-polar extracts of pineapple leaves and chemometric analysis of different pineapple cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 466-474, 2018.

GUIMARÃES, Denise Oliveira; MOMESSO, Luciano da Silva e PUPO, Mônica Tallarico. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUO, Yafang *et al.* Synergic antioxidant activity of γ -terpinene with phenols and polyphenols enabled by hydroperoxyl radicals. **Food Chemistry**, v. 345, p. 128468, 2021.

GUPTA, Shubhpriya; BHATT, Pankaj; CHATURVEDI, Preeti. Determination and quantification of asiaticoside in endophytic fungus from *Centella asiatica* (L.) Urban. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 1-10, 2018.

HALLMANN, J. *et al.* Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, 1997.

HARDOIM, Pablo R. *et al.* The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HARDOIM, Pablo. The ecology of seed microbiota. In: **Seed Endophytes**. Springer, Cham, 2019. p. 103-125.

HASSANI, M.; DURÁN, Paloma; HACQUARD, Stéphane. Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1-17, 2018.

HEMPHILL, Catalina Francis Perez *et al.* Polyketides from the mangrove-derived fungal endophyte *Pestalotiopsis clavispora*. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 19, p. 2078-2083, 2016.

HOBEN, H. J.; SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium spp.* in inoculants made from presterilized peat. **Applied and environmental microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1246-1247, 1982.

HOLLAND, Mark A. Thinking about PPFM bacteria as a model of seed endophytes: who are they? Where did they come from? What are they doing for the plant? What can they do for us? In: **Seed Endophytes**. Springer, Cham, 2019. p. 21-34.

HUANG, W. Y. *et al.* Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. **Fungal Diversity**, v.33, n.1560–2745, p.61-75, 2008.

HUDZICKI, Jan. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. **American society for microbiology**, v. 15, p. 55-63, 2009.

HUELSENBECK, John P.; RONQUIST, Fredrik. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2001.

IBRAHIM, Mutiat *et al.* Extracts of endophytic fungi from leaves of selected Nigerian ethnomedicinal plants exhibited antioxidant activity. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, p. 1-13, 2021.

IZQUIERDO-CARRASCO, Fernando *et al.* PUmPER: phylogenies updated perpetually. **Bioinformatics**, v. 30, n. 10, p. 1476-1477, 2014.

JENDŽELOVSKÁ, Zuzana *et al.* Hypericin in the Light and in the Dark: Two Sides of the Same Coin. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 560, 2016.

JIA, Min *et al.* A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 906, 2016.

KANDASAMY, Poorani *et al.* Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from *Bauhinia racemosa* Lam and *Phyllanthus amarus* Schum and Thonn. **J Chem Pharm Res**, v. 7, n. 9, p. 366-379, 2015.

KANG, Chao *et al.* Optimization of large-scale culture conditions for the production of cordycepin with *Cordyceps militaris* by liquid static culture. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

KAWADA, Manabu *et al.* Leucinostatin A inhibits prostate cancer growth through reduction of insulin-like growth factor-I expression in prostate stromal cells. **International journal of cancer**, v. 126, n. 4, p. 810-818, 2010.

KHALIL, Ahmed Mohamed Aly *et al.* Isolation and characterization of fungal endophytes isolated from medicinal plant *Ephedra pachyclada* as plant growth-promoting. **Biomolecules**, v. 11, n. 2, p. 140, 2021.

KHARE, Ekta; MISHRA, Jitendra; ARORA, Naveen Kumar. Multifaceted interactions between endophytes and plant: developments and prospects. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2732, 2018.

KILIKIAN, Beatriz Vahan; PESSOA JR, Adalberto. Purificação de produtos biotecnológicos. **Biociencia Industrial. Engenharia Bioquímica**, v. 2, p. 1, 2001.

KLEMKE, Christine *et al.* New Secondary Metabolites from the Marine Endophytic

Fungus *Apiospora montagnei*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 6, p. 1058-1063, 2004.

