

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LUCILENE BENTO CARLETTO

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA
OBTIDOS A PARTIR DO CO-CULTIVO DOS FUNGOS *LASIODIPLODIA* SP. E
*PREUSSIA AFRICANA***

ALFENAS/MG

2023

LUCILENE BENTO CARLETTO

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA
OBTIDOS A PARTIR DO CO-CULTIVO DOS FUNGOS *LASIODIPLODIA SP.* E
*PREUSSIA AFRICANA***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em biotecnologia, pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Jaine H. Hortolan Luiz

ALFENAS/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Carletto, Lucilene Bento.

Avaliação Química E Biológica Dos Extratos Acetato De Etila Obtidos A Partir Do Co-Cultivo Dos Fungos Lasiodiplodia Sp. E Preussia Africana / Lucilene Bento Carletto. - Alfenas, MG, 2023.

72 f. : il. -

Orientador(a): Jaine Honorata Hortolan Luiz.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Co-cultura. 2. Fungos endofíticos. 3. Antimicrobianos . 4. Antioxidante . I. Luiz, Jaine Honorata Hortolan , orient. II. Título.

LUCILENE BENTO CARLETO

AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DOS EXTRATOS ACETATO DE ETILA OBTIDOS A PARTIR DO CO-CULTIVO DOS FUNGOS LASIODIPLDIA SP. E PREUSSIA AFRICANA

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 25 de novembro de 2022

Profa. Dra. Jaine Honorata Hortolan Luiz - Presidente e Orientadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Daniela Battaglia Hirata
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Eliane de Oliveira Silva
Instituição: Universidade Federal da Bahia



Documento assinado eletronicamente por **Jaine Honorata Hortolan Luiz, Professor do Magistério Superior**, em 25/11/2022, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Battaglia Hirata, Professor do Magistério Superior**, em 25/11/2022, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliane de Oliveira Silva, Usuário Externo**, em 25/11/2022, às 15:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0870436** e o código CRC **1244AD95**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por sempre me sustentar, dando a mim, forças para que pudesse continuar e vencer todos os obstáculos encontrados por essa trajetória. A toda minha fé e persistência em entender que, para todo esforço e disciplina, há uma vitória no resultado final.

Agradeço também à toda minha família, sendo eles, meus pais, avós e irmãos. Através deles recebi confiança, apoio, amor, compreensão, motivação e, também a credibilidade que eu conseguiria chegar ao final desta etapa tão importante na minha vida discente e profissional. A vocês todo meu amor e respeito.

Quero deixar aqui registrado também, um agradecimento especial aos meus tios Vanice e Roberto, que sempre me apoiaram e estiveram presentes na realização do meu sonho. Sem o incentivo de vocês nada disso seria possível.

Aos meus amigos Keila, Giovana, José, Francine, Caroline, Eduarda, Karol, Duanny, Thais, Grazielle, Daiana, Caren, Lo Ruama que não soltaram a minha mão ou, deixaram de me apoiar em todo meu caminho acadêmico. Eu sou muito grata por ter cada um de vocês comigo.

Aos colegas Brenda e Lucas, pelo suporte e disponibilidade contribuindo na realização de experimentos. A Dra. Patrícia Lunardelli, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos/FCF/UNIFAL, com quem aprendi fazer os testes de atividade antimicrobiana (MIC).

À minha orientadora Dra. Jaine H.H. Luiz, pelos ensinamentos, paciência, compreensão e também, por ter sido fundamental para minha conquista. Fica aqui, meu reconhecimento e agradecimento!

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UNIFAL, aos professores que contribuíram para o meu conhecimento, aos funcionários pelo apoio contínuo.

E por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização dessa etapa tão engrandecedora!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Financiamento 001.

RESUMO

Os fungos endofíticos, caracterizados por constituírem uma classe de microrganismos que podem residir nos tecidos internos das plantas sem causar danos aos seus hospedeiros, produzem um grande número de substâncias bioativas. O co-cultivo, técnica usada para a produção de substâncias naturais ou para ativar clusters de genes silenciosos responsáveis pela biossíntese de metabólitos secundários, vem sendo amplamente utilizado para que sejam obtidos resultados promissores na obtenção de novas moléculas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar o co-cultivo de fungos endofíticos isolado das folhas de *Handroanthus impetiginosus* para que esses fungos fossem capazes de produzir metabólitos secundários inéditos e com atividade biológica pronunciada. Para a realização deste trabalho, além de serem cultivados isoladamente em meio padrão Czapek, os fungos *Lasiodiplodia* sp. e *Preussia africana*, foram cultivados juntos, em meio líquido, tanto em modo estático como em modo agitado. Os extratos orgânicos acetato de etila, após evaporação do solvente, foram avaliados quanto ao seu potencial antimicrobiano e antioxidante. O perfil químico foi avaliado por cromatografia em camada delgada e também por ressonância magnética nuclear. Os melhores resultados obtidos para o ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) e de concentração microbicida mínima (CMM) foram para os extratos do co-cultivo dos fungos *Lasiodiplodia* + *Preussia* em meio agitado em 7 dias, e cultivos únicos de *Preussia* em meio agitado, ambos, com valores de CIM entre 200-400 µg mL⁻¹ frente ao patógeno *Staphylococcus aureus*. Em ensaios de atividade antioxidante o extrato puro de *Preussia* apresentou alto índice de atividade antioxidante quando avaliado em análises de DPPH, fenólicos totais e FRAP. Para o co-cultivo foi demonstrado atividade antioxidante forte para o extrato das co-culturas de *Lasiodiplodia* + *Preussia* em meio estático e *Lasiodiplodia* + *Preussia* em meio agitado em 7 dias, em ensaios de DPPH e fenólico totais. Os resultados de FRAP para cultura mista *Lasiodiplodia* + *Preussia* em meio agitado em 15 dias, apresentaram maior atividade antioxidante em relação as demais. Assim, os co-cultivos de microrganismos podem, além de melhorar o rendimento de substâncias bioativas, contribuir com o potencial antimicrobiano e aumentar a atividade antioxidante dos extratos.

Palavras-chave: Co-cultura; fungos endofíticos; antimicrobianos; antioxidantes.

ABSTRACT

Endophytic fungi, characterized by constituting a class of microorganisms that can reside in the internal tissues of plants without causing damage to their hosts, produce a large number of bioactive substances. Co-cultivation, a technique used for the production of natural substances or to activate clusters of silent genes responsible for the biosynthesis of secondary metabolites, has been widely used to obtain promising results in obtaining new molecules. In this context, the objective of this work was to carry out the co-cultivation of endophytic fungi isolated from the leaves of *Handroanthus impetiginosus* so that these fungi were able to produce novel secondary metabolites with pronounced biological activity. In order to carry out this work, in addition to being isolated in standard Czapek medium, *Lasiodiplodia* sp. and *Preussia Africana* fungi were cultivated together, in liquid medium, both in static and stirred mode. Ethyl acetate organic extracts, after solvent evaporation, were evaluated for their antimicrobial and antioxidant potential. The chemical profile was evaluated by thin layer chromatography and also by nuclear magnetic resonance. The best results for the assay of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) were for the co-cultivation of *Lasiodiplodia* + *Preussia* fungi extracts in agitated medium after 7 days, and single culture of *Preussia* in stirred medium, both with MIC values between 200-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ against *Staphylococcus aureus*. Regarding the antioxidant activity, the pure extract of *Preussia* showed high antioxidant activity when evaluated by DPPH, total phenolics and FRAP analyses. For the co-culture, strong antioxidant activity was demonstrated for the extract of the co-cultures of *Lasiodiplodia* + *Preussia* in static medium and *Lasiodiplodia* + *Preussia* in stirred medium in 7 days by total DPPH and phenolic assays. The results of FRAP for mixed culture *Lasiodiplodia* + *Preussia* in stirred medium in 15 days, showed higher antioxidant activity compared to the others. Thus, the co-cultures of microorganisms can improving the yield of bioactive substances, contribute to the antimicrobial potential and increase the antioxidant activity of the extracts.

Keywords: Co-culture; endophytic fungi; antimicrobials; antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1–	Estruturas químicas de substâncias com atividade citotóxica.....	18
Figura 2–	Fórmula estrutural meroterpenóide austin.....	22
Figura 3–	Fórmula estrutural ácido harziafílico.....	23
Figura 4–	Fórmula estrutural marinamida A/ marinamida B.....	24
Figura 5–	Cultivo dos fungos em meio de cultura ágar batata dextrose.....	35
Figura 6–	Acompanhamento do co-cultivo dos fungos <i>Preussia</i> e <i>Lasiodiplodia</i> em meio ágar batata dextrose do 11º ao 17º dia.....	36
Figura 7–	Co-cultivo do fungo <i>Preussia</i> e <i>Lasiodiplodia</i> no 18º dia.....	36
Figura 8–	Cultivo dos fungos em meio agitado, em Shaker com 250 rpm, por 15 dias, a 28 °C utilizando caldo czapek	38
Figura 9–	Co-cultivo dos fungos em meio agitado, em <i>shaker</i> com 250 rpm, por 15 dias, a 28 °C utilizando caldo Czapek.....	38
Figura 10–	Cultivo dos fungos <i>Lasiodiplodia</i> (A) e <i>Preussia</i> (B) em meio estático, utilizando caldo Czapek em estufa DBO a 28 °C por 20 dias.....	39
Figura 11–	Co-cultivo dos fungos em meio estático, utilizando caldo Czapek em estufa DBO a 28 °C por 20 dias.....	40
Figura 12–	Curva de calibração com trolox do ensaio 1.....	45
Figura 13–	Curva de calibração utilizando ácido gálico, ensaio 1.....	46
Figura 14–	Curva de calibração FeSO ₄	48
Figura 15–	Fotografia das CCDs dos extratos das culturas dos fungos <i>Preussia</i> e <i>Lasiodiplodia</i> puras, em co-cultivo, modo estático e modo agitado	51
Figura 16–	Estrutura química dos flavonoides.....	52
Figura 17–	Espectros de RMN- ¹ H dos extratos acetato de etila dos cultivos dos fungos puros e dos co-cultivos realizados em modo estático e agitado (CDCl ₃ , 300 MHz).....	53
Figura 18–	Expansões dos espectros de RMN- ¹ H dos extratos acetato de etila dos cultivos dos fungos puros e dos co-cultivos (Região entre 11,1-7,8 ppm).....	53
Figura 19–	Expansões dos espectros de RMN- ¹ H dos extratos acetato de etila dos cultivos dos fungos puros e dos co-cultivos	

	(Região entre 9,2-6,0 ppm).....	54
Figura 20–	Expansões dos espectros de RMN- ¹ H dos extratos acetato de etila dos cultivos dos fungos puros e dos co-cultivos	
	(Região entre 5,0 -1,8 ppm).....	54
Figura 21–	Expansões dos espectros de RMN- ¹ H dos extratos acetato de etila dos cultivos dos fungos puro e dos co-cultivos	
	(Região entre 8,1 - 4,8 ppm).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1–	Massas dos extratos AcOEt obtidos após cultivo em meio estático e agitado das linhagens puras e de co-cultivo.....	41
Tabela 2–	Atividade antimicrobiana e antifúngica das fermentações em meio estático e agitado.....	42
Tabela 3–	Resultados sequestro DPPH dos extratos de fungos	45
Tabela 4–	Resultados fenólicos totais dos extratos de fungos)	47
Tabela 5–	Resultados de redução de íons Fe ³⁺ dos extratos dos cultivos dos fungos.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Comparação das atividades antioxidante dos extratos obtidos do cultivo dos fungos <i>Preussia</i> e <i>Lasiodiplodia</i>	50
-------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD	Ágar Batata Dextrose
AcOEt	Acetato de Etila
ATCC	Do inglês, American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Do inglês, Clinical and Laboratory Standards Institute
CMH	Caldo Mueller Hinton
CMM	Concentração Microbicida Mínima
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Do inglês, Desoxyribonucleic acid
DNMT	DNA metiltransferases histona desacetiltransferases
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
FRAP	Do inglês, Ferric reducing ability power
FES	Fermentação em estado sólido
g	Grama
HDAC	Histona desacetiltransferases
HPLC	Do inglês, High Performance Liquid Chromatography
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotássico
mg	Milígrama
mL	Mililitro
MG	Minas Gerais- MG
mm	Milímetro
NAD	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidade Formadora de Colônias
µL	Microlitro
µg	Micrograma
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	FUNGOS ENDOFÍTICOS UMA PROMISSORA FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS	16
3.2	GÊNEROS <i>LASIODIPLODIA</i> E <i>PREUSSIA</i>	17
3.3	CO-CULTURA	19
3.4	MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS.....	26
3.5	CULTIVO SUBMERSO E CULTIVO EM MEIO SÓLIDO	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1	MATERIAIS	29
4.2	REATIVAÇÃO DOS FUNGOS	29
4.3	CULTIVO E CO-CULTIVO DOS ENDÓFITOS EM MEIO LÍQUIDO CZAPEK	29
4.4	OBTENÇÃO DE EXTRATOS ORGÂNICOS SECOS	30
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	30
4.5.1	Patógenos e preparo dos inóculos para ensaio antimicrobianos	30
4.5.2	Determinação da atividade antimicrobiana.....	31
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	32
4.6.1	Compostos fenólicos totais (CFT)	32
4.6.2	Sequestro do radical DPPH	32
4.6.3	Redução do ferro (FRAP).....	33
4.7	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	34
4.8	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1	CULTIVO DOS FUNGOS.....	35

5.2	CULTIVO E CO-CULTIVO DOS FUNGO EM MEIO AGITADO...	37
5.2.1	Meio Agitado	37
5.2.2	Meio Estático	39
5.3	OBTENÇÃO DE EXTRATOS ACETATO DE ETILA	40
5.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	42
5.4.1	Atividade antimicrobiana dos extratos AcOEt contra <i>S. aureus</i>, <i>C. albicans</i> e <i>P. aeruginosa</i>.....	42
5.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	44
5.5.1	Determinação do sequestro de radicais DPPH.....	44
5.5.2	Determinação de fenólicos totais (FT).....	46
5.6	ANÁLISE POR CCD	50
5.6	ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA POR RMN	52
6	CONCLUSÕES	58
7	TRABALHOS FUTUROS.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	APÊNDICES.....	69

1 INTRODUÇÃO

Sabe-se que fungos endófitos constituem uma classe de microrganismos que residem nos tecidos internos das plantas sem causar quaisquer efeitos negativos imediatos aos seus hospedeiros (ALY, *et al.*, 2011; SEPTIANA *et al.*, 2021). Os endófitos podem produzir uma grande quantidade de substâncias bioativas e estruturalmente inéditas, que podem ser utilizadas na medicina, agricultura e em diversos setores industriais. Podem ser citadas como exemplos de substâncias obtidas a partir de endófitos: antibióticos, antitumorais, imunossupressores, anticancerígenos, antivirais, anticolinesterásicos, antineoplásicos, substâncias citotóxicas, enzimas, entre outros (FARHAT, *et al.*, 2022; NEWMAN *et al.*, 2012).

Além disso, estes metabólitos produzidos por microrganismos endófitos trazem benefícios para suas plantas hospedeiras, tais como: estimulam o crescimento e aumentam sua resistência frente a fatores bióticos e abióticos. Durante toda a vida de uma planta, ela pode ser habitada por diferentes espécies de endófitos, os quais vivem em um ambiente restrito, o que pode estimular a produção de substâncias capazes de promover um melhor desempenho em competições microbianas e, conseqüentemente, afetar microrganismos vizinhos e invasores (CHAGAS *et al.*, 2013; SEPTIANA *et al.*, 2021).

Devido à competição microbiana por espaço e nutrientes e ao número de endófitos encontrados dentro dos tecidos das plantas hospedeiras, que podem variar em centenas de espécies por planta, as interações entre estes microrganismos são importantes para a produção de substâncias biologicamente ativas (IGNATOVA *et al.*, 2021; KNIGHT *et al.*, 2003; OH *et al.*, 2005).

Neste sentido, a co-cultura de microrganismos, que envolve o cultivo de duas ou mais espécies no mesmo ambiente de confinamento, seja em meio sólido ou líquido, constitui uma maneira eficiente de ativar os genes destes microrganismos para a produção de compostos bioativos (COSTA, 2017; ZHANG, *et al.*, 2018). Além disso, a co-cultura tem sido utilizada para diversos estudos, fornecendo dados para a investigação fundamental de comunidades naturais, afim de esclarecer os fenômenos simbióticos, indução de produção de metabólitos secundários de interesse farmacêutico, e para aplicações específicas como melhorar o rendimento de produção de produtos de fermentação (COSTA, 2017). Desse modo, este

trabalho tem por finalidade estudar o efeito do co-cultivo de fungos endofíticos *Lasiodiplodia* sp. e *Preussia africana* isolados do ipê rosa (*Handroanthus impetiginosus*), quanto ao seu potencial para biossíntese de metabólitos secundários bioativos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o co-cultivo dos fungos *Lasiodiplodia* sp. e *Preussia africana* isolados do ipê rosa *Handroanthus impetiginosus*, para avaliar a produção de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano e antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar o cultivo das linhagens puras dos fungos citados e obter os extratos orgânicos acetato de etila;
- b) Realizar o co-cultivo de fungos *Lasiodiplodia* sp. e *Preussia africana* e obter o extrato acetato de etila após o co-cultivo;
- c) Avaliar e comparar as atividades antimicrobiana com linhagens de patógenos ATCC e antioxidante (DPPH, FRAP e Fenólicos totais) dos extratos obtidos a partir das culturas axênicas e dos extratos obtidos a partir do co-cultivo dos fungos;
- d) Avaliar o perfil químico dos extratos por cromatografia em camada delgada e por ressonância magnética nuclear (RMN).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS UMA PROMISSORA FONTE DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Os fungos endofíticos vivem em vários tecidos e órgãos saudáveis das plantas, mantendo uma associação com seus hospedeiros por pelo menos uma parte de seu ciclo de vida sem causar doenças. Esses fungos produzem toxinas que protegem as plantas contra os efeitos de herbicidas, contra a herbivoria e fitopatógenos, além de atuarem como estimulantes do crescimento da planta induzindo mudanças morfológicas, fisiológica, bioquímicas e fornecendo nutrientes para seus hospedeiros (DOS SANTOS *et al.*, 2021; SALLAM *et al.*, 2021). De acordo com sua ampla utilidade, bem como a produção de metabólitos secundários, vem sendo cada vez mais necessários novos estudos e conhecimento sobre esses organismos.