KUMAR, Ashutosh *et al.* Isolation, purification and characterization of vinblastine and vincristine from endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Catharanthus roseus*. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e71805, 2013.

KUMARI, Puja *et al.* Isolation and purification of bioactive metabolites from an endophytic fungus *Penicillium citrinum* of *Azadirachta indica*. **South African Journal of Botany**, v. 139, p. 449-457, 2021.

KUO, Jimmy; CHANG, Chin-Feng; CHI, Wei-Chiung. Isolation of endophytic fungi with antimicrobial activity from medicinal plant *Zanthoxylum simulans* Hance. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 3, p. 385-397, 2021.

LEYVA-JIMÉNEZ, Francisco Javier *et al.* Functional ingredients based on nutritional phenolics. A case study against inflammation: *Lippia* genus. **Nutrients**, v. 11, n. 7, p. 1646, 2019.

LI, Haiyan *et al.* Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 1515-1519, 2005.

LIANG, Zizhen *et al.* Endophytic fungus from *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying that produces Podophyllotoxin. **Journal of chromatographic science**, v. 54, n. 2, p. 175-178, 2016.

LIU, Jiajia; LIU, Gang. Analysis of secondary metabolites from plant endophytic fungi. In: **Plant pathogenic fungi and oomycetes**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 25-38.

LU-IRVING, Patricia *et al.* Phylogeny of *Lantana*, *Lippia* and related genera (Lantaneae: Verbenaceae). **American Journal of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1354-1373, 2021.

MACIEL, Maria Aparecida M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADDISON, W. P. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis; 2007. Version 2.0. <http://mesquiteproject.org>, 2017.

MAGGINI, Valentina *et al.* Plant-endophytes interaction influences the secondary metabolism in *Echinacea purpurea* (L.) Moench: an *in vitro* model. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

MARQUES, Lana Grasiela Alves *et al.* O impacto da bioprospecção para o descobrimento de novas moléculas terapêuticas. 2022.

MARX, Hannah E. *et al.* A molecular phylogeny and classification of Verbenaceae. **American journal of Botany**, v. 97, n. 10, p. 1647-1663, 2010.

MASUDA, Keiko *et al.* Live single-cell mass spectrometry (LSC-MS) for plant metabolomics. In: **Plant Metabolomics**. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 269-282.

MATHEW, Jyothis *et al.* Endophytic *Phomopsis sp.* colonization in *Oryza sativa* was found to result in plant growth promotion and piperine production. **Physiologia plantarum**, v. 160, n. 4, p. 437-446, 2017.

MAYER, Alejandro MS *et al.* The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in pharmacological sciences**, v. 31, n. 6, p. 255-265, 2010.

MENDES R, AZEVEDO JL. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: Maia LC, Malosso E, Yano-Melo AM, editors. **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife, BR: Editora Universitária da UFPE, 2008. p.129-140.

MENGISTU, Anteneh Ademe. Endophytes: colonization, behaviour, and their role in defense mechanism. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, 2020.

MILLER, Mark A.; PFEIFFER, Wayne; SCHWARTZ, Terri. The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. In: **Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference: extreme digital discovery**. 2011. p. 1-8.

MISRA, Biswapriya B. The connection and disconnection between microbiome and metabolome: A critical appraisal in clinical research. **Biological Research For Nursing**, v. 22, n. 4, p. 561-576, 2020.

MIZE, Brittney K. *et al.* Discovery and development of botanical natural products and their analogues as therapeutics for ovarian cancer. **Natural Product Reports**, v. 40, n. 7, p. 1250-1270, 2023.

MOLLICA, Fabio; GELABERT, Isabel; AMORATI, Riccardo. Synergic antioxidant effects of the essential oil component γ -terpinene on high-temperature oil oxidation. **ACS Food Science & Technology**, v. 2, n. 1, p. 180-186, 2022.

MONTGOMERY, Charles. **Publicly Funded Healthcare: Comprehensive Reference Guide & Citation Source**. Lulu. com, 2017.

NASCIMENTO, T. L. *et al.* Biodiversity of endophytic fungi in different leaf ages of *Calotropis procera* and their antimicrobial activity. **Fungal ecology**, v. 14, p. 79-86, 2015.)

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NOMANI, Md Merajul Haque; SHIRSH, Shikha. Endophytes: An asset for their hosts. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 6, p. 1011-1016, 2020.

NORILER, Sandriale A. *et al.* Bioprospecting and structure of fungal endophyte

communities found in the Brazilian biomes, Pantanal and Cerrado. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1526, 2018.

NTEMAFACK, Augustin *et al.* Comprehensive Review of Endophytic Flora from African Medicinal Plants. **Current Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2860-2898, 2021.

OGBE, Abdulazeez A.; FINNIE, Jeffrey F.; VAN STADEN, Johannes. The role of endophytes in secondary metabolites accumulation in medicinal plants under abiotic stress. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 126-134, 2020.

OLIVEIRA, Danilo R. *et al.* Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* HBK. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 236-240, 2007.

OLIVEIRA, Danilo R. *et al.* Ethnopharmacological studies of *Lippia organoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 206-214, 2014.

OLIVEIRA, George Layson da Silva. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, p. 36-44, 2015.

OMBITO, Japheth Omollo *et al.* A review on the chemistry of some species of genus *Lippia* (Verbenaceae family). **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 3, n. 4, p. 460-466, 2014.

OPLUSTIL, C. P. *et al.* *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*. 3.ed. Sarvier: São Paulo, 2011.

PÁDUA, Ana Patrícia Sousa Lopes de *et al.* Fungal endophyte diversity in the leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian dry tropical forest and their capacity to produce L-asparaginase. **Acta Botanica Brasilica**, v. 33, p. 39-49, 2018.

PAES, Lucilene da Silva *et al.* Aspectos estruturais, químicos e micológicos das folhas de *Stachytarpheta cayennensis* (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 20, p. 204-212, 2018.)

PALANICHAMY, Prabha *et al.* Bioactive potential of secondary metabolites derived from medicinal plant endophytes. **Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, n. 4, p. 303-312, 2018.

PALEM, Padmini PC; KURIAKOSE, Gini C.; JAYABASKARAN, Chelliah. An endophytic fungus, *Talaromyces radicus*, isolated from *Catharanthus roseus*, produces vincristine and vinblastine, which induce apoptotic cell death. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0144476, 2015.

PALUPI, Kartika Dyah; ILYAS, Muhammad; AGUSTA, Andria. Endophytic fungi inhabiting *Physalis angulata* L. plant: Diversity, antioxidant, and antibacterial activities of their ethyl acetate extracts. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 32, n. 4, p. 823-829, 2021.

PANG, Zhiqiang *et al.* Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 621276, 2021.

PENA, Lorena C. *et al.* *Muscodor brasiliensis* sp. nov. produces volatile organic compounds with activity against *Penicillium digitatum*. **Microbiological research**, v. 221, p. 28-35, 2019.

PERALTA, E. D. **Atividade antimicrobiana e composição química de méis do estado da Bahia. 2010.** 265 f. 2010. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Biotecnologia: Área de concentração em Biotecnologia com ênfase em recursos naturais da região Nordeste)-Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana-BA. Download: <http://tede2.uefs.br:8080/handle/tede/1188> Acesso em: 02/03/2023.

PÉREZ ZAMORA, Cristina M.; TORRES, Carola A.; NUÑEZ, María B. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 544, 2018.

PIETERSE, Zelda *et al.* Seasonal variability in fungal endophytes from Aizoaceae plants in the Succulent Karoo biodiversity hotspot, South Africa. **Journal of Arid Environments**, v. 156, p. 19-26, 2018.

PINTO, Cristiana da Purificacao *et al.* Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

PITTAYAKHAJONWUT, Pattama *et al.* Depsidones from the endophytic fungus BCC 8616. **Journal of natural products**, v. 69, n. 9, p. 1361-1363, 2006.