O início dos estudos com microrganismos com capacidade de liberar substâncias bioativas ocorreu com a descoberta do paclitaxel por Wani e Wall (1971), onde o taxol foi isolado pela primeira vez da casca da planta *Taxus brevifolia*, tornando um dos medicamentos mais importantes para diferentes tratamentos de câncer. Devido ao alto custo e demanda de tempo para produção do taxol, outros estudos foram desenvolvidos para obtenção desse composto como, por exemplo, a estratégia semissintética partindo-se do produto natural da planta mais abundante, a 10-desacetilbacatina. Essa estratégia, desenvolvida pelo grupo Holton permitiu pela primeira vez a produção comercial da droga pela Bristol-Myers Squibb Company. Seguindo as diversas investigações, vários microrganismos produtores de taxol também foram descritos, bem como fungos endofíticos capazes de produzir outros produtos naturais bioativos típicos de sua planta hospedeira (RODRIGUEZ *et al.*, 2016; WANI *et al.*, 1997).

Recentemente, os microrganismos têm apresentado diferentes aplicações biotecnológicas nas indústrias, agricultura e área farmacêutica. Seu potencial para degradação de metabólitos secundários e xenobióticos, bem como a tolerância para metal pesado, os tornam um alvo interessante para biorremediação. São importantes ecologicamente devido à produção de compostos voláteis, e estão associados ao biocontrole de patógenos (RODRIGUEZ *et al.*, 2016).

Outro crescente interesse na versatilidade dos endófitos está relacionado aos

seus papéis funcionais quando em simbiose com plantas medicinais, o que pode acarretar em um aumento dos compostos bioativos produzidos por algumas plantas medicinais importantes (HUSSEIN *et al.*, 2018).

Os fungos endofíticos também são capazes de produzir substâncias com potencial antimicrobiano, sendo reconhecidos como um arsenal versátil se mostrando como uma alternativa para a produção desses compostos. Sabe-se que alguns endófitos possuem capacidades biossintéticas superiores, devido à sua presumível recombinação do gene com o hospedeiro, enquanto residem e se reproduzem dentro dos tecidos vegetais saudáveis. Uma alta proporção de fungos endofíticos (80%) produzem compostos biologicamente ativos em testes de atividades antibacteriana, fungicida e herbicida. O desenvolvimento contínuo de novos antimicrobianos é importante para superar as dificuldades relacionadas ao tratamento de infecções causadas por patógenos resistentes (IGNATOVA *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2016).

Dessa forma, os endófitos são vistos como fontes excelentes de produtos naturais bioativos, que representam um desafio emergente para analisar a diversidade de endófitos fúngicos na descoberta de novas espécies produtoras de metabólitos secundários inéditos (CANON *et al.*, 2020).

3.2 GÊNEROS LASIODIPLODIA E PREUSSIA

Fungos do gênero *Lasiodiplodia* são, geralmente, encontrados em plantas lenhosas de regiões tropicais e subtropicais. Pertencentes à família *Botryosphaeriaceae*, estão associados a uma variedade de hospedeiros monocotiledôneos, dicotiledôneos e gimnospermas e exibem vários estilos de vida. Diversas espécies de *Lasiodiplodia* estão associadas a muitas doenças em plantas, incluindo deterioração em frutos e raízes, morte de galhos e cancrios do caule, podendo ser considerado um fungo patogênico (CRUYWAGEM *et al.*, 2017; DE SILVA *et al.* 2019).

Apesar de sua patogenicidade, este gênero possui capacidade de produzir compostos bioativos promissores, dentre eles, substâncias antimicrobianas e antioxidantes. As vias biossintéticas de fungos endofíticos para a produção de substâncias bioativas podem ocorrer através de processos fermentativos, para otimização do processo deve ser levado em consideração as condições do meio

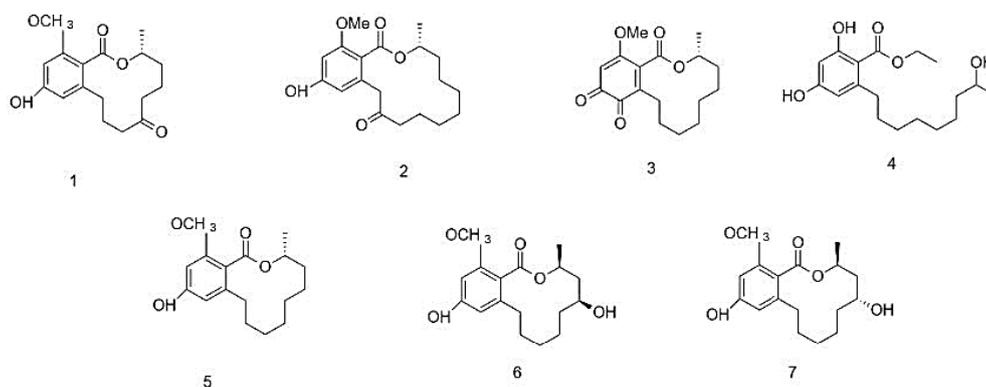
para o cultivo (MOREIRA *et al.*,2022).

Gómez *et al.* (2022) em seu trabalho sobre o gênero *Lasiodiplodia* isolado da planta *Handroanthus impetiginosus*, observaram que os extratos brutos obtidos deste gênero apresentavam atividade fungicida e antimicrobiana contra bactérias Gram positivas, neste trabalho foi descrito o isolamento do ácido indol-3-carboxílico, bem como a identificação de quatro compostos por CG/EM ((Z)-docos-13-enamida, metil (Z)-octadec-9-enoato, (Z)-octadec-9-enamida, dodecanamida) e mais quatro compostos por RMN/HRESIMS em misturas complexas (ácido-4-hidroxibenzóico, ácido indol-3-carboxílico, 4 hidroximeleina e 4-hidroxifenilacetamida).

Em experimentos de otimização de meios de cultivo, realizados por Moreira *et al.* (2022) o cultivo do fungo *Lasiodiplodia* sp. forneceu extratos acetato de etila com potencial antimicrobiano. Essas substâncias presentes nos extratos apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica contra cepas ATCC *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* no ponto ótimo do estudo de otimização do meio de cultura, nas condições em que foram avaliadas.

Segundo estudos realizados por Li *et al.* (2016), o cultivo do fungo *Lasiodiplodia* sp. isolado da planta *Excoecaria agallocha* do mangue em Gaoqiao, na China, gerou quatro novas lasiodiplodinas, juntamente com três análogos conhecidos. Os compostos obtidos de 1 a 7 (Figura 1), apresentaram atividade citotóxica em células cancerígena, entre elas THP1(células monocíticas de leucemia), MDA-MB-435 (linhagem de células de câncer de mama), A549 (células de carcinoma de pulmão humano), HepG2 (hepatocarcinoma humano) e HCT-116 (células de carcinoma de cólon).

Figura 1- Estrutura químicas de substâncias com atividade citotóxica.



Fonte: Li *et al.* (2016).

Quanto ao gênero *Preussia*, pertencente à família *Sporormiaceae*, pode ser isolado de diferentes nichos entre eles solo, madeira, restos de plantas. Recentemente diversas espécies foram descritas como endófitos, isolados de plantas em diversas localizações geográficas como Austrália, Oriente Médio e regiões africanas, apesar de serem encontradas em diferentes lugares do mundo, estas espécies ainda foram pouco estudadas (KHAN *et al.*, 2016).

Dentre as espécies do gênero, grande parte delas apresentou habilidade em produzir metabólitos secundários bioativos, com atividade antimicrobiana, antioxidante, citotóxica, entre outras. Em estudos realizados com *Preussia africana* observou-se a produção de compostos ativos, com citotoxicidade significativa contra células de carcinoma de pulmão humano A549 (ZHANG *et al.*, 2012).

Mapperson *et al.* (2014), ao pesquisar o gênero *Preussia*, isolaram 18 espécies de 9 plantas hospedeiras. Os extratos brutos, obtidos a partir da extração com acetato de etila, foram testados contra os seguintes patógenos: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e *Candida albicans*, onde 13 dos 18 fungos isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra, pelo menos, um dos patógenos citados.

Em estudo realizado recentemente com a planta medicinal *Juniperus oxycedrus*, por meio de uma cepa mesofílica do fungo *Preussia* avaliou-se sua capacidade de produzir enzimas, demonstrando grande desempenho na produção de celulase e potencial para diversas aplicações biotecnológicas (SEDDOUK *et al.*, 2022). Em trabalho semelhante realizado com a planta *Handroanthus impetiginosus*, os autores avaliaram o isolamento de fungos endofíticos do ipê e sua capacidade em produzir enzimas por fermentação em meio líquido. Os autores observaram que o fungo *Preussia africana*, identificado geneticamente, demonstrou ser capaz de produzir lipase extracelular (SOUZA *et al.*, 2018).

3.3 CO-CULTURA

Do ponto de vista histórico, estudos sobre o aumento da produção de metabólitos secundários em sistemas convencionais de monoculturas submersas de microrganismos filamentosos são imprescindíveis para o desenvolvimento

biotecnológico de um produto em escala industrial. Baseando-se no exemplo da produção de penicilina, toda pesquisa envolvida estava relacionada à melhoria de seu rendimento, que tratava aspectos de otimização de bioprocessos, tais como, forma de aeração e agitação, modo de cultivo, propagação do inóculo, entre outros fatores (MANDENIUS & BRUNDIN, 2008).

Ao se cultivar uma única espécie, o rendimento do processo irá depender de propriedades intrínsecas do microrganismo e das condições de cultivo. Porém, quando se adiciona uma segunda espécie no meio de cultura, a complexidade do sistema aumenta consideravelmente, pois, existem influências catabólicas e biossintéticas de ambos, bem como interações químicas e físicas entre eles. Geralmente, os dois microrganismos cultivados juntos apresentarão funções distintas na produção de metabólitos, ou seja, o produtor atua como uma fábrica de células que é estimulada pela outra espécie, o qual possivelmente, produzirá a molécula alvo (MAVITUNA *et al.*, 2016).

De forma similar, nas culturas axênicas, o desempenho do processo depende do acúmulo de biomassa do produtor como um pré-requisito para alcançar um nível de produtividade razoável (LIANG *et al.*, 2020). Se o crescimento do microrganismo for suprimido por algum motivo, os resultados relacionados à produção dos metabólitos não serão satisfatórios.

Por outro lado, se o crescimento do microrganismo é pequeno, as diferenças entre as monoculturas e co-culturas não serão observadas, e o próprio processo de co-cultivo se tornará desnecessário. O desafio experimental é encontrar um equilíbrio entre manter a atividade estimuladora e evitar a supressão de metabólitos pelo microrganismo produtor (CARLSON *et al.*, 2015; MAVITUNA *et al.*, 2016).

Embora a compreensão das interações microbianas ainda seja insuficiente para fornecer fundamentos sólidos para planejamento de co-cultivo racional, as medidas relacionadas ao bioprocessamento podem ser tomadas para moldar os resultados das co-culturas. Os aspectos importantes da metodologia de co-cultivo que devem ser considerados em planejamentos experimentais são: (1) a abordagem de iniciação de co-cultura, (2) configuração experimental, (3) meio de co-cultivo e condições de processo (BORUTA, 2021).

A co-cultura chamada de fermentação mista de dois ou mais microrganismos de origem fúngica ou bacteriana se destaca como uma técnica usada para aumentar, substancialmente, e aperfeiçoar a produção de substâncias naturais ou

para ativar *clusters* de genes silenciosos responsáveis pela biossíntese de novos metabólitos secundários (ANCHEEVA *et al.*, 2017; GOERS *et al.*, 2014).

Culturas microbianas mistas podem simular ambientes durante suas interações, estando diretamente relacionadas a diversos mecanismos, entre eles competição por espaço e ou nutrientes, parasitismo e antagonismo. Para superar essas limitações, é possível cultivar microrganismos simulando condições de ocorrência natural, onde eles coexistem em comunidades complexas, geralmente chamadas de microbioma, produzindo compostos novos os quais não haviam sido detectados anteriormente quando se encontravam isolados (CHAGAS & PUPO, 2018; VINALE *et al.*, 2017).

Nesse contexto, as motivações para usar o sistema de co-cultura incluem: estudar as interações naturais entre as populações, melhorar o sucesso do cultivo ou estabelecer interações sintéticas. Alguns exemplos incluem estudos de infecção, criação de modelos experimentais e ambientes biomiméticos de sistemas naturais, como tecidos artificiais (GOERS *et al.*, 2014).

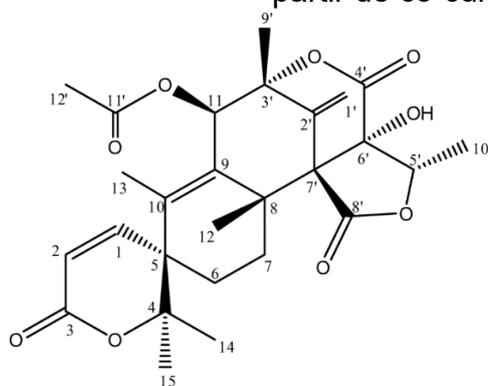
Assim, vários estudos forneceram evidências de que a interação entre membros de uma comunidade endofítica pode desempenhar um papel importante no início da produção de metabólitos, como a biossíntese de metabólitos de defesa e sinais de comunicação entre estes microrganismos (AKONE *et al.*, 2016).

Os genes que codificam essas vias biossintéticas geralmente são agrupados e, em muitos casos, eles não são expressos nas condições de cultura de laboratório, porque sua ativação depende de sinais ambientais e, portanto, apenas uma minoria dos metabólitos secundários pode ser investigada *in vitro* (SCHERLACH & HERTWECK, 2009; YAMANAKA *et al.*, 2014). As vias de biossíntese silenciadas, principalmente, aquelas relacionadas à produção de substâncias de defesa, podem ser ativadas quando os microrganismos são cultivados juntos em co-culturas ou em experimentos de confrontação (BERTRAND *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Nascimento *et al.* (2020), em experimentos de co-cultura utilizando dois fungos endofíticos isolados de folhas de *Handroanthus impetiginosus*, observaram uma área de inibição notável em cultivo realizado em meio sólido entre as cepas selecionadas para estudo. Os extratos obtidos foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência onde foi possível observar o aparecimento de novos metabólitos que não foram identificados em culturas axênicas. A descoberta

do composto meroterpenóide austin (Figura 2), encontrado em um dos extratos da cultura mista, apresentou atividade tripanocida quando isolado

Figura 2- Fórmula estrutural do meroterpenóide austin isolado a partir de co-cultura



Fonte: Nascimento et al. (2020).

Pode-se ressaltar que uma grande vantagem dos sistemas de co-cultura é que a combinação da capacidade metabólica de dois ou mais microrganismos permite a utilização de substratos mais complexos e a produção de produtos específicos.

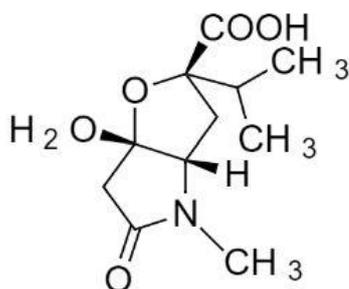
Alguns estudos sobre co-cultura mostraram que tanto pode ocorrer um aumento na produção de metabólitos conhecidos, como existe a possibilidade de culminar na descoberta de novos compostos. Em trabalho utilizando a co-cultura do fungo endofítico *Fusarium tricinctum* com a bactéria *Bacillus subtilis* 168 trpC2, resultou em um aumento de 78 vezes no acúmulo de metabólitos secundários e também no isolamento de alguns compostos que não estavam presentes em nenhuma das culturas puras (AKONE et al., 2016; OLA et al., 2013).

Bohni et al. (2016) realizaram uma comparação entre o perfil metabólico produzido em co-cultura dos fungos *Sarocladium strictum*, *Fusarium oxysporum*. Os autores observaram que em cultura mista houve uma forte indução para produção de ácido fusárico. O monitoramento deste composto em um grande número de cepas confirmou que a produção de ácido fusárico é dependente da espécie e sua indução nem sempre é observada em co-cultura. Embora específico para certas espécies, o ácido fusárico é produzido em maiores quantidades, por um complexo de espécies de *F. oxysporum* - *F. fujikuroi* spp.. No entanto, a produção desta micoalexina pode ser fortemente induzida pela interação com uma segunda espécie

de fungo, o qual não produza o ácido fusárico (BOHNI *et al.*, 2016).

Experimentos de co-cultura realizados por Vinale *et al.* (2017) do fungo usado para biocontrole *Trichoderma harzianum* M10 e do endófito *Talaromyces pinophilus* F36CF foram desenvolvidos para induzir a expressão de genes que não são transcritos em ensaios comuns de laboratório. Os autores realizaram uma análise metabolômica dos dois fungos cultivados juntos e os resultados indicaram que a presença simultânea das espécies influenciou significativamente a produção de metabólitos, induzindo o acúmulo de sideróforos (compostos orgânicos responsáveis pela captação de ferro). Além de ser isolado um novo composto natural, denominado ácido harziafílico (Figura 3), especificamente produzido pela interação fúngica, que foi totalmente caracterizado pelo grupo de pesquisa e apresenta evidências que possuem possível efeito antiproliferativo seletivo contra células de carcinoma colorretal.

Figura 3- Fórmula estrutural ácido harziafílico



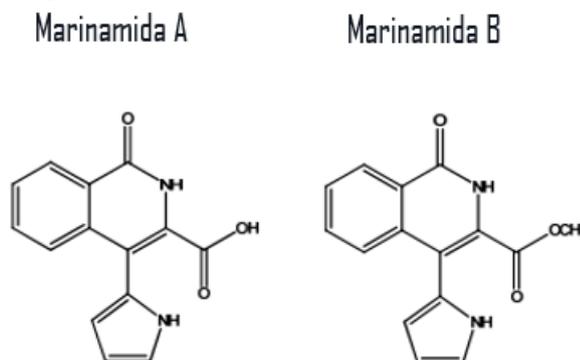
Fonte: Vinale *et al.* (2017).

Segundo estudos realizados por Li *et al.*, (2019) a co-cultura do fungo endofítico *Phoma sp.* YUD17001 de *Gastrodia elata* com *Armillaria sp.* em meio submerso resultou na produção de cinco novos metabólitos secundários, incluindo dois compostos fenólicos, fexandiol A e B e três derivados de éster alifático, fomesteres A – C, nenhum desses cinco compostos foi detectado em extratos brutos obtidos das linhagens cultivadas individualmente. Os autores inferiram que a produção dessas substâncias foi influenciada por um complicado processo de interação entre os fungos (LI *et al.*, 2019).

Feng e Youngcheng (2006) estudaram dois fungos endofíticos cultivados em meio líquido por 12 dias. Como resultado, foi produzido um alcalóide 1-isoquinolona denominado marinamida A, e o seu éster metílico denominado marinamida B (Figura

4). Estes alcalóides não haviam sido produzidos em cultura pura dos endófitos e ambas apresentaram atividade contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocyanea*, e *Staphylococcus aureus*.

Figura 4- Fórmula estrutural marinamida A e marinamida B



Fonte: Chagas, (2010).

Entretanto, independente do resultado, a técnica do co-cultivo tem sido explorada em muitos campos, desde tratamentos de águas residuais com base em comunidades microbianas enriquecidas até a produção de moléculas de interesse, como a vitamina C, usando co-culturas artificiais, além de um grande número de alimentos fermentados produzidos em todo o mundo (CYDZIK-KWIATKOWSKA & ZIELIŃSKA, 2016; WANG *et al.*, 2020; ZOU *et al.*, 2013)

A descoberta de novos produtos naturais depende do acesso a novas fontes biológicas, e o co-cultivo de fungos endofíticos vem sendo tratado como uma abordagem eficaz para induzir a interação entre espécies e desta forma propiciar a biossíntese de substâncias bioativas, que estariam envolvidas nesta relação, melhorando a riqueza e a diversidade dos metabólitos produzidos (WANG *et al.*, 2019).

Da mesma forma, Canon *et al.* (2020), definem o co-cultivo como processos biotecnológicos que dependem de três tipos de montagens: comunidades naturais enriquecidas, co-culturas artificiais e co-culturas sintéticas. As co-culturas artificiais referem-se a culturas compostas por microrganismos que geralmente não são encontrados juntos na natureza, as co-culturas sintéticas referem-se a associações de microrganismos em que pelo menos uma das cepas é um organismo geneticamente modificado. Vale ressaltar que, dependendo do tipo de montagem microbiana, o objetivo pode ser aumentar ou diminuir as concentrações das moléculas-alvo.

O conhecimento mais abrangente sobre novas biotecnologias é promissor, especialmente em relação às fontes naturais. A biossíntese de metabólitos secundários com novas propriedades é aumentada por meio das interações entre endófitos (RIBEIRO *et al.*, 2021). Assim, em estudo desenvolvido para verificar a influência de *Streptomyces lividans* no acúmulo de produtos naturais por *F. tricinctum*, os extratos analisados por HPLC, induziram a produção de dímeros de naftoquinona e de dihidrolateropirona, que não foram detectados em controles fúngicos axênicos (MOUSSA *et al.*, 2019).

Yu *et al.* (2022), utilizaram técnicas de otimização das condições de co-cultivo submerso dos microrganismos *Aspergillus sydowii* e *Bacillus subtilis* por meio de metodologia de superfície de resposta, com o objetivo de aumentar a produção de metabólitos secundários na cultura mista e a atividade antimicrobiana dos extratos contra a bactéria *S. aureus*, os autores concluíram que a técnica foi adequada para alterar o perfil metabólico e eficaz para induzir a biossíntese de metabólitos ativos.

Segundo Moussa *et al.* (2020), novos compostos bioativos foram produzidos com o co-cultivo da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* com o fungo endofítico *Fusarium tricinctum* que induziram agrupamentos biossintéticos de genes bacterianos silenciosos. Neste trabalho foram isoladas a 2-heptil-4-hidroxiquinolona, uma molécula quórum sensing pseudomonal, junto com alcalóides fenazínicos antifúngicos, o ácido fenazina-1-carboxílico e fenazina-1-carboxamida, que são metabólitos de *P. aeruginosa*. Em contraste com *P. aeruginosa*, não foram detectadas respostas metabólicas para *F. tricinctum*, o que contrasta fortemente com experiências anteriores de co-cultura com este fungo usando outras bactérias.

Em revisão realizada por Zhuang e Zhang (2021), os autores descreveram os avanços da utilização de co-culturas entre espécies com base em co-cultivo em meio líquido e meio sólido destacando a biossíntese de produtos naturais, como os policetídeos e alcalóides. Os autores relataram que a utilização de co-cultura submersa contribuiu para troca de metabólitos e para o desencadeamento de novos produtos, porém, foi necessário controlar as condições de cultivo para coexistência das espécies envolvidas.

Stierle *et al.* (2017), relataram 8 novos macrolídeos do co-cultivo submerso contendo *Penicillium fuscum* e *Penicillium camembertii clavigerum*. Dentre os compostos isolados, a berkeleylactona apresentou elevada atividade antimicrobiana contra os patógenos *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans* e

Candida glabrata.

O co-cultivo de bactérias e fungos provou ser uma ferramenta poderosa para a descoberta de novos compostos. Parl *et al.* (2017), descreveram que através da cultura mista submersa de duas bactérias gram-positivas *Gordonia sp. KMCoo5* e *Streptomyces tendae KMCoo6* houve o aparecimento de um novo glicosídeo denominado ácido gordônico, sendo sua estrutura caracterizada por meio de dados espectrais de RMN, ultra-violeta (UV) e outras metodologias.

Dessa forma, para se atingir novos avanços na descoberta de compostos a partir de co-cultivos de fungos e bactérias, novas abordagens vêm sendo estudadas para se desenvolver métodos inovadores e eficientes (ZHUANG & ZHANG, 2021). Podemos citar como exemplo, o estudo de Ancheeva *et al.* (2017), que utilizou uma cultura autoclavada da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* em meio sólido de arroz, que possibilitou o aumento de até 33 vezes de metabólitos secundários, incluindo quatro novos derivados de butenolídeos.

3.4 MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS

Os fungos têm sido o principal alvo da modificação epigenética para obter acesso a genes crípticos para produção de produtos naturais que, por sua vez, podem levar ao acúmulo de novos compostos. Esta abordagem tem se mostrado eficiente quando associada ao co-cultivo, pois, a utilização de modificadores epigenéticos desempenham o papel de estimular a ativação de grupos de genes biossintéticos silenciosos para a produção de metabólitos secundários desconhecidos (AKONE *et al.*, 2019).

Modificadores epigenéticos atuam em alterações hereditárias na expressão gênica que ocorrem sem mudança na sequência do DNA, incluindo interações na metilação, acetilação de histonas e fosforilação do DNA, que determinam o tempo e a localização da expressão gênica. Algumas enzimas modificadoras identificadas são utilizadas como ferramenta na ativação de genes silenciosos como, por exemplo: DNA metiltransferases (DNMT), histona acetiltransferases e histona desacetiltransferases (HDAC) podendo resultar na indução de novos metabólitos secundários. Esses inibidores de pequenas moléculas e seus ativadores, além de encontrar aplicação em estudos biológicos, também atuam como ferramentas para induzir *clusters* de genes biossintéticos trabalhando na produção de novos produtos

naturais (AKONE *et al.*, 2019; BYRUM *et al.*, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2008).

Nesse sentido, Li *et al.* (2017) demonstraram que o fungo endofítico *Eupenicillium sp. LG41*, isolado da planta medicinal chinesa *Xanthium sibiricum*, foi submetido a modulação epigenética, usando a nicotinamida como inibidor da histona desacetilase dependente de NAD + (HDAC). A estimulação epigenética do fungo levou ao aumento da produção de dois novos compostos contendo decalina, eupenicinicois C e D, juntamente com dois compostos conhecidos biossinteticamente relacionados, eujavanicol A e eupenicinicol.

3.5 CULTIVO SUBMERSO E CULTIVO EM MEIO SÓLIDO

Entende-se como fermentação ou processos fermentativos, o processo amplamente utilizado para a produção de compostos importantes economicamente, principalmente na indústria química, farmacêutica, alimentícia e também na agricultura (SINGH *et al.*, 2016). Esse fenômeno pode ser definido como sendo o processo metabólico onde há a conversão biológica de substratos complexos em compostos, para obtenção de energia, principalmente com o envolvimento de leveduras, fungos e bactérias (SANTOS *et al.*, 2020; RAIMBAULT, 1998).

Sabe-se que a fermentação para obtenção de substâncias bioativas é realizada em meio líquido ou sólido, onde vários tipos de meios de cultura podem ser escolhidos para cultivar microrganismos. Para o meio líquido tem-se o caldo Czapek-Dox Broth, e cultivo em meio sólido os ágaros: Extrato de malte, batata dextrose, fosfato levedura amido solúvel e levedura peptona dextrose, os quais são amplamente utilizados, obtendo elevada taxa de sucesso nos cultivos dos fungos. Nesse caso, a fermentação pode ocorrer em temperatura ambiente, sendo em condição estática ou agitada, entre 6 a 28 dias (ZHENG *et al.*, 2016; ZHU *et al.*, 2017).

Genericamente, os processos fermentativos podem ser divididos em etapas, as quais envolvem a preparação e inoculação da matéria prima, a fermentação propriamente dita e a recuperação do produto final.

Assim, a fermentação em estado sólido (FES) tem sido explorada principalmente devido às vantagens, como espaços requeridos e por apresentar condições similares ao habitat natural do microrganismo. Esse tipo de fermentação é um método que consiste na obtenção de enzimas, destacando-se algumas

vantagens econômicas por aproveitar substratos alternativos, onde se aproveita um grande volume de subprodutos agroindustriais que seriam descartados pela agroindústria (SANTOS *et al.*, 2020). Caracteriza-se por ser um processo com ausência ou pouca presença de água livre, onde o substrato requer umidade para favorecer o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos (THOMAS *et al.*, 2013).

Já a fermentação líquida é um processo que ocorre em meio constituído basicamente por água e substratos nela dissolvidos, essa técnica apresenta relativa facilidade de cultivo em grande escala, pois, garante homogeneidade do meio e facilita o controle dos parâmetros, sendo amplamente utilizada em processos industriais, na produção de compostos bioativos, secretados principalmente durante a fermentação (SANTOS *et al.*, 2020; SUBRAMANIYAM & VIMALA, 2012).

Nesse contexto, pode-se afirmar que, em qualquer dos processos fermentativos, a fermentação pode ser influenciada pelos nutrientes disponíveis no meio e a escolha correta do substrato é de extrema importância, uma vez que as técnicas devem ser otimizadas a fim de se conseguir um maior rendimento da molécula alvo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para a realização do presente estudo, foram utilizados fungos endofíticos isolados a partir de folhas saudáveis do ipê rosa (*Handroanthus impetiginosus*) coletada na região de Alfenas, Sul de Minas Gerais. Os fungos endofíticos utilizados neste trabalho foram: *Lasiodiplodia* sp. e *Preussia africana*, identificados por biologia molecular.

4.2 REATIVAÇÃO DOS FUNGOS

O repique dos fungos previamente preservados, segundo a metodologia de Castellani (DE CAPRILES *et al.*, 1989) foram realizados em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (ABD) onde os fungos permaneceram em crescimento de 4 a 18 dias, em temperatura ambiente, tanto para culturas únicas como em co-cultivo.

4.3 CULTIVO E CO-CULTIVO DOS ENDÓFITOS EM MEIO LÍQUIDO CZAPEK

As fermentações dos fungos, tanto isolados como em culturas mistas foram realizadas utilizando-se o caldo Czapek (Glicose: 30,0 g; NaNO₃: 2,0 g; K₂HPO₄: 1,0 g; MgSO₄.7H₂O: 0,5 g; KCl: 0,5 g; FeSO₄.7H₂O: 0,01 g; extrato de levedura: 1,0 g; água destilada: 1000 mL). Dois discos de cinco mm de ABD com o fungo crescido foram inoculados em erlenmeyers para culturas únicas. Já para culturas mistas dois discos de cada fungo foram inoculados ao meio.

Para cada cultivo, utilizaram-se quatro erlenmeyers de 1000 mL contendo 100 mL de caldo Czapek, totalizando 400 mL de caldo. A fermentação foi realizada em modo estático, em estufa DBO a 28 °C, por 20 dias e em modo agitado em *shaker* a 28 °C e 250 rpm por 15 dias. Um dos experimentos em modo agitado foi realizado em 7 dias, utilizando as mesmas condições.

Para o co-cultivo em meio agitado foram adicionados, simultaneamente, ao mesmo erlenmeyer dois discos de cada fungo, ou seja, quatro fragmentos, sendo *Lasiodiplodia* + *Preussia*, totalizando 400 mL de meio para cada co-cultivo.

Já para o co-cultivo em modo estático, inicialmente foi adicionado o fungo *Preussia* em quatro erlenmeyers contendo 100 mL do caldo Czapek, em estufa DBO a 28 °C. Após sete dias, foram inoculados aos erlenmeyers contendo o fungo *Preussia* mais dois fragmentos do fungo *Lasiodiplodia*.

4.4 OBTENÇÃO DE EXTRATOS ORGÂNICOS SECOS

Após os cultivos dos fungos puros e das culturas mistas, o caldo de fermentação foi submetido à filtração à vácuo utilizando papel de filtro Whatman nº1, para retirada do micélio, seguida de extração líquido-líquido com acetato de etila como solvente orgânico, realizado em três etapas semelhantes, na proporção final 1:1 ($V_{\text{caldo fermentado}}/V_{\text{solvente orgânico}}$).

Os extratos obtidos na fermentação estática foram identificados como Pest (*Preussia*), Lest (*Lasiodiplodia*) e LPest (*Preussia* + *Lasiodiplodia*) e os obtidos na fermentação agitada foram identificados como Pag (*Preussia*), Lag (*Lasiodiplodia*), LP15 (*Preussia* + *Lasiodiplodia*- Cultivo 15 dias) e LP7 (*Preussia* + *Lasiodiplodia* – Cultivo de 7 dias). O solvente orgânico foi evaporado em rotaevaporador, e as massas dos extratos foram medidas em balança analítica.

Tanto os extratos acetato de etila das fermentações com o fungo puro, como das fermentações mistas foram avaliados quanto seu potencial antimicrobiano e antioxidante.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.5.1 Patógenos e preparo dos inóculos para ensaios antimicrobianos

Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) disponíveis no Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL-MG, Alfenas. Estas cepas foram previamente cultivadas (24 horas antes) e suas suspensões preparadas utilizando espectrofotômetro, a partir de solução salina (NaCl 0,9%) estéril, de modo a fornecer $1,5 \times 10^8$ UFC/mL unidades formadoras de colônias por mililitro (75% de transmitância em 660nm), correspondente à escala 0,5 de McFarland. Para a realização destes ensaios foi adotado procedimento descrito por CLSI (2006, 2008) com algumas

modificações.

4.5.2 Determinação da atividade antimicrobiana

Para a determinação da atividade antimicrobiana utilizaram-se placas de 96 poços onde adicionaram-se 100 μL de meio Caldo Müeller Hinton (CMH) em cada poço de amostra.

Para o preparo de cada amostra foi utilizado 1 mg de amostra dissolvido em 125 μL de etanol absoluto, originando uma solução de concentração igual a 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como são realizadas diluições seriadas, o primeiro poço na placa irá corresponder à concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A seguir, 20 μL da amostra solubilizada em etanol e 80 μL de meio CMH foi adicionado ao primeiro poço de cada fileira da placa.

A diluição da amostra na microplaca se iniciou a partir da transferência de 100 μL do primeiro poço para os poços consecutivos, até o último poço. Do último poço, 100 μL foram desprezados, para que todos os poços apresentassem um volume de 100 μL . Após a diluição, 80 μL de meio CMH e 20 μL do patógeno previamente preparado, foram transferidos para todos os poços, exceto para os controles.

O volume final em cada poço foi de 200 μL . Alguns poços foram utilizados para controle: de crescimento do inóculo, de esterilidade do meio de cultura, do solvente utilizado na solubilização do extrato (álcool etílico absoluto) e de esterilidade do extrato avaliado.

As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, para posterior adição do revelador resazurina e leitura após 2 h. Foi inserido uma solução de 0,2% de resazurina em todos os poços (20 μL por poço), sendo um corante indicador de viabilidade celular de cor inicialmente azul. Após a incubação das microplacas, a presença de coloração azul é indicativa de extrato com ação bacteriostática/fungistática frente ao microrganismo testado. Coloração púrpura, rosa ou incolor, evidencia resistência do microrganismo ao extrato em estudo (SARKER *et al.*, 2007).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais nos extratos foi determinado a partir da metodologia descrita por Pires et al. (2017), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. O reagente Folin-Ciocalteu é uma solução complexa de íons formados a partir de ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico, que são reduzidos a partir dos extratos com propriedades antioxidantes. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo-os a um complexo azul composto por Mo-W, juntamente com a adição de carbonato de sódio, podendo ser medido por espectrofotometria.

Para isso, foram utilizadas placas de 96 poços, em cada micropoço da placa foram adicionados 20 μL dos extratos derivados do cultivo dos fungos (com aproximadamente $0,50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), padrões de ácido gálico nas concentrações entre $20\text{--}120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, branco (água) ou controle (etanol) mais reagente Folin-Ciocalteu 10% (100 μL) e solução de carbonato de sódio à 7,5% (75 μL). Os reagentes foram homogeneizados e deixados em repouso, ao abrigo da luz durante 40 minutos, com posterior leitura no comprimento de onda de 740 nm. Os dados obtidos foram utilizados para estimar as concentrações de CFT, a partir da curva de calibração com os padrões de ácido gálico, sendo os resultados expressos em microgramas de equivalência de ácido gálico (EAG) por mg de extrato. Foram realizados dois ensaios, em dias diferentes, de atividade antioxidante por CFT, sendo cada ensaio realizado em triplicata.

4.6.2 Sequestro do radical DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de comprimento de onda entre 515-520nm. A redução do radical DPPH ocorre na presença de um doador de hidrogênio ou elétron. Quando o radical DPPH recebe um átomo de hidrogênio proveniente de compostos antioxidantes, ocorre mudança de cor de roxo para amarelo. A intensidade de absorção, portanto, diminui, pois, a solução com o radical perde cor, de acordo com o número de elétrons capturados.

Para esta análise do sequestro de radicais DPPH foi utilizada metodologia descrita por Al-Duais *et al.* (2009). Foram pipetados e inseridos em cada poço da

microplaca 66 μL dos extratos preparados nas concentrações próximas de 0,50 mg.mL^{-1} e 134 μL de DPPH 150 μM . Para o controle foi necessário pipetar 66 μL de etanol ao invés do extrato. O branco foi preparado com etanol (200 μL). Os reagentes foram homogeneizados e mantidos em contato por 45 minutos ao abrigo da luz. A microplaca foi inserida no leitor em 517 nm. A atividade antioxidante foi expressa em equivalentes ao Trolox (ET), ($\mu\text{mol ET/grama de extrato}$), através da equação da reta obtida do gráfico da curva de calibração. A curva foi construída plotando-se a concentração de Trolox (20-140 μM) no eixo x e a absorbância no eixo y. A atividade antioxidante, em %, foi calculada utilizando-se a equação abaixo:

$$AA(\%) = \left(1 - \frac{Aa}{Ac}\right) * 100$$

Onde: AA(%): Atividade Antioxidante em %,

Aa: Absorbância da amostra,

Ac: Absorbância do controle.