POLLI, Andressa Domingos *et al.* Secondary metabolites of *Curvularia* sp. G6-32, an endophyte of *Sapindus saponaria*, with antioxidant and anticholinesterasic properties. **Natural Product Research**, v. 35, n. 21, p. 4148-4153, 2021.

PRAPTIWI, Raunsai M. *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of endophytic fungi extracts of medicinal plants from Central Sulawesi. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, n. 08, p. 069-074, 2018.

RADJI, Maksum *et al.* Isolation of fungal endophytes from *Garcinia mangostana* and their antibacterial activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 103-107, 2011.

RANA, Kusam Lata *et al.* Endophytic fungi from medicinal plants: biodiversity and biotechnological applications. In: **Microbial endophytes**. Woodhead Publishing, 2020. p. 273-305.

RANA, Kusam Lata *et al.* Endophytic fungi: biodiversity, ecological significance, and potential industrial applications. In: **Recent advancement in white biotechnology through fungi**. Springer, Cham, 2019. p. 1-62.

RAVI, Pooja *et al.* Isolation and Phytochemical Screening of Endophytic Fungi Isolated

from Medicinal Plant *Mappia foetida* and Evaluation of Its In Vitro Cytotoxicity in Cancer. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1-17, 2022.

REHNER, Stephen A.; SAMUELS, Gary J. Molecular systematics of the *Hypocreales*: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. S1, p. 816-823, 1995.

RIBEIRO, A. F. et al. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia origanoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55, p. 249-259, 2014.

RIBEIRO, Fabiana Paiva et al. Chemical Composition and Antibacterial Activity of the *Lippia origanoides* Kunth Essential Oil from the Carajás National Forest, Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, 2021.

RIBEIRO, Fernanda Pinheiro Carvalho et al. **Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Mikania laevigata* (Asteraceae) e análise química dos extratos por CLAE-DAD**. 2011. 159 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais). Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS, Bahia, Brasil. 2011.

ROCA, Beatriz Mendes et al. Avaliação do uso da resazurina em teste de suscetibilidade in vitro frente a *Sporothrix brasiliensis*. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 31, n. 2, p. 32-37, 2019.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. **Planta daninha**, v. 27, n. 3, p. 507-513, 2009.

ROJAS, F. Sánchez; OJEDA, C. Bosch. Recent development in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry: 2004–2008: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 635, n. 1, p. 22-44, 2009.

SADRATI, Nouari et al. Anti-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and anti-dermatophyte activities of secondary metabolites of the endophytic fungus *Penicillium brevicompactum* ANT13 associated with the Algerian endemic plant *Abies numidica*. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 4, p. 110, 2023.

SALEM, Mohamed A. et al. Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. **Metabolites**, v. 10, n. 1, p. 37, 2020.

SALIMENA, Fátima Regina G.; MÚLGURA, Maria Ema. Notas taxonômicas em Verbenaceae do Brasil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 191-197, 2015.

SALIMENA, Fátima Regina Gonçalves. Uma nova espécie de *Lippia* L. (Verbenaceae) do cerrado brasileiro. **Acta botânica brasílica**, v. 24, p. 232-234, 2010.

SANTOS, Caroline Menicoze dos et al. Enzymatic and antagonist activity of endophytic fungi from *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). **Acta Biológica Colombiana**, v. 24, n. 2, p. 322-330, 2019.

SANTOS, Tamara Fonseca Bastos *et al.* Endophytic fungi isolated from Brazilian medicinal plants as potential producers of antioxidants and their relations with anti-inflammatory activity. **3 Biotech**, v. 10, n. 5, p. 1-8, 2020.

SARRAZIN, Sandra Layse F. *et al.* Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* kunth. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 1860-1871, 2015.

SAVARIRAJAN, Daisy; RAMESH, V. M.; MUTHAIYAN, Arunachalam. In vitro antidermatophytic activity of bioactive compounds from selected medicinal plants. **Journal of Analytical Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2021.

SCHULZ, B. *et al.* Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. **Current Science**, p. 39-45, 2015.