Foram realizados dois ensaios, em dias diferentes, de atividade antioxidante por sequestro do radical DPPH, sendo cada ensaio realizado em triplicata.

4.6.3 Redução do ferro (FRAP)

O potencial antioxidante segundo o método do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) se baseia em reações de transferência de elétrons. O complexo formado da solução de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) com o Fe (III) cuja cor é amarelo ferrugem, na presença de um antioxidante, tem a capacidade de reduzir o ferro III a ferro II, dando origem ao complexo $[\text{Fe(II)(TPTZ)}_2]^{3+}$, de colocação azul escura, a leitura de absorbância deve ser realizada em 595 nm.

Em cada poço da microplaca de 96 poços, foi adicionado 20 μL das amostras (aproximadamente 0,50 mg.mL^{-1}), padrões de sulfato ferroso na concentrações entre 100-700 μM ou de água para o branco, mais 30 μL água destilada e 200 μL do reagente FRAP, preparado no momento da análise. Após incubação à 37°C, durante 8 minutos, a microplaca de 96 poços foi inserida no equipamento e realizada a leitura no comprimento de onda de 595 nm, segundo a metodologia descrita por Muller *et al.* (2010). A atividade antioxidante foi determinada em equivalentes ao

sulfato ferroso, por meio da equação da reta obtida do gráfico da curva de calibração, sendo os valores expressos em micromol (μmol) de equivalência de FeSO_4 por grama de extrato fúngico.

4.7 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para se verificar o perfil químico das substâncias presentes em cada cultivo dos fungos, seja puro ou em co-cultivo, realizou-se uma análise comparativa dos extratos acetato de etila por cromatografia em camada delgada. Para este procedimento, os extratos foram ressuspensos em seus respectivos solventes de extração na concentração de 10 mg.mL^{-1} , sendo aplicados $2 \mu\text{L}$ do extrato solubilizado em cromatoplasmas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência ultravioleta (UV - 254 nm) (MACHEREY-NAGEL). Em seguida, as cromatoplasmas foram eluídas com acetato de etila:acetona:metanol na proporção (9:0,9:0,1; v:v:v). Como reveladores foram utilizados a luz UV 254 e 365 nm (cromóforos e duplas ligações conjugadas) e o revelador químico cloreto férrico (compostos fenólicos – bandas de coloração cinza escura) (ROWAIYE *et al.*, 2020).

4.8 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Cerca de 10 mg de cada extrato foi ressuspensado em $500 \mu\text{L}$ de solvente deuterado (CDCl_3) e submetidos à análise de RMN de ^1H (equipamento Bruker AC300 operando a 300 MHz para frequência do hidrogênio e 75 MHz para frequência do carbono, equipado com sonda BBO de 5 mm ATMA®). Foi utilizado o software TopSpin versão 4.0.9 para a análise dos espectros.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

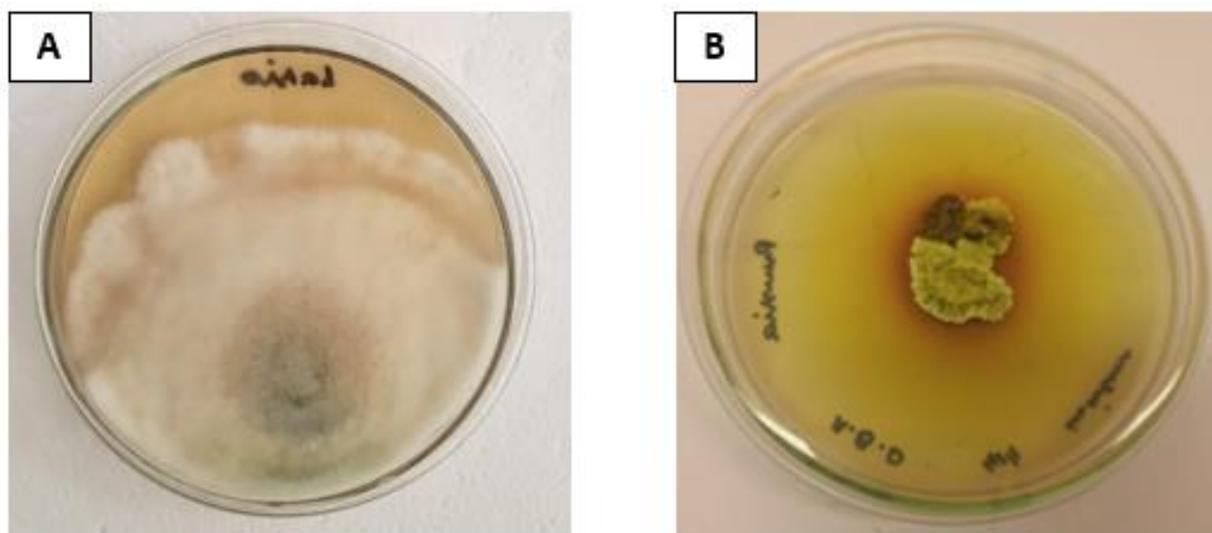
5.1 CULTIVO DOS FUNGOS

Os gêneros *Lasiodiplodia* e *Preussia* foram cultivados em ágar batata dextrose, onde o *Lasiodiplodia* cresceu em aproximadamente quatro dias e o *Preussia* levou em média quinze dias, os cultivos em placas foram realizados em temperatura ambiente.

Ao 4º dia foi possível observar que o gênero *Lasiodiplodia*, apresentou micélios aéreos moderadamente densos, de coloração branca e após quatro dias micélios aéreos espessos, de coloração cinza.

Para o gênero *Preussia*, foi observado que com quinze dias, o fungo atingiu crescimento satisfatório em placa, sendo esse crescimento pontual, com micélio amarronzado e com hifas muito pequenas, como mostra a Figura 5.

Figura 5 - Fotografias dos cultivos isolados dos fungos em meio ágar batata dextrose.

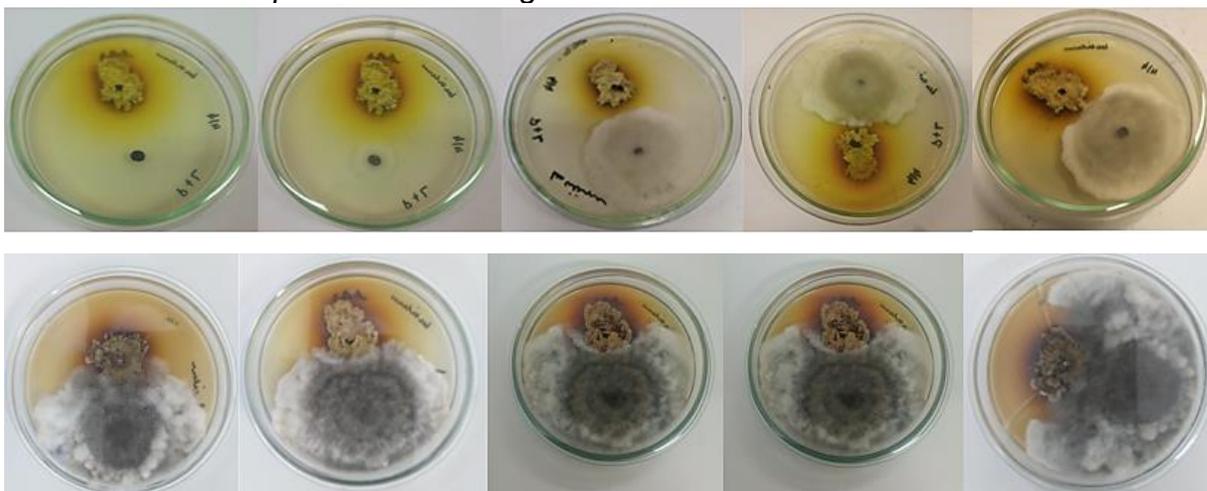


Fonte: UNIFAL-MG (2021).

Legenda: (A) Gênero *Lasiodiplodia*
(B) Gênero *Preussia*

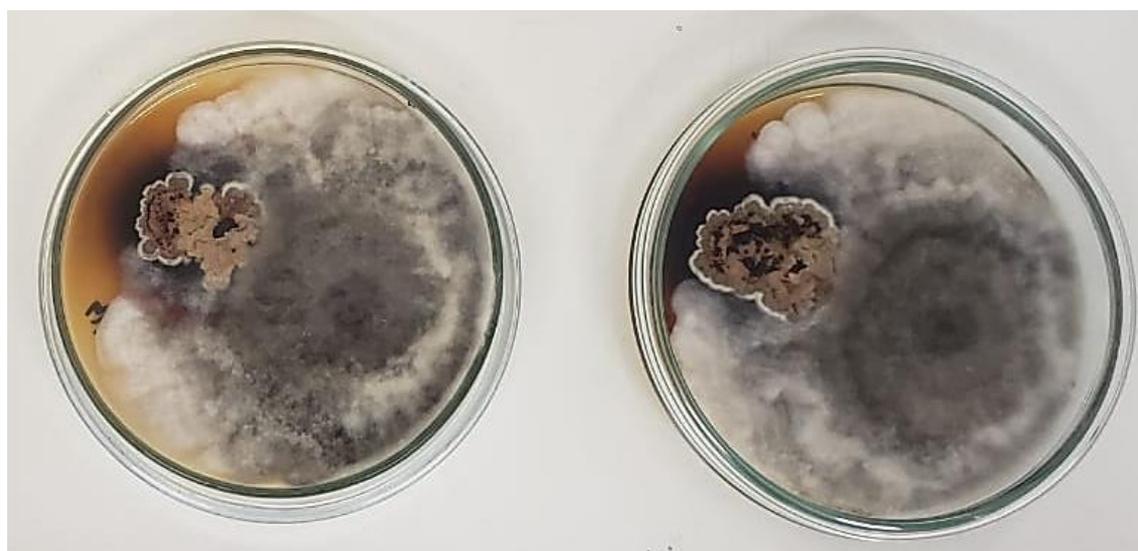
O co-cultivo dos fungos *Preussia* + *Lasiodiplodia* foi acompanhado diariamente após o início do crescimento do fungo *Preussia*, o qual foi inoculado primeiro na placa devido seu lento crescimento. O gênero *Lasiodiplodia* foi inoculado na mesma placa após 11 dias de cultivo do *Preussia*, como apresentam as fotografias das Figuras 6 e 7.

Figura 6 – Fotografias do acompanhamento do co-cultivo dos fungos *Preussia* e *Lasiodiplodia* em meio ágar batata dextrose do 11º dia ao 17º dia.



Fonte:UNIFAL-MG(2021).

Figura 7 – Fotografia do co-cultivo do fungo *Preussia* e *Lasiodiplodia* no 18º dia.



Fonte:UNIFAL-MG(2021).

O fungo *Lasiodiplodia* apresenta, em placa, uma velocidade de crescimento maior em relação ao fungo *Preussia*, por este motivo, o *Preussia* foi inoculado 11 dias antes do *Lasiodiplodia*. Durante o co-cultivo notou-se que mesmo crescendo de maneira mais rápida, o fungo *Lasiodiplodia* circundou o fungo *Preussia*, possivelmente, por este último produzir substâncias que impossibilitaram o *Lasiodiplodia* crescer sobre o *Preussia*, o que indicaria um mecanismo de defesa do fungo.

Segundo a literatura, Omura (1992) relata que quando existem dois ou mais microrganismos em um mesmo ambiente, em resposta ao estresse ambiental e a competição por nutrientes pode ocorrer ativação de mecanismos de defesa. O estresse causado pelo cultivo de duas espécies também pode ser induzido por alterações físico-químicas, resultando na produção de metabólitos únicos não associados ao cultivo quando na forma isolada. Tanto níveis altos quanto baixos de certos nutrientes podem alterar o metabolismo dos fungos, desencadeando a ativação de novas vias biossintéticas (AMNA *et al.*, 2012).

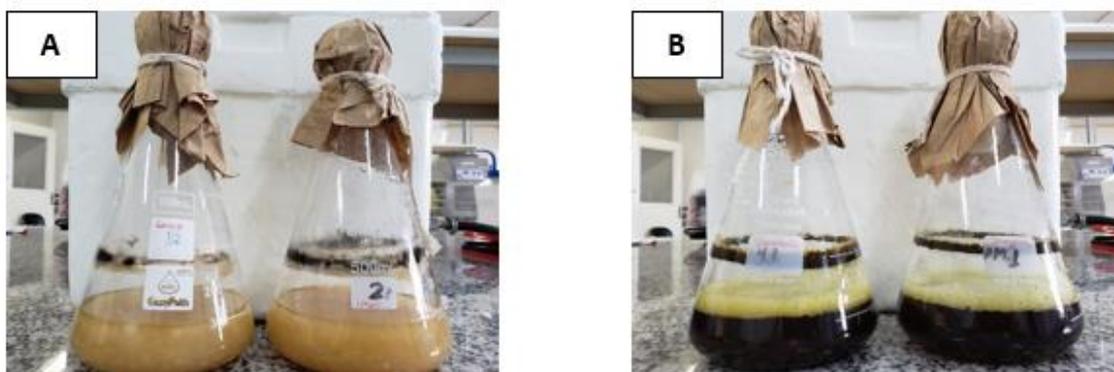
Estudos genéticos indicaram que os genes que codificam as vias do metabolismo secundário estão agrupados no genoma microbiano. Alguns desses genes não podem ser expressos em condições de cultura padrão porque sua ativação depende de estímulos ambientais e, portanto, uma minoria de metabólitos secundários são investigados *in vitro* (SCHERLACH & HERTWECK, 2009). Quando os microrganismos são cultivados juntos, como é o caso da co-cultura, ocorre o desencadeamento de vias biossintéticas silenciosas específicas, principalmente aquelas relacionadas à defesa, induzindo a produção de metabólitos secundários bioativos (BERTRAND *et al.*, 2014; NASCIMENTO *et al.*, 2020).

5.2 CULTIVO E CO-CULTIVO DOS FUNGO EM MEIO AGITADO

5.2.1 Meio Agitado

O cultivo submerso do gênero *Lasiodiplodia*, forneceu um caldo amarelado com grumos esbranquiçados e material sedimentado nas paredes dos erlenmeyers na coloração escura. Para o gênero *Preussia* observou-se caldo de coloração escura e espuma amarelada. Os aspectos dos cultivos isolados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8 - Cultivo dos fungos em meio agitado, em *shaker* com 250 rpm, por 15 dias, a 28 °C utilizando caldo Czapek.

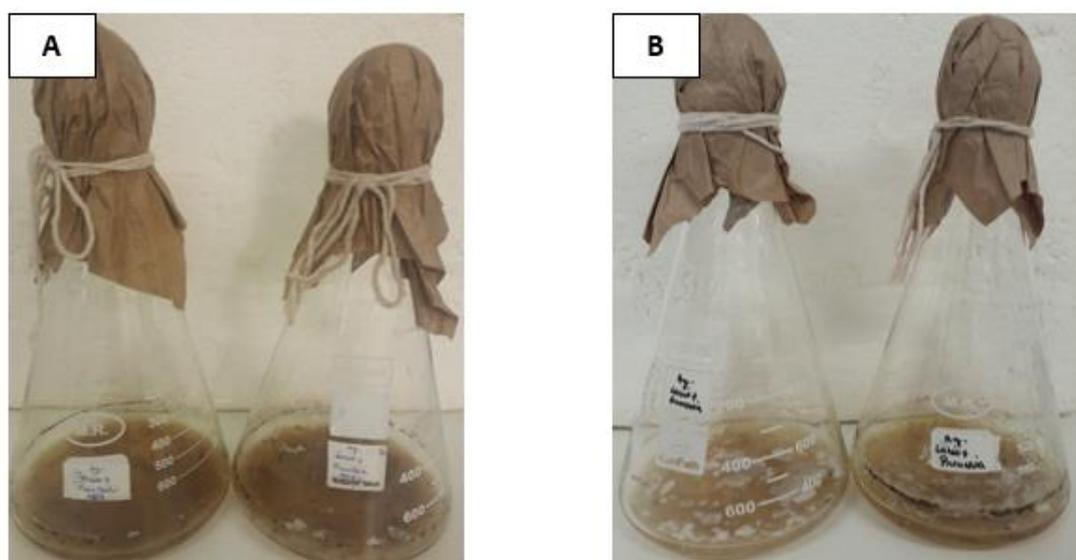


Fonte: UNIFAL-MG (2021).

Legenda: (A) Gênero *Lasiodiplodia*
(B) *Preussia africana*.

Para o co-cultivo, foram inoculados ao mesmo tempo os fungos *Lasiodiplodia* + *Preussia* utilizando-se as mesmas condições do cultivo das culturas isoladas. Em tal combinação notou-se a formação de um extrato amarronzado com grumos evidentes e com material sedimentado em parede do erlenmeyer na coloração escura (Figura 9).

Figura 9 - Co-cultivo dos fungos em meio agitado, em *shaker* com 250 rpm, por 15 dias, a 28 °C utilizando caldo Czapek.



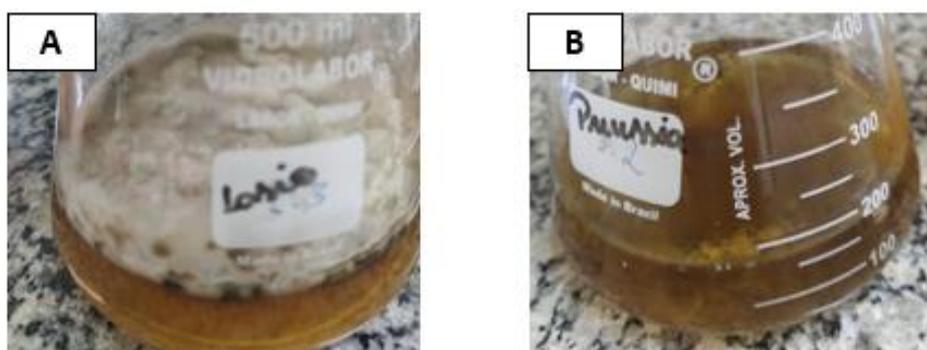
Fonte: UNIFAL-MG (2021).