SCHULZ, Barbara; BOYLE, Christine. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SELIGER, H. PCR protocols—A guide to methods and applications. Edited by MA Innis, DH Garfield, JJ Sninsky and TJ White, **Academic Press**, 1990. (xviii+ 482 pages) ISBN 0 12 372181 4. 1990.

SHARIFI-RAD, Mehdi *et al.* Carvacrol and human health: A comprehensive review. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1675-1687, 2018.

SILVA, B. M. S.; SILVA, C. R. Metalômica: Metodologias e Aplicações em Estudos Ambientais. **Rev. Virtual Quim.**, 2020, 12 (5), 1097-1113.

SILVA, Fabrício Souza *et al.* Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Pharmaceutical biology**, v. 54, n. 1, p. 25-34, 2016.

SILVA, Gabriela Carinhanha *et al.* **Elicidores na produção, composição e ação biológica de metabólitos de *Lippia origanoides* Kunth** (Verbenaceae). 2017. 114 p. 2017. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos e Vegetais). Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana-BA. Download: https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=5067911. Acesso em: 02/03/2023.

SILVA, Luiz Everson *et al.* Bioprospecção e Inovação na Floresta Atlântica: a atuação da REBIFLORA no Litoral do Paraná e Santa Catarina. 2022.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 6.ed. Artmed Editora, 2017

SINGH, Archana *et al.* Fungal endophytes as efficient sources of plant-derived bioactive compounds and their prospective applications in natural product drug discovery: Insights, avenues, and challenges. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 197, 2021.

SINGH, N.; SHARMA, B. Toxicological effects of berberine and sanguinarine. *Front. Mol. Biosci.* 2018, 5, 21.

SIQUEIRA-LIMA, Pollyana S. *et al.* Central nervous system and analgesic profiles of *Lippia* genus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 29, p. 125-135, 2019.

SOARES, Bruna Viana *et al.* Antiparasitic, physiological and histological effects of the essential oil of *Lippia organoides* (Verbenaceae) in native freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Aquaculture*, v. 469, p. 72-78, 2017.

SOGIN, Mitchell L. *et al.* Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 32, p. 12115-12120, 2006.

SOUZA, Ana Valéria Vieira de *et al.* Bioprospecção de plantas da Caatinga com potencial para produção de fitomedicamentos. 2020.

SOUZA, AQL 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, n. 2, p. 185-195, 2004.

SOUZA, Luciana M. *et al.* Essential oil composition in natural population of *Lippia organoides* (Verbenaceae) during dry and rainy seasons. *Revista de biología tropical*, v. 67, n. 1, p. 278-285, 2019.

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 A. Special Issue: Fungal Endophytes in Plants. Basel, Switzerland: MDPI. *Journal of Fungi*. 4, no. 3: 104. 2018.

STROBEL, Gary; DAISY, Bryn. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUN, Jian Qiu *et al.* Diversity and ecological distribution of endophytic fungi associated with medicinal plants. *Science in China Series C: Life Sciences*, v. 51, n. 8, p. 751-759, 2008.

TALAVERA, Gerard; CASTRESANA, Jose. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic biology*, v. 56, n. 4, p. 564-577, 2007.

TAN, Bee Ling *et al.* Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in pharmacology*, v. 9, p. 402374, 2018.

TANSUWAN, Srinuan *et al.* Antimalarial benzoquinones from an endophytic fungus, *Xylaria* sp. *Journal of natural products*, v. 70, n. 10, p. 1620-1623, 2007.

TAUFIQ, M. M. J.; DARAH, I. Biological activity of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* IBRL OS-64 extracts, an endophytic fungus isolated from medicinal herb, *Ocimum sanctum* against foodborne diarrhea-caused bacteria. **Pharmacognosy Journal**, v. 12, n. 4, 2020.

TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, v. 142, n. 2, p. 335-346, 1999.

TEJESVI, Mysore V.; PIRTTILÄ, Anna Maria. Potential of tree endophytes as sources for new drug compounds. In: **Endophytes of Forest Trees**. Springer, Cham, 2018. p. 441-462.

TELES, Simone et al. *Lippia origanoides* HBK essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 217-225, 2014.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden.. <<https://tropicos.org/name/33700277>> Acesso: 23 Jun 2022.

VANDERMOLEN, Karen M. et al. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 71, 2013.

VEGA-VELA, Nelson Enrique; DELGADO-ÁVILA, Wilman Antonio; CHACÓN-SÁNCHEZ, María Isabel. Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. **Agronomía Colombiana**, v. 31, n. 1, p. 5-17, 2013.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; KATINAKIS, P. Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts. **Hellenic Plant Protection Journal**, v. 10, n. 2, p. 51-66, 2017.

VERMA, V. C. et al. Selection of natural strains of fungal endophytes from *Azadirachta indica* A. Juss, with anti-microbial activity against dermatophytes. **Current Bioactive Compounds**, v. 4, n. 1, p. 36-40, 2008.

VERPOORTE, R. et al. Commentary: "A systems view on the future of medicine: inspiration from Chinese medicine?". **Journal of ethnopharmacology**, v. 121, n. 3, p. 479-481, 2009.

VIGNESHWARI, Aruna et al. Host metabolite producing endophytic fungi isolated from *Hypericum perforatum*. **PLoS One**, v. 14, n. 5, p. e0217060, 2019.

VILGALYS, Rytas; HESTER, Mark. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. **Journal of bacteriology**, v. 172, n. 8, p. 4238-4246, 1990.

WANG, F. W. et al. Antimicrobial potentials of endophytic fungi residing in *Quercus*

variabilis and brefeldin A obtained from *Cladosporium* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 79-83, 2007.

WANG, Song *et al.* Chaetopyranin, a benzaldehyde derivative, and other related metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus derived from the marine red alga *Polysiphonia urceolata*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 11, p. 1622-1625, 2006.

WANI, Zahoor Ahmed; HAKEEM, Khalid Rehman. Endophytes: An Overview. **Endophyte Biology**, p. 1-19, 2022.

XIA, Jianguo; WISHART, David S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature protocols**, v. 6, n. 6, p. 743-760, 2011.

XING, Hui-Qin *et al.* Mycobiota of maize seeds revealed by rDNA-ITS sequence analysis of samples with varying storage times. **MicrobiologyOpen**, v. 7, n. 6, p. e00609, 2018.

XU, Dan; ZHANG, Bing-Yang; YANG, Xiao-Long. Antifungal monoterpene derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis foedan*. **Chemistry & biodiversity**, v. 13, n. 10, p. 1422-1425, 2016.

XU, Jing *et al.* Chromones from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata*. **Journal of natural products**, v. 72, n. 4, p. 662-665, 2009.

YADAV, Ajar Nath. Biodiversity and biotechnological applications of host-specific endophytic fungi for sustainable agriculture and allied sectors. **Acta Sci Microbiol**, v. 1, n. 5, p. 01-05, 2018.

YAN, Lu *et al.* Production of bioproducts by endophytic fungi: chemical ecology, biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6279-6298, 2018.

ZAHER, Ahmed M. *et al.* Characterisation of the metabolites of an antibacterial endophyte *Botryodiplodia theobromae* Pat. of *Dracaena draco* L. by LC-MS/MS. **Natural Product Research**, v. 29, n. 24, p. 2275-2281, 2015.

ZHAN, Jixun *et al.* Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. **Journal of natural products**, v. 70, n. 2, p. 227-232, 2007.

ZHANG, Hua Wei; SONG, Yong Chun; TAN, Ren Xiang. Biology and chemistry of endophytes. **Natural product reports**, v. 23, n. 5, p. 753-771, 2006.

ZHAO, K. *et al.* The steroids and their bioactivities of a sponge-derived fungus *Pleosporaacae* sp. **J Chin Ocean Univ**, v. 41, p. 81-85, 2011.