Legenda: (A) *Lasiodiplodia* + *Preussia* (por 15 dias)
(B) *Lasiodiplodia* + *Preussia* (por 7 dias)

5.2.2 Meio Estático

Com o crescimento do fungo do gênero *Lasiodiplodia*, o caldo de cultivo adquiriu coloração alaranjada com uma camada espessa de hifas e pouco material sedimentado nas paredes dos erlenmeyers na coloração escura. Já para o gênero *Preussia*, foi observado extrato de coloração amarronzada e com grumos amarelados (Figura 10).

Figura 10 - Cultivo dos fungos *Lasiodiplodia* e *Preussia* em meio estático, utilizando caldo Czapek em estufa DBO a 28 °C por 20 dias.



Fonte: UNIFAL-MG (2021).

Legenda: (A)*Lasiodiplodia*
(B)*Preussia Africana*

Para o co-cultivo dos gêneros *Lasiodiplodia* + *Preussia* em meio estático, o caldo adquiriu aspecto amarronzado com tapete espesso de hifas brancas/acinzentadas, conforme mostra a Figura 11.

Figura 11 – Co-cultivo dos fungos em meio estático, utilizando caldo Czapek em estufa DBO a 28 °C por 20 dias *Lasiodiplodia* + *Preussia*.



Fonte: UNIFAL-MG (2021).

5.3 OBTENÇÃO DE EXTRATOS ACETATO DE ETILA

Após os cultivos dos fungos puros e das culturas mistas em erlenmeyers, o caldo de cultivo foi submetido à filtração à vácuo para retirada dos micélios e em seguida à extração líquido-líquido com acetato de etila como solvente orgânico, realizado em três etapas semelhantes, na proporção 1:1 (v caldo fermentado 400 mL/v solvente orgânico 400 mL). Esse método foi utilizado para todos os cultivos. Em modo agitado, tanto para cultivos puros como para os co-cultivos houve maior dificuldade de extração devido à formação de emulsão, sendo necessário maior tempo para separação do solvente orgânico e do caldo, representado pelo meio aquoso.

Após a evaporação do solvente as massas dos extratos orgânicos foram medidas e se encontram na Tabela 1:

Tabela 1 - Massas dos extratos AcOEt obtidos após cultivo em meio estático e agitado das linhagens puras e de co-cultivo.

Amostras	Massa Extratos AcOEt
Meio Agitado	(mg)
<i>Lasiodiplodia</i>	32,0
<i>Preussia</i>	154,2
<i>Preussia + Lasiodiplodia (15 dias)</i>	132,8
<i>Preussia + Lasiodiplodia (7 dias)</i>	53,6
Meio Estático	(mg)
<i>Lasiodiplodia</i>	137,8
<i>Preussia</i>	11,5
<i>Preussia +Lasiodiplodia (20 dias)</i>	119,5

Fonte: UNIFAL-MG (2021).

De acordo com os resultados preliminares observados na Tabela 1, verificou-se, em relação às cepas puras, que o fungo *Preussia africana* produziu maior massa em substâncias obtidas a partir do extrato acetato de etila quando o cultivo foi realizado em meio agitado (154,2 mg), enquanto o fungo do gênero *Lasiodiplodia* o fez em meio estático (137,8 mg), estes resultados estão de acordo com resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório. Quando as espécies foram misturadas *Preussia+Lasiodiplodia*, verificou-se melhor massa quando o cultivo foi realizado em meio agitado por 15 dias (132,8 mg). Devido às baixas massas dos extratos orgânicos de *Lasiodiplodia* em meio agitado (32 mg) e de *Preussia* em meio estático (11,5 mg), os extratos não foram avaliados em experimentos de atividades biológicas nem por CCD e RMN.

Em estudos realizados por Vieira et al. (2008), foi observado que ao se cultivar duas espécies de fungos, *Polyporus tricholoma* CCB-684 e *Polyporus tenuiculus* CCB-685 em meio submerso, os melhores resultados para produção de substâncias naturais foi com o cultivo em meio agitado, ocorrendo maior crescimento dos fungos em relação ao cultivo em meio estático, o que pode ser explicado devido a homogeneização do mesmo, fornecendo mais oxigênio disponível aos fungos, que pode favorecer a produção de antibióticos e outros metabólitos. O composto majoritário produzido foi o isodrimendiol, produzido pelo fungo *Polyporus tricholoma* com atividade contra *Staphylococcus aureus*.

Por outro lado, em experimento realizado com fungos endofíticos da planta *Eugenia brasiliensis* e a avaliação do co-cultivo entre *Xylaria cubensis*, *Diaporthe* sp.

e *Colletotrichum* sp., para a obtenção de novas substâncias, o cultivo submerso realizado em modo estático favoreceu o aparecimento de novas substâncias no extrato acetato de etila, destacando entre elas excelente resultado antifúngico contra o fitopatógeno *Cladosporium cladosporioides* (BIASETTO, 2016).

5.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.4.1 Atividade antimicrobiana dos extratos AcOEt contra *S. aureus*, *albicans* e *P. aeruginosa*.

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada tanto para as culturas axênicas dos fungos como para os co-cultivos e se encontra na Tabela 2. Foram avaliadas a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração microbicida mínima (CMM) para cada patógeno testado.

Tabela 2 - Atividade antimicrobiana e antifúngica das fermentações em meio estático e agitado.

Extratos		CIM	CMM	CIM	CMM	CIM	CMM
		($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
		<i>S. aureus</i>		<i>C. albicans</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
Lasio	+	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Preussia	-						
Estático							
Lasio	+	>400	>400	>400	>400	>400	>400
Preussia	-						
15 Dias							
Lasio	+	200-400	>400	>400	>400	>400	>400
Preussia	-						
7 Dias							
Preussia	-	200-400	>400	>400	>400	>400	>400
Agitado							
Lasio - Estático		200-400	>400	>400	>400	>400	>400
Amoxicilina		2,5-5	--	--	--	--	--
Fluconazol		--	--	0,625-1,25	--	--	--

Fonte: UNIFAL-MG (2021).

-- não avaliado

Considerando os resultados da Tabela 2, os cultivos puros do gênero

Lasiodiplodia em modo estático e o *Preussia* em modo agitado apresentaram resultados de concentração inibitória mínima contra o patógeno *S. aureus* entre 200-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Também, verificou-se as melhores atividades para o co-cultivo de *Lasiodiplodia+Preussia* em meio agitado sendo cultivado em shaker por 7 dias apresentadas pelos extratos acetato de etila com valores de CIM entre 200-400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra o patógeno *S. aureus*.

Desta forma, os melhores resultados são considerados moderados de acordo com os critérios estabelecidos por Holetz (2002), que define a ação antimicrobiana como forte $<100 \mu\text{g.mL}^{-1}$, moderada $100-500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, fraco $500-1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e inativo $>1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Não houve atividade significativa contra *C. albicans* e *P.aeruginosa*, todos os valores com CIM $>400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, neste experimento. Todos os cultivos, tanto dos fungos puros, como em co-cultivo apresentaram apenas atividade bacteriostática e fungistática. Não houve resultados abaixo de $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ o que indicaria ação bactericida/fungicida dos extratos. Os valores encontrados para CIM não foram muito satisfatórios, porém, deve-se considerar que por se tratarem de extratos brutos, podem estar ocorrendo ações antagonistas entre os compostos presentes nos extratos, não sendo possível determinar a atividade com exatidão (DZOYEM *et al.*, 2017).

Ao que tudo indica, podem haver limites entre as misturas dos compostos para obter efeito sinérgico. O fracionamento de extratos demonstra ser uma técnica conveniente para aumentar a atividade antibacteriana conforme sugere o trabalho realizado em nosso laboratório, onde frações obtidas do fracionamento de extratos de clorofórmio e acetato de etila obtidos do cultivo do fungo *Lasiodiplodia* sp. (mesmo fungo estudado neste trabalho), foram testados contra cepas microbianas gram-positivas, gram-negativas e leveduras. A maior inibição encontrada para as frações foi contra patógenos gram-positivos e leveduras, indicando o aumento de atividade antimicrobiana devido à maior concentração de compostos bioativos após o fracionamento (GOMEZ *et al.*, 2021).

Em relação à influência do fracionamento de extratos e frações, na atividade biológica, alguns autores descrevem resultados interessantes. Em estudos realizado por Jalil e Ibrahim (2022), com o objetivo de investigar os possíveis compostos bioativos presentes no extrato de acetato de etila do fungo do gênero *Lasiodiplodia*, os autores relataram que o extrato apresentou atividade antimicrobiana significativa

contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, mas que as bactérias gram-positivas foram mais suscetíveis ao extrato em comparação com as gram-negativas. Assim, os autores explicaram que tal resultado pode ter ocorrido devido à sensibilidade diferente das bactérias em relação ao extrato devido às diferenças estruturais e morfológicas entre os dois patógenos.

Neste sentido, o presente estudo demonstrou que os extratos obtidos através do co-cultivo do fungo *Lasiodiplodia* e seu cultivo único foram suscetíveis a ação bacteriana contra uma bactéria gram-positiva. A dificuldade em analisar alguns extratos obtidos pode estar relacionada à complexidade da membrana das bactérias gram-negativas que não permite sua interação com o extrato, não sendo, portanto, afetada pelo mesmo (BEVERIDGE, 1999).

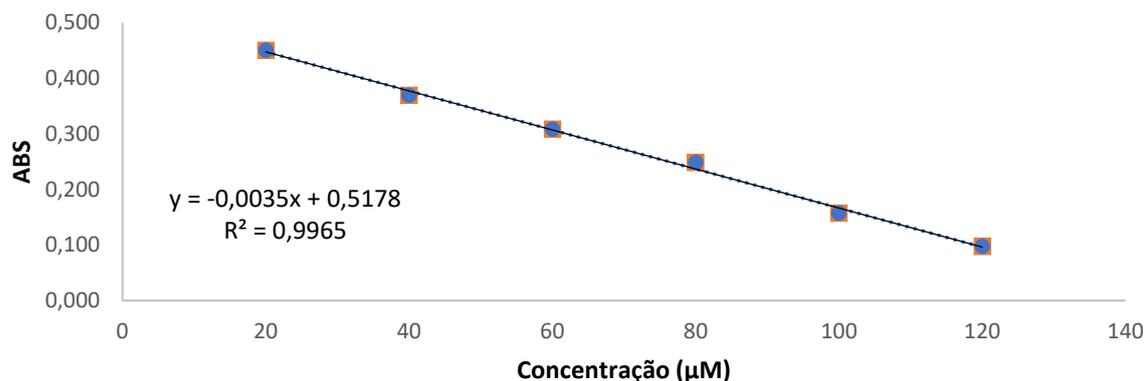
5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Neste trabalho, os extratos obtidos a partir do cultivo e co-cultivo dos fungos *Preussia africana* e *Lasiodiplodia* sp. foram avaliados em relação à atividade antioxidante pelos métodos do sequestro de radicais DPPH, método de fenólicos totais Folin-Ciocalteu e redução de íons Fe^{+3} (FRAP).

5.5.1 Determinação do sequestro de radicais DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante utilizando-se o método de sequestro de radicais DPPH, foi construída uma curva de calibração utilizando-se o padrão de trolox. A partir do gráfico (Figura 12) foi obtida a equação $y = -0,0035x + 0,5178$ por regressão linear cujo coeficiente de regressão foi igual a 0,9965. A partir da equação de reta foi calculada concentração de antioxidantes presente no micropoço, expressas em concentração equivalente de trolox (μM). Com esta concentração, calculou-se a atividade antioxidante do extrato em equivalente de trolox ($\mu\text{mol}/\text{grama de extrato}$) por gramas de extrato. Com a equação descrita no item 4.6.2 foi calculada a % de DPPH reduzida.

Figura 12 - Curva de calibração com trolox do ensaio 1.



Fonte: UNIFAL-MG (2021).

A porcentagem de sequestro do radical DPPH se encontra na Tabela 3, na qual, estão apresentados os resultados referentes aos ensaios de sequestro de radicais DPPH com os extratos orgânicos obtidos a partir do cultivo e co-cultivo dos fungos estudados neste trabalho. Foram realizados dois ensaios e cada um em triplicata.

Tabela 3 - Resultados de sequestro do radical DPPH dos extratos de fungos (Ensaio 1 e 2).

Extratos Brutos- AcOEt	Média [antioxidante] no micropoço expressa em equivalente [Trolox] (µM)		Média Atividade antioxidante da amostra expressa em equivalente Trolox (µmol/grama de extrato)		%	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
Lasio + Preussia Estático	93,09	63,48	179,01	122,09	62,67	48,12
Lasio + Preussia Ag. 15 Dias	30,13	28,13	62,78	58,61	19,83	29,32
Lasio + Preussia Ag. 7 Dias	68,90	61,57	143,53	128,26	46,21	47,10
Preussia – Agitado	136,61	135,00	262,71	259,62	92,29	86,14
Lasio – Estático	61,56	42,27	123,12	84,55	41,22	36,84

Fonte: UNIFAL-MG (2021).

Foi possível observar que as maiores porcentagens de eliminação de radicais DPPH foram obtidas para o fungo do gênero *Preussia* cultivado em modo agitado e para os co-cultivos de *Lasiodiplodia + Preussia* estático, cujos valores ficaram entre 86-92% e 48-62%, respectivamente. Os menores valores para a % de DPPH reduzido foram obtidos para o co-cultivo entre *Lasiodiplodia + Preussia* agitado por

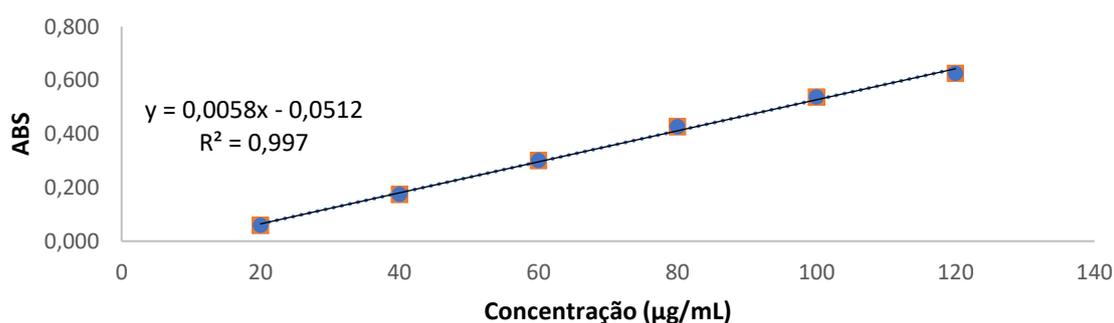
15 dias. Os ensaios para eliminação de radicais livres DPPH é amplamente utilizado para testar a atividade antioxidante, onde uma maior porcentagem de eliminação corresponde a uma maior atividade antioxidante do extrato testado (CAICEDO *et al.*, 2019).

Ao avaliar a capacidade antioxidante de frutas *in natura*, Melo et al. (2008) classificaram em forte poder antioxidante os extratos com valores de sequestro de radicais DPPH > 70%, moderado entre 50 e 70 % e fraco < 50%. Ao considerar a classificação destes autores, pode-se considerar que o co-cultivo de *Lasiodiplodia* + *Preussia* estático apresentou forte poder antioxidante frente aos radicais DPPH.

5.5.2 Determinação de fenólicos totais (FT)

Para a determinação de fenólicos totais (FT) foi construída uma curva de calibração utilizando-se como padrão o ácido gálico (AG). Foi obtida a equação $y=0,0058x - 0,0512$, através da regressão linear, como mostra o gráfico da Figura 13, com r^2 igual a 0,997. Com a equação da reta foi calculada a concentração de compostos fenólicos totais em cada micropoço expressa em equivalente de ácido gálico ($\mu\text{g/mL}$) e ao se considerar a concentração do extrato utilizada foi possível calcular o teor de fenólicos totais (FT) expressos em microgramas de equivalente de AG por miligramas de extrato.

Figura 13 – Curva de calibração utilizando ácido gálico, ensaio 1.



Fonte: UNIFAL-MG (2021).

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados referentes aos ensaios de FT com os extratos orgânicos obtidos a partir dos cultivos puros e dos co-cultivos dos fungos dos gêneros *Lasiodiplodia* e *Preussia*. Foram realizados dois ensaios e cada

um deles em triplicata. O teor de FT nos extratos foi obtido ao se correlacionar a absorbância em 760 nm dos padrões de AG após a reação redox com cada extrato obtido a partir dos cultivos.

Tabela 4 - Resultados fenólicos totais dos extratos de fungos (Ensaio 1 e 2)

Extratos Brutos AcOEt	[Fenólicos Totais] no micropoço expressa em [Ácido Gálico] equivalente (µg/mL)		Teor de Compostos Fenólicos Totais da amostra expressa em equivalente de Ácido Gálico (µg/mg de extrato)	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
<i>Lasio + Preussia</i> – Estático	66,01	82,71	126,95	159,06
<i>Lasio + Preussia</i> – Ag. 15 Dias	38,37	58,95	79,93	122,82
<i>Lasio + Preussia</i> – Ag. 7 Dias	76,64	92,05	159,67	191,77
<i>Preussia</i> – Agitado	175,72	192,80	337,93	370,77
<i>Lasio</i> – Estático	38,71	38,34	77,43	76,69

Fonte: UNIFAL-MG (2021).

Ao se analisar os dados expressos na Tabela 4, foi possível inferir que os extratos que apresentaram maior teor de FT foram aqueles obtidos a partir dos co-cultivos entre *Lasiodiplodia + Preussia* em modo agitado por 7 dias, cujos valores foram de 159,67 – 191,77 µg EAG/mg extrato, *Lasiodiplodia + Preussia* em modo estático 126,95 – 159,06 µg EAG/mg extrato e para o cultivo puro do fungo *Preussia* em modo agitado 337,93 - 370,77 µg EAG/mg extrato. Após 15 dias do cultivo *Lasiodiplodia + Preussia* em modo agitado, notou-se uma diminuição no teor de FT (79,93 – 122,82 µg EAG/mg extrato) que pode ter ocorrido devido a um possível término de nutrientes para os fungos, havendo consumo dos metabólitos produzidos.

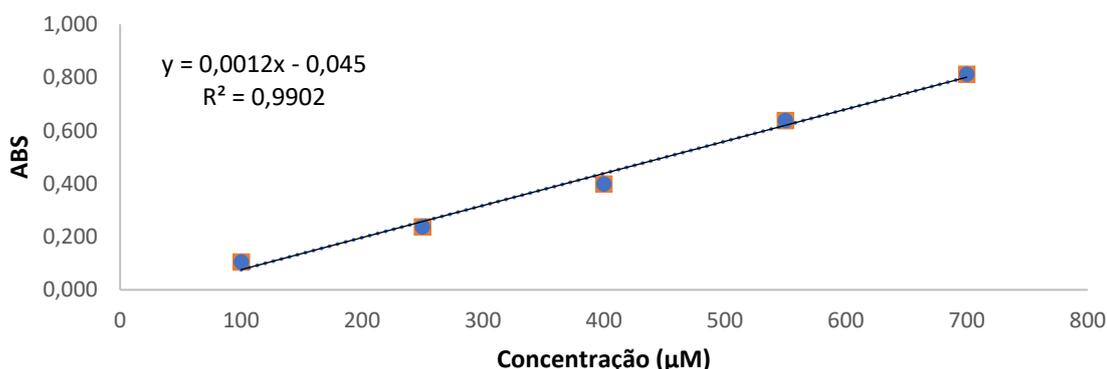
Autores como Hassane *et al.* (2022) e Prima *et al.* (2022) relataram que os extratos acetato de etila (AcOEt) apresentam elevados índices de compostos fenólicos. Marsola *et al.* (2022) ao estudarem a atividade antioxidante do fungo endofítico *Brunfelsia uniflora* detectaram teores de FT entre 55,3 – 67,6 µg EAG/mg extrato, os autores consideraram estes valores satisfatórios.

A presença de compostos fenólicos nos extratos AcOEt dos cultivos fúngicos estão associados à atividade antioxidante apresentada pelos mesmos, mas isso não significa que não possa existir outras moléculas em cada um dos extratos que atuem de forma sinérgica para resultar em tal atividade. Por este motivo, é necessário a análise dos extratos por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

5.5.3 Avaliação da redução de íons Fe³⁺ (FRAP)

Foi construída uma curva de calibração (Figura 14) utilizando-se como padrões diferentes concentrações de FeSO_4 e os resultados foram expressos em equivalentes de FeSO_4 em micromol por grama de extrato. A equação da reta obtida por regressão linear e seu respectivo coeficiente de regressão encontram-se no gráfico.

Figura 14 - Curva de calibração FeSO_4 .



Fonte: UNIFAL-MG (2021).

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados referentes aos ensaios de redução dos íons Fe^{3+} com os extratos orgânicos obtidos a partir dos cultivos dos fungos. Este ensaio foi realizado em triplicata.

Tabela 5 - Resultados de redução de íons Fe^{3+} dos extratos dos cultivos dos fungos.

Extratos Brutos AcOEt	[Antioxidante] no micro poço expressa em [Sulfato Ferroso] equivalente (μM)	Atividade redox da amostra expressa em equivalente Sulfato Ferroso ($\mu\text{mol}/\text{grama de}$ extrato)
<i>Lasio + Preussia - Estático</i>	423,89	815,17
<i>Lasio + Preussia - Ag. 15 Dias</i>	406,11	846,06
<i>Lasio + Preussia - Ag. 7 Dias</i>	368,61	767,94
<i>Preussia - Agitado</i>	399,44	768,16
<i>Lasio - Estático</i>	307,22	614,44

Fonte: UNIFAL-MG (2021).

De acordo com os valores obtidos, a atividade antioxidante em termos de poder redutor de íons Fe^{3+} foram maiores para os cultivos *Lasiodiplodia + Preussia* em modo agitado por 15 dias e *Lasiodiplodia + Preussia* em modo estático, seguido pelo cultivo do fungo puro *Preussia* com valores de 846, 815 e 768 equivalentes de

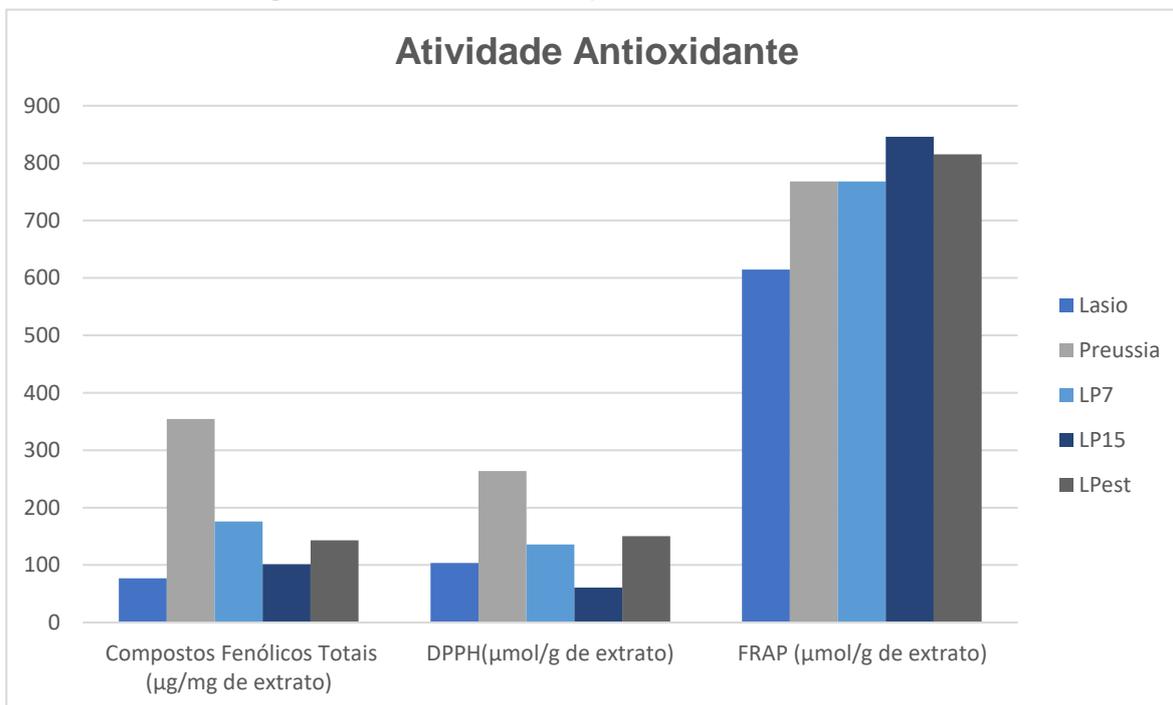
sulfato ferroso em $\mu\text{mol/grama}$ de extrato, respectivamente. A atividade antioxidante em termos de poder redutor de íons férricos obtidas por meio dos extratos acetato de etila dos cultivos puros e co-cultivo apresentaram valores significativos.

Existem diversos métodos usados para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias isolados de fontes naturais, que envolvem desde ensaios químicos com determinados substratos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais. Devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, não existe um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida de forma precisa (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). Assim, a busca por testes mais rápidos e eficientes tem oferecido diversos métodos para avaliar a atividade de antioxidantes naturais pelo uso de sistemas que geram radicais livres. Os métodos utilizados para avaliação da atividade antioxidante baseiam-se em duas frentes, uma delas que é a identificação de substâncias que capturam radicais livres e a outra que é a determinação da oxidação de uma molécula específica. Desta forma, torna-se necessário avaliar o potencial antioxidante por diferentes metodologias (ALVES *et al.*, 2010).

Agentes quelantes podem ser considerados como antioxidantes secundários, pois não agem diretamente inibindo os radicais livres (GÜLÇİN *et al.*, 2005). Eles têm como função quelar íons Fe^{2+} , os quais na presença de H_2O_2 podem produzir radicais hidroxila, os quais, apesar de ter vida média curta, são muito reativos, podendo causar danos ao organismo. Desta forma, se os extratos agem como quelantes, eles evitam a produção de radicais livres.

Ao se analisar as três metodologias de determinação de atividade antioxidante dos extratos estudados neste trabalho, verificou-se um potencial promissor para o cultivo do fungo do gênero *Preussia*, principalmente, e dos co-cultivos *Lasiodiplodia + Preussia*, porém, será necessário otimizar o meio de cultivo para ambos os fungos para que seja possível se obter extratos orgânicos com maiores massas e atividades biológicas elevadas. No Gráfico 1 os cinco extratos obtidos neste estudo foram comparados de acordo com cada metodologia utilizada para a determinação da atividade antioxidante.

Gráfico 1- Comparação das atividades antioxidante dos extratos obtidos do cultivo dos fungos *Preussia* e *Lasiodiplodia*.



Fonte: UNIFAL-MG (2021).

Legenda: Lasio- *Lasiodiplodia* estático 20 dias

Preussia- *Preussia* agitado

LP7 – *Lasiodiplodia*+*Preussia* cultivo agitado por 7 dias

LP15 – *Lasiodiplodia*+*Preussia* agitado 15 dias

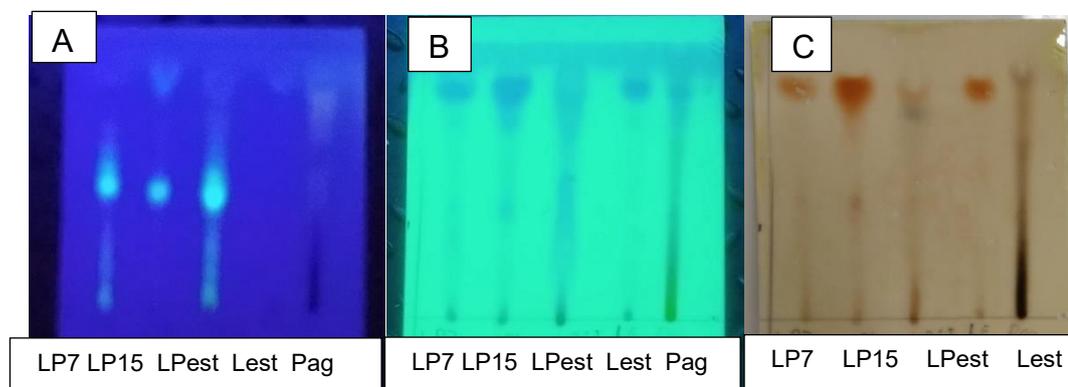
LPest – *Lasiodiplodia*+*Preussia* cultivo estático 20 dias.

Para que seja possível atribuir as classes químicas do que realmente foi biossintetizado em cada cultivo, foi necessário realizar análises cromatográficas, e análises espectroscópicas para se traçar um perfil das substâncias produzidas em cada um dos cultivos, e entender como a presença de dois fungos pode interferir na produção de metabólitos.

5.6 ANÁLISE POR CCD

As CCDs dos extratos acetato de etila provenientes das culturas isoladas dos fungos *Preussia* e *Lasiodiplodia* e da co-cultura de ambos tanto em modo estático como em modo agitado pode ser observada na Figura 15.

Figura 15 - Fotografia das CCDs dos extratos das culturas dos fungos *Preussia* e *Lasiodiplodia* puras, em co-cultivo, modo estático e modo agitado.



Fonte: UNIFAL-MG (2021).

Legenda: LP7 – *Lasiodiplodia*+*Preussia* cultivo agitado por 7 dias

LP15 – *Lasiodiplodia*+*Preussia* agitado 15 dias

LPest – *Lasiodiplodia*+*Preussia* cultivo estático 20 dias

Lest- *Lasiodiplodia* estático 20 dias

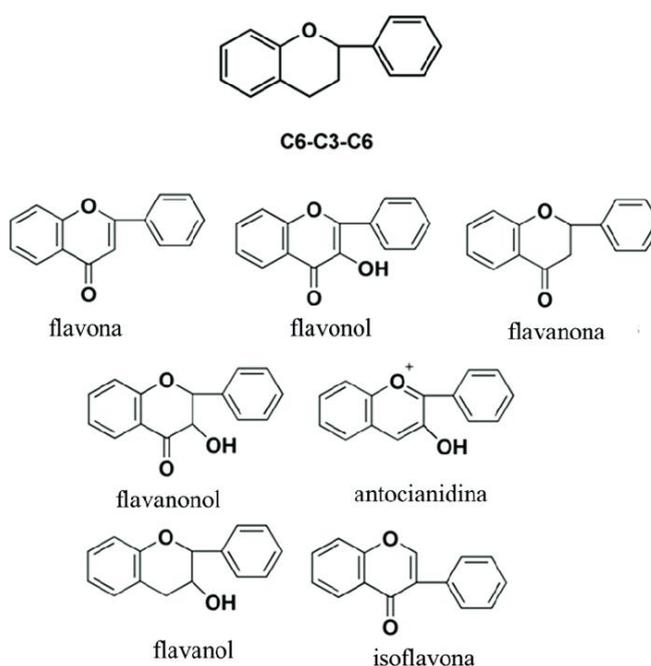
Pag- *Preussia* agitado.

Eluente: Acetato de etila:Acetona:Metanol (9:0,9:0,1); Reveladores: A: luz 365 nm, B: luz 254 nm e C: cloreto férrico.

Procurou-se padronizar a quantidade de extrato aplicado nas cromatofolhas em concentrações de 10mg mL^{-1} para cada extrato, sendo aplicado apenas $2\ \mu\text{L}$ sobre a placa. Tanto os extratos obtidos dos co-cultivos como os extratos acetato de etila das culturas axênicas dos fungos foram avaliados por cromatografia em camada delgada para se verificar as características dos compostos produzidos em cada cultivo. Notam-se a presença de substâncias que fluorescem intensamente nos co-cultivos de *Lasiodiplodia*+*Preussia* tanto em meio agitado como em meio estático, mesmo em diferentes dias de cultivo (placa A, 3 primeiros extratos), o que não acontece com as culturas de cada fungo isolado. Quanto à revelação na luz em 254 nm (placa B) que indica a presença de grupos cromóforos, todos os extratos apresentaram manchas similares na parte superior da placa, podendo ou não ser substâncias similares produzidas por ambos os fungos tanto em co-cultivo como em cultivo isolado. A revelação com cloreto férrico indicou que os cultivos de LP7, LP15 e Lest apresentaram a mesma mancha marrom, porém, o primeiro menos intensa que o segundo, indicando que além de revelar sob a luz UV em 254nm as mesmas manchas também revelaram com FeCl_3 , sugerindo a presença de flavonóis enquanto nos extratos dos cultivos LPest e Pag não foi possível observar manchas marrom e sim uma mancha esverdeada em LPest sugerindo possivelmente a

presença de flavonas. Já o extrato acetato de etila do endófito *Preussia* cultivado em meio agitado sugere a presença de muitos compostos fenólicos, flavonoides, indicados pela coloração escura (cinza escuro). A Figura 16 mostra a estrutura química geral dos diferentes tipos de flavonoides que podem estar presentes nos extratos.

Figura 16 - Estrutura química dos flavonoides



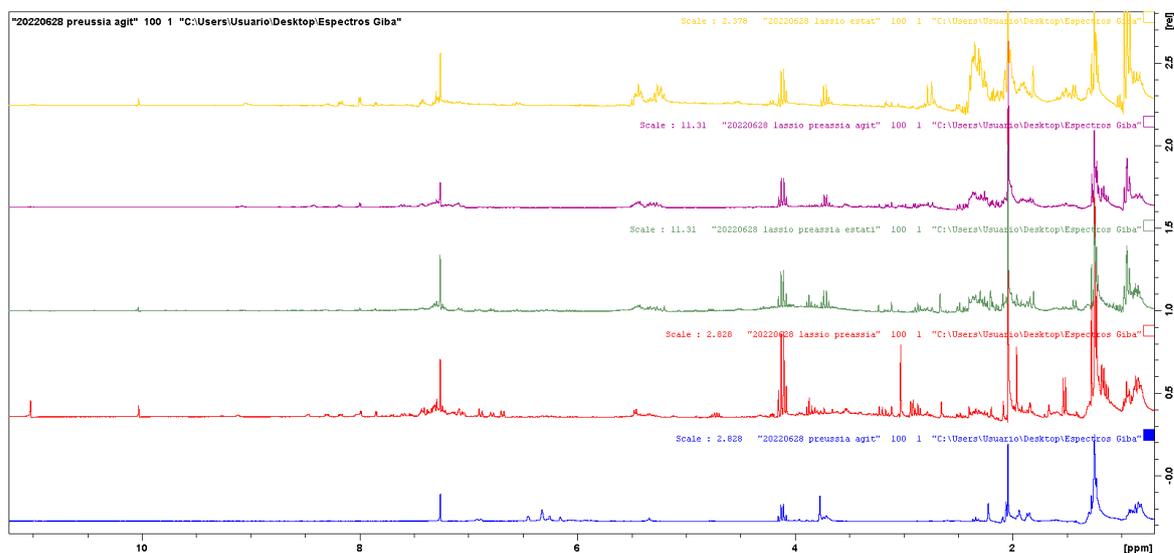
Fonte: Magalhães; Santos, 2021.

5.6 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA POR RMN

Foram obtidos espectros de RMN-¹H dos extratos para que fosse possível se observar os sinais de hidrogênios característicos de alguns compostos majoritários presentes nos extratos fúngicos.

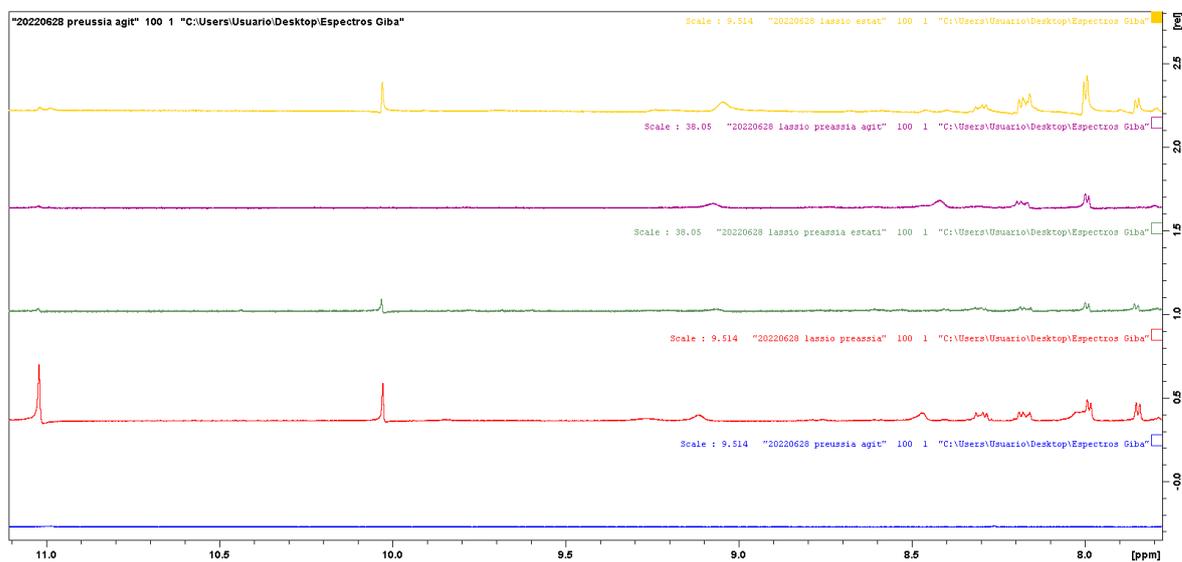
Nas Figuras 17- 20 é possível observar os espectros inteiros (Figura 17) de cada um dos extratos sobrepostos e suas expansões (Figuras 18-21).

Figura 17 - Espectros de RMN-¹H dos extratos acetato de etila dos cultivos dos fungos puros e dos co-cultivos realizados em modo estático e agitado (CDCl₃, 300 MHz).



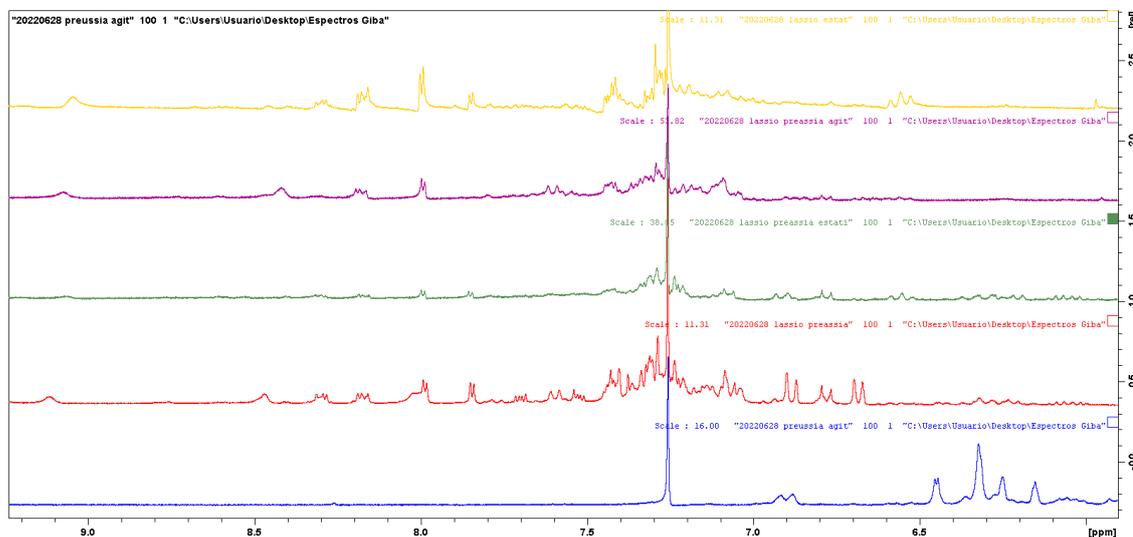
Fonte: UNIFAL-MG (2022).

Figura 18 - Expansões dos espectros de RMN-¹H dos extratos acetato de etila dos cultivos dos fungos puros e dos co-cultivos realizados em modo estático e agitado (Região entre 11,1-7,8 ppm), (CDCl₃, 300 MHz).



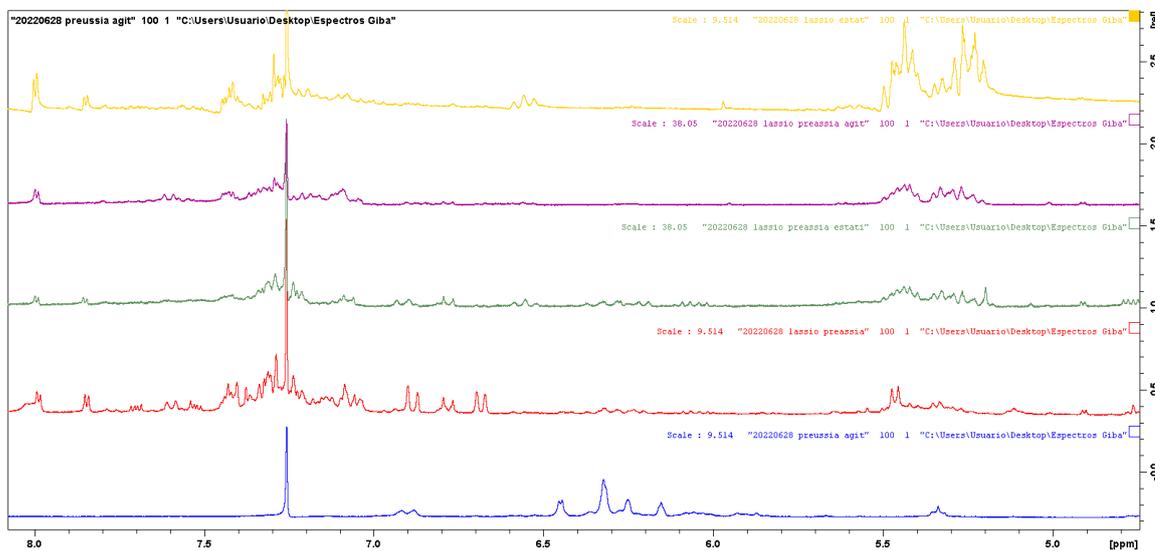
Fonte: UNIFAL-MG (2022).

Figura 19 - Expansões dos espectros de RMN-¹H dos extratos acetato de etila dos cultivos dos fungos puros e dos co-cultivos realizados em modo estático e agitado (Região entre 9,2-6,0 ppm), (CDCl₃, 300 MHz).



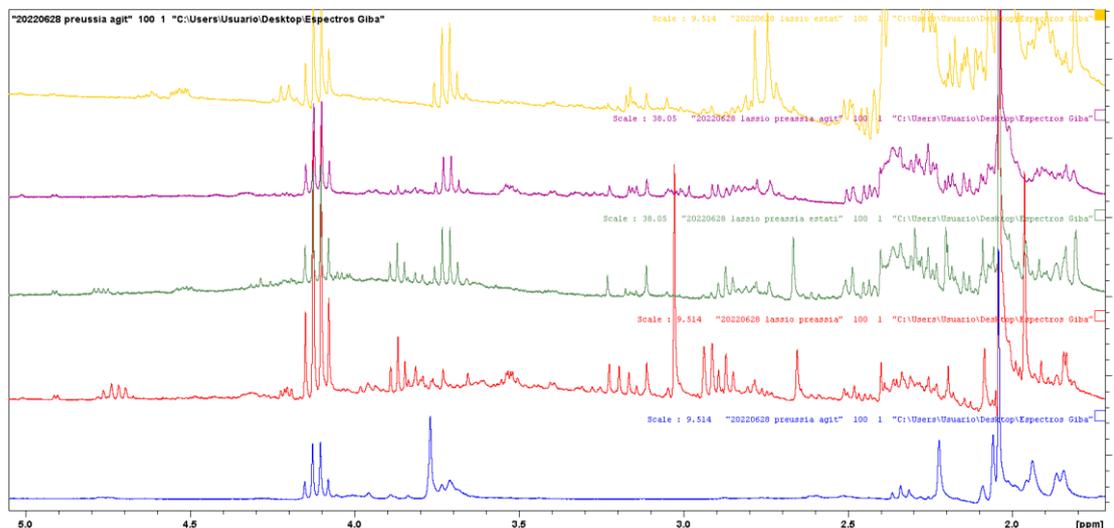
Fonte: UNIFAL-MG (2022).

Figura 20 - Expansões dos espectros de RMN-¹H dos extratos acetato de etila dos cultivos dos fungos puros e dos co-cultivos realizados em modo estático e agitado (Região entre 8,1 - 4,8 ppm), (CDCl₃, 300 MHz).



Fonte: UNIFAL-MG (2022).

Figura 21 - Expansões dos espectros de RMN-¹H dos extratos acetato de etila dos cultivos dos fungos puros e dos co-cultivos realizados em modo estático e agitado (Região entre 5,0 -1,8 ppm), (CDCl₃, 300 MHz).



Fonte: UNIFAL-MG (2022).

Os espectros de RMN de ¹H dos extratos acetato de etila obtidos a partir dos cultivos apresentam picos entre 1,0 – 1,5 ppm (Figura 21), característicos de H ligados a C sp³, geralmente, metilas; sinais entre 1,5 – 2,5 ppm em todos os espectros, característicos de hidrogênios metilênicos e metílicos. Entre 2,5-3,5 ppm aparecem sinais para os co-cultivos e para o cultivo do fungo *Lasiodiplodia*, mas não aparecem sinais de hidrogênio no extrato proveniente do cultivo do *Preussia* isolado. Estes sinais são característicos de H metilênicos funcionalizados, isto é, próximos de heteroátomo ou de anel aromático. Entre 3,5 – 4,5 ppm aparecem sinais de hidrogênios ligados a carbonos carbinólicos. Nesta região os co-cultivos e o cultivo do *Lasiodiplodia* estático se assemelham em alguns sinais. Entre 5,0- 5,8 ppm surgem sinais de hidrogênios ligados a carbonos do tipo sp², característicos de duplas ligações, na Figura 20 é possível se notar um perfil de hidrogênios distintos entre os co-cultivos e a cultura pura do *Preussia*, por outro lado no espectro de RMN-¹H do *Preussia* notam-se sinais mais proeminentes entre 6,0 – 6,5 ppm, enquanto nos co-cultivos e no *Lasiodiplodia* puro estes sinais não aparecem. Esta região pode compreender sinais de hidrogênios ligados a carbonos sp², que podem estar presentes em anéis, que podem ser aromáticos. Também se observam sinais entre 6,5 – 8,5 ppm (Figuras 18 - 20) indicativos de substâncias aromáticas. O singlete observado em 7,26 ppm é o sinal do solvente deuterado e por isso aparece

em todos os espectros. Ainda para os co-cultivos e para o *Lasiodiplodia* observam-se sinais de hidrogênios entre 9,0 – 11,0 ppm podendo ser sinais de H de flavonoides ou até mesmo de aldeído em 11 ppm.

De acordo com todas estas informações é possível inferir após a análise simultânea dos espectros de RMN-¹H dos extratos em conjunto com as CCDs que os co-cultivos tanto em modo agitado (7 e 15 dias) como estático apresentaram um perfil químico semelhante tanto nas revelações sob a luz em 254 nm, como em 365 nm e em algumas regiões dos espectros de RMN-¹H. O perfil químico dos cultivos puros tanto por CCD como por RMN são diferentes entre si, e também são diferentes dos co-cultivos em maior número e tipos de sinais de hidrogênios comparados aos sinais presentes no extrato do *Preussia* puro, o qual por CCD revelou a presença de flavonoides (coloração cinza escuro Figura 15 C), além de substâncias que fluorescem com diferentes fatores de retenção em relação aos co-cultivos. Foi possível notar certas semelhanças entre os co-cultivos e o *Lasiodiplodia*.

Normalmente, o co-cultivo de dois microrganismos irá conferir a cada um deles papéis distintos na equipe produtora de metabólitos, ou seja, o produtor irá atuar como uma fábrica de células que pode estar sendo estimulada pelo outro fungo, a fim de produzir a molécula alvo. Quando se estuda culturas axênicas, a produção de metabólitos depende em um primeiro momento do acúmulo de biomassa do produtor para alcançar uma produtividade razoável (LIANG *et al.*, 2020). Se o crescimento do produtor for suprimido pela outra espécie que deveria servir como fator estimulante, os resultados obtidos não serão satisfatórios. Por outro lado, se o crescimento do microrganismo estimulante é quase imperceptível, as diferenças entre as mono e co-culturas podem ser pouco visíveis, e a co-cultura torna-se injustificada. O desafio experimental é encontrar um equilíbrio entre manter a atividade estimuladora de um microrganismo e evitar a supressão do microrganismo produtor (CARLSON *et al.*, 2015; MAVITUNA *et al.*, 2016; BORUTA, 2021).

Neste trabalho, observou-se semelhanças entre os co-cultivos em tempos de cultivos diferentes e em modos de agitação distintos. Notou-se que o fungo *Preussia* isolado apresentou sinais de H e revelações na CCD diferentes dos demais, apresentando também uma capacidade antioxidante superior ao ser comparado aos demais extratos, o que pode indicar que a presença do *Lasiodiplodia* nas co-culturas

inibiu a produção de metabólitos produzidos pelo gênero *Preussia*, mesmo assim, este gênero é promissor na produção de substâncias bioativas. A presença do gênero *Preussia* no cultivo do *Lasiodiplodia* para ter estimulado este fungo a produzir novas substâncias como é possível notar nas CCDs os compostos que fluorescem nos extratos dos co-cultivos e o maior número de sinais de hidrogênios observados nos espectros de RMN dos co-cultivos. Desta forma, existem fortes indícios de produção de novos compostos a partir do *Lasiodiplodia* em co-cultura, sendo estimulado pela presença do *Preussia*, porém, este cultivado sozinho, mostrou-se bastante promissor quanto suas atividades biológicas. Mais estudos devem ser conduzidos para que sejam identificados os compostos presentes nos extratos para que se possa concluir de maneira mais precisa a origem destes compostos.

6 CONCLUSÕES

No presente estudo foi observado o cultivo simultâneo das espécies *Lasiodiplodia* sp. e *Preussia africana*, bem como o cultivo axênico de cada linhagem, que demonstraram o aparecimento de diferentes metabólitos secundários dependente do cultivo realizado, o que poderá trazer em estudos futuros a descoberta de novos compostos presentes nas culturas mistas.

Os extratos de co-cultivo que apresentaram melhores atividades antimicrobianas foram entre os fungos *Lasiodiplodia* + *Preussia* em meio agitado em 7 dias, cultivos únicos de *Preussia* em meio agitado e *Lasiodiplodia* em meio estático, todos, com valores de CIM entre 200-400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente ao patógeno *Staphylococcus aureus*. A avaliação da atividade antimicrobiana de extratos pode ser afetada pela mistura de substâncias atuando de forma antagônica, o que pode ser melhorado através do fracionamento dos extratos.

Em ensaios de atividade antioxidante, o extrato AcOEt do fungo *Preussia* apresentou alto índice de atividade antioxidante quando testado em análises de DPPH, fenólicos totais e FRAP. Além disso, os resultados de FRAP para cultura mista *Lasiodiplodia* + *Preussia* em meio agitado, apresentou maior atividade antioxidante em relação as demais. Os extratos referentes aos co-cultivos apresentaram muitos sinais nos espectros de RMN na região de aromáticos que sugere a presença de substâncias com capacidade antioxidante, porém, o extrato referente ao cultivo apenas do fungo *Preussia* não apresentou tais sinais na região de aromáticos, mas apresentou sinais mais intensos na região de duplas ligações podendo indicar a presença de outras substâncias com potencial antioxidante.

Quando se planeja realizar uma co-cultura é imprescindível se pensar nos objetivos que devem ser alcançados como por exemplo a geração de biomassa ou a produção de substâncias bioativas. Ao definir o objetivo, é necessário que se escolha os microrganismos adequados para o co-cultivo e os parâmetros de crescimento para que a interação entre ambos seja otimizada e se consiga o que se deseja. Portanto, compreender os mecanismos de gatilho-resposta moldará a maneira de melhorar um co-cultivo (PADMAPERUMA *et al.*, 2018). Porém, interpretar as interações microbianas não é algo fácil devido à complexidade destes microbiomas. Como a interação sinérgica que existe entre os microrganismos co-cultivados é espécie-específica, os mesmos efeitos não serão obtidos por espécies

de gêneros semelhantes, indicando que cada parceria deve ser avaliada individualmente (ANGELIS *et al.*, 2012). Além disso, as comunidades microbianas são altamente suscetíveis a estresses abióticos e bióticos, alterações que se refletirão no conjunto de substâncias que serão produzidas na co-cultura (KAPOORE *et al.*, 2021).

Muitos benefícios podem ser alcançados a partir de co-culturas, tanto em laboratórios como em indústrias biotecnológicas como, por exemplo, a diminuição de contaminações quando comparado às culturas axênicas, a redução do tempo de cultivo, indução de novas vias metabólicas para produção de novos compostos, aumento da produtividade do produto alvo, produção sustentável de substâncias de alto valor agregado, diminuição de custos associados à esterilização e à matéria-prima. Porém, muitos desafios ainda devem ser superados como: entender e reproduzir a sinergia metabólica entre os microrganismos em co-cultura, estabilizar o bioproduto dentro deste ambiente, minimizar custos com as separações e purificações do produto alvo, simular os habitats naturais dos microrganismos para determinar sua compatibilidade com a co-cultura (YADAV e MENNA, 2018; BURMEISTER e GREENBERGER, 2020). Sendo assim, os cultivos de microrganismos podem despertar vias biossintéticas silenciadas, contribuindo para descoberta de novas substâncias com o potencial antimicrobiano, antioxidante, ou outras propriedades desejadas, mas muitos estudos devem ser realizados para que se consiga entender as interações entre os microrganismos e desta forma se atingir os resultados desejados.

7 TRABALHOS FUTUROS

Com a realização deste trabalho preliminar foi possível vislumbrar novas pesquisas direcionadas a:

Estudar o comportamento dos fungos endofíticos para se verificar qual o melhor tempo de cultivo para cada fungo, através de suas curvas de crescimento. Não foi realizada a curva de crescimento para o fungo *Preussia africana*.

Otimizar o meio de cultura do co-cultivo para produção de maiores massas e melhores atividades biológicas de extratos orgânicos, não apenas acetato de etila.

Verificar se o cultivo entre *Lasiodiplodia* e *Preussia*, ambos isolados de uma mesma planta é ideal para realização de co-culturas.

Realizar o co-cultivo das espécies estudadas neste trabalho com outros gêneros de fungos também isolados da planta *Handroanthus impetiginosus*.

Ampliar as análises de atividade antimicrobiana contra outros patógenos.

Avaliar o potencial antioxidante, anticancerígeno ou outros em busca de novos metabólitos secundários, com as novas condições de cultivo.

Fracionar os extratos obtidos após o cultivo para isolamento de compostos e avaliação de seu potencial bioativo.

Purificar as substâncias majoritárias presentes em cada extrato.

REFERÊNCIAS

- AKONE, S. H. *et al.* Epigenetic modification, co-culture and genomic methods for natural product discovery. **Physical Sciences Reviews**, Boston, n. 4, v. 4, p. 1–13, 2019.
- AKONE, S. H. *et al.* Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Chaetomium sp.* through fungal–bacterial co-culture and epigenetic modification. **Tetrahedron**, Alemanha, v. 72, n. 41, p. 6340-6347, 2016.
- AL-DUAIS, M. *et al.* Antioxidant capacity and total phenolics of *Cyphostemma digitatum* before and after processing: use of different assays. **European Food Research and Technology**, Jena, n. 5, v. 228, p. 813-821, 2009.
- ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, Brasil, n. 10, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Dusseldorf, n. 6, v. 90, p. 829-1845, 2011.
- ANCHEEVA, E. *et al.* Expanding the Metabolic Profile of the Fungus *Chaetomium sp.* through Co-culture with Autoclaved *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Organic Chemistry**, Dusseldorf, v. 2017, n. 22, p. 3256–3264, 2017.
- ANGELIS, S. *et al.* Co-culture of microalgae, cyanobacteria, and macromycetes for exopolysaccharides production: process preliminary optimization and partial characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Brasil, v. 167, n. 5, p. 1092-1106, 2012.
- AMNA, T. *et al.* Effect of precursors feeding and media manipulation on production of novel anticancer pro-drug camptothecin from endophytic fungus. **Brazilian Journal of Microbiology**, Brasil, v. 43, p. 1476-1489, 2012.
- BIASETTO, C. R. **Fungos endofíticos em *Eugenia brasiliensis*: prospecção química, biológica, enzimática e avaliação do co-cultivo e epigenética em *Xylaria cubensis*, *Diaporthe sp.* e *Colletotrichum sp.*** 2016. 226 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2016.
- BERTRAND, S. *et al.* Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, Geneva, v. 32, n. 6, p. 1180-1204, 2014.
- BEVERIDGE, T.J. Estruturas da parede celular Gram-negativa e suas vesículas de membrana derivadas. **Journal of Bacteriology**, Brasil, n. 181, p.4725-4733,1999.
- BOHNI, N. *et al.* Production of Fusaric Acid by *Fusarium spp.* in Pure Culture and in Solid Medium Co-Cultures. **Molecules**, Alemanha, v. 21, n.370, 2016.
- BORUTA, T. A bioprocess perspective on the production of secondary metabolites

by *Streptomyces* in submerged co-cultures. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 37, n.177, 2021.

BURMEISTER, A., GRÜNBERGER, A. Microfluidic cultivation and analysis tools for interaction studies of microbial co-cultures. **Current Opinion in Biotechnology**, Bielefeld, v. 62,p.106-115, 2020.

BYRUM, S. D. *et al.* ChAP-MS: A method for identification of proteins and histone posttranslational modifications at a single genomic locus. **Cell Reports**, Baltimore, v. 2, n. 1, p. 198–205, 2012.

CAICEDO, N. H. *et al.* Antioxidant activity of exo-metabolites produced by *Fusarium oxysporum*: An endophytic fungus isolated from leaves of *Otoba racilipes*. **Microbiology Open**, Colombia, v. 8, n. 10, p. e903, 2019.

CANON, F. *et al.* Understanding the Mechanisms of Positive Microbial Interactions That Benefit Lactic Acid Bacteria Co-cultures- A review. **Frontiers in Microbiology**, Inglaterra,v. 11, n. 288, 2020.

CARLSON S. *et al.* Phylum specific regulation of resistomycin production in a *Streptomyces sp.* via microbial coculture. **Journal of Natural Products**, Estados Unidos, v. 78, n. 3, p. 381–387, 2015.

CHAGAS, F. O. *et al.* A Mixed culture of endophytic fungi increases production of antifungal polyketides. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 39, n. 10, p. 1335-1342, 2013.

CHAGAS, F. O.; PUPO, M. T. Chemical interaction of endophytic fungi and actinobacteria from *Lychnophora ericoides* in co-cultures. **Microbiological Research**, Brasil, v. 212–213, p. 10–16, 2018.

CHAKRABORTY, Ankita; MAJUMDAR, Sayari; BHOWAL, Jayati. Phytochemical screening and antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of different filamentous fungi. **Archives of Microbiology**, Colombia, v. 203, n. 10, p. 6091-6108, 2021.

CHARRIA-GIRÓN, E. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos obtidos do cultivo de fungos endofíticos nativos pertencentes a uma floresta tropical montanhosa na Colômbia. **Frontiers in Microbiology**, Brasil, v. 12, 2021.

COSTA M.F. **Co-cultivo dos fungos endofíticos *Botryosphaeria parva* e *Saccharicola sp.*: avaliação da produção metabólica**. 2017. 106 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) document M7-A7 - Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Aerobic Bacteria. In Approved Standard, 7th ed. CLSI: Wayne, PA, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-Third

Edition. M27-A3. Wayne, PA, USA: CLSI, 2008.

CRUYWAGEM, E.M. *et al.* Recognition of phylogenetic species and hybridization in *Lasiodiplodia*: A case study on baobab species. **Fungal Biology**. Africa do Sul, v 121, p. 420-436, 2017.

CYDZIK-KWIATKOWSKA, A. ZIELINSKA, M Bacterial communities in full-scale wastewater treatment systems. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Olsztyn, v. 32, n. 4, p. 1-8, 2016.

DE CAPRILES, C. H.; MATA, S.; MIDDELVEEN, M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. **Mycopathologia**, Caracas, v. 106, n. 2, p. 73-79, 1989.

DE SILVA, N. I. *et al.* Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia forest* plants. **Scientific Reports**, Chiang Mai, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

DOS SANTOS, G. D. *et al.* Molecular Identification and Antimicrobial Activity of Foliar Endophytic Fungi on the Brazilian Pepper Tree (*Schinus terebinthifolius*) Reveal New Species of Diaporthe. **Current Microbiology**, Brasil, v. 78, n. 8, p. 3218–3229, 2021.

DZOYEM, J. P. *et al.* Cytotoxicity, antioxidant and antibacterial activity of four compounds produced by an endophytic fungus *Epicoccum nigrum* associated with *Entada abyssinica*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v. 27, n. 2, p. 251-253, 2017.

FARHAT, H. *et al.* Evaluation of nematicidal potential of endophytic fungi associated with healthy plants and GC-MS profiling of metabolites of endophytic *Fusarium solani*. **South African Journal of Botany**, Africa do Sul, v.146, p. 146- 161, 2022.

FENG, Z.; YONGCHENG, L. Marinamide a novel alkaloid and its methyl ester produced by the application of mixed fermentation technique to two mangrove endophytic fungi from the South China Sea. **Chinese Science Bulletin**, Foshan, v. 51, n. 12, p. 1426-1430, 2006.

GOERS, L. *et al.* Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. **Journal of The Royal Society Interface**, Londres, v. 11, n. 96, p. 20140065, 2014.

GÓMEZ, O. C. *et al.* Antimicrobial activity improvement after fractionating organic extracts from *Lasiodiplodia* sp. fermentation / Melhoria da atividade antimicrobiana após fracionamento de extratos orgânicos de *Lasiodiplodia* sp. fermentação. **Brazilian Journal of Development**, Brasil, v. 7, n. 1, p. 3795–3816, 2021.

GÓMEZ, O. C. **Identificação de metabólitos secundários com potencial antimicrobiano produzidos pelo fungo endofítico *Lasiodiplodia* sp. isolado do Ipê rosa (*Handroanthus impetiginosus*)**. 2022. 170 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

GÜLÇİN, İ. *et al.* Antiradical and antioxidant activity of total anthocyanins from *Perilla pankinensis decne*. **Journal of Ethnopharmacology**, Turquia, v. 101, n. 1-3, p. 287-

293, 2005.

HASSANE, A. M. *et al.* Radical scavenging potency, HPLC profiling and phylogenetic analysis of endophytic fungi isolated from selected medicinal plants of Saudi Arabia. **Electronic Journal of Biotechnology**, Arábia Saudita, v. 58, p. 37-45, 2022.

HOLETZ, F. B. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HUSSEIN, REHAB A.; EL-ANSSARY, AMIRAA. Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. **Herbal Medicine**, India, v. 1, p. 13, 2018.

IGNATOVA, L. *et al.* Characterization of cadmium-tolerant endophytic fungi isolated from soybean (*Glycine max*) and barley (*Hordeum vulgare*). **Heliyon**, Almaty, v. 7, n. 11, 2021.

JALIL, M. T. M.; IBRAHIM, D. Volatile Bioactive Compounds from *Lasiodiplodia pseudotheobromae* IBRL OS-64, an Endophytic Fungus Residing in the Leaf of *Ocimum sanctum*. **HAYATI Journal of Biosciences**, Haiti, v. 29, n. 5, p. 570-585, 2022.

KAPOORE, R. V. *et al.* Algae biostimulants: A critical look at microalgal biostimulants for sustainable agricultural practices. **Biotechnology Advances**, Swansea, v. 49, p. 107754, 2021.

KHAN A. *et al.* First draft of the genome sequencing of the indole acetic acid-producing and plant growth-promoting fungus *Preussia* sp. BSL10. **Journal of Biotechnology**. Alemanha v.225, p. 44-45, 2016.

KNIGHT, V. *et al.* Diversifying microbial natural products for drug discovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Marlborough, v. 62, n. 5-6, p. 446-458, 2003.

LI, GANG. *et al.* Epigenetic Modulation of Endophytic *Eupenicillium* sp. LG41 by a Histone Deacetylase Inhibitor for Production of Decalin-Containing Compounds. **Journal of Natural Products**. Estados Unidos, v. 80 p. 983-988, 2017.

LI, H. *et al.* Inducing secondary metabolite production by co-culture of the endophytic fungus *Phoma* sp. and the symbiotic fungus *Armillaria* sp. **Journal of Natural Products**, Estados Unidos, v. 82, n. 4, p. 1009-1013, 2019.

LI, J. *et al.* Lasiodiplodins from mangrove endophytic fungus *Lasiodiplodia* sp. 318#. **Natural Product Research**, India, v. 30, n. 7, p. 755-760, 2016.

LIANG L. *et al.* Metabolomic comparison and assessment of co-cultivation and a heat-killed inducer strategy in activation of cryptic biosynthetic pathways. **Journal of Natural Products**, Estados Unidos, v. 83, p.2696–2705, 2020.

MAGALHÃES, B.E.A.; SANTOS, W.N.L. Capacidade antioxidante e conteúdo fenólico de infusões e decocções de ervas medicinais. **Almeida Júnior, S. Produtos**

Naturais e Suas Aplicações: da comunidade para o laboratório. Guarujá, SP: Científica Digital, Brasil, p. 234-247, 2021.

MANDENIUS C. F, BRUNDIN A. Bioprocess optimization using design-of-experiments methodology. **Biotechnology Progress**, Sweden v. 24, p. 1191–1203, 2008.

MAPPERSON R. *et al.* The diversity and antimicrobial activity of *Preussia* sp. endophytes isolated from Australian dry tropical forests. **Current Microbiology**, Alemanha, v. 68, n.1, p. 30-37, 2014.

MARSOLA, S. J. *et al.* Endophytic fungi of *Brunfelsia uniflora*: isolation, cryopreservation, and determination of enzymatic and antioxidant activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Bulgária, v. 38, n. 6, p. 1-15, 2022.

MAVITUNA F. *et al.* In search of the *E. coli* compounds that change the antibiotic production pattern of *Streptomyces coelicolor* during inter-species interaction. **Enzyme and Microbial Technology**, Turquia, v. 90, p. 45–52, 2016.

MELO, E. A. *et al.* Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Brasil, v. 44, p. 193-201, 2008.

MOREIRA *et al.* Optimization of *Lasiodiplodia* sp. to improve the yield of ethyl acetate extract as an antimicrobial source. **Current Microbiology**, Inglaterra, v.79, p. 222, 2022.

MOUSSA M. *et al.* Co-culture of the fungus *Fusarium tricinctum* with *Streptomyces lividans* induces production of cryptic naphthoquinone dimers. **RSC advances**, Dusseldorf. v.3, p.1491-1500, 2019.

MOUSSA M. *et al.* Co-culture of the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* with the fungus *Fusarium tricinctum* induces bacterial antifungals and quorum sensing signaling molecule. **Phytochemistry Letters**, Dusseldorf, v. 36, p. 37-41, 2020.

NASCIMENTO, J. S. *et al.* Natural trypanocidal product produced by endophytic fungi through co-culturing. **Folia Microbiologica**, Brasil, v. 65, n. 2, p. 323-328, 2020.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Estados Unidos, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OH, D-C. *et al.* Libertellenones A–D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Estados Unidos, v. 13, n. 17, p. 5267-5273, 2005.

OLA, A.R.B. *et al.* Inducing Secondary Metabolite Production by the Endophytic Fungus *Fusarium tricinctum* through Coculture with *Bacillus subtilis*. **Journal of Natural Products**, Dusseldorf, v.76, n.11, p. 2094–2099, 2013.

OMURA, S. (Ed.). The search for bioactive compounds from microorganisms.

Springer Science & Business Media, New York, 1992.

PADMAPERUMA, G. *et al.* Microbial consortia: a critical look at microalgae co-cultures for enhanced biomanufacturing. **Critical Reviews in Biotechnology**, Alemanha v. 38, n. 5, p. 690-703, 2018.

PARL H.B. *et al.* Coculture of *Streptomyces* and *Gordonia* Species. **Journal of Natural Products**. Estados Unidos, v. 80, n. 9, p. 2542-2546, 2017.

PIRES, J. *et al.* Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo**, p. 1-5, 2017.

PRIMA, S. R. *et al.* Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activity of Endophytic Fungi Isolated from *Capsicum annuum* L. and *Allium cepa* L. **Pharmacognosy Journal**, Bulgária v. 14, n. 2, 2022.

RAHAMAN, M. S. *et al.* Molecular phylogenetics and biological potential of fungal endophytes from plants of the sundarbans Mangrove. **Frontiers in Microbiology**, Estados Unidos v. 11, p. 570855, 2020.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, Estados Unidos, v. 1, n. 3, p. 26-27, 1998.

RIBEIRO *et al.* Chemical diversity of Secondary Metabolites Produced by Brazilian Endophytic Fungi. **Current Microbiology**, Brasil, v.78, p.33-54, 2021.

RODRIGUEZ, P. *et al.* Endophytic microorganisms: A source of potentially useful biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Montevideo, v.133, p.569–S581, 2016.

ROWAIYE, A. B. *et al.* Investigating the ameliorative effects of the aqueous extract of *Pleurotus ostreatus* on cyclophosphamide-induced cytotoxicity in rabbits. **Toxicology and Environmental Health Sciences**, Abuja, p. 1-13, 2020.

SALLAM, N. *et al.* Endophytic fungi associated with soybean plants and their antagonistic activity against *Rhizoctonia solani*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, Assiut, v. 31, n. 1, 2021.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, Madrid, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANTOS, A. F. A. *et al.* Bioprospecting of enzymes produced by *Aspergillus tamarii* URM 4634, isolated from Caatinga soil, by solid state fermentation. **Brazilian Journal of Development**, Brasil, v. 6, n. 5, p. 25663- 25676, 2020.

SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the

in vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, Reino Unido, v. 42, p. 321-324, 2007.

SCHERLACH, K.; HERTWECK, C. Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. **Organic & Biomolecular Chemistry**, Jena v. 7, n. 9, p. 1753-1760, 2009.

SEDDOUK, L. *et al.* Isolation and characterization of a mesophilic cellulolytic endophyte *Preussia africana* from *Juniperus oxycedrus*. **Environmental Science and Pollution Research**. India, v.29, p.45589–45600, 2022.

SEPTIANA, E. *et al.* Antioxidant activity of endophytic fungi from young and old leaves of cinnamon plants from Bogor, Indonesia. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, Indonesia, v. 726, n. 65. p. 1-10, 2021.

SHARMA, D.; PRAMANIK, A.; AGRAWAL, P. K. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D.Don. **3 Biotech**, Inglaterra, v. 6, n. 2, p. 1–14, 2016.

SILVEIRA, A. C. *et al.* Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. Comunicado Técnico 421, **Embrapa**, Brasil, 2018.

SINGH, B.; KAUR, A. Antidiabetic potential of a peptide isolated from an endophytic *Aspergillus awamori*. **Journal of Applied Microbiology**, Amristar, v. 120, n. 2, p. 301-311, 2016.

SOUZA, I. M. *et al.* Isolation and screening of extracellular lipase-producing endophytic Fungi from *Handroanthus impetiginosus*. **Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology**, China p. 1-0, 2018.

STIERLE A. *et al.* The Berkeleylactones, Antibiotic Macrolides from Fungal Coculture. **Journal of Natural Products**. Estados Unidos, v.80, n.4, p.1150–1160, 2017.

SUBRAMANIAM, R. AND VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, Londres, v. 3, n. 3, p. 480–486, 2012.

TECHAOEI, S. *et al.* Chemical evaluation and antibacterial activity of novel bioactive compounds from endophytic fungi in *Nelumbo nucifera*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Tailândia, v.27, n.11, p. 2883- 2889, 2020.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, França, v. 81, p. 146-161, 2013.

VIEIRA, G. T. *et al.* Condições de cultivo submerso para a produção de biomassa micelial e metabólitos antimicrobianos por *Polyporus tricholoma* Mont. **Revista Brasileira de Microbiologia**, Brasil, v. 39, p. 561-568, 2008.

VINALE, F. *et al.* Co-Culture of Plant Beneficial Microbes as Source of Bioactive

Metabolites. **Scientific Reports**, Inglaterra, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

WANG, R. *et al.* Recent advances in modular co-culture engineering for synthesis of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, Estados Unidos, v. 62, p. 65–71, 2020.

WANG, Z *et al.* Induced production of steroids by co-cultivation of two endophytes from *Mahonia fortunei*. **Steroids, China**, v. 145, p. 1-4, 2019.

WANI, M. C. *et al.* Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society, China**, v. 93 n.9 p. 2325–2327, 1971.

WILLIAMS, R. B. *et al.* Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. **Organic and Biomolecular Chemistry**, Estados Unidos, v. 6, n. 11, p. 1895–1997, 2008.

YADAV, G.; MEENA, M. Bioprospecting of endophytes in medicinal plants of Thar Desert: An attractive resource for biopharmaceuticals. **Biotechnology Reports**, India, v. 30, p. e00629, 2021.

YAMANAKA, K. *et al.* Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, Estados Unidos, v. 111, n. 5, p. 1957-1962, 2014.

YU S. *et al.* Co-culture of *Aspergillus sydowii* and *Bacillus subtilis* induces the production of antibacterial metabolites. **Fungal Biology**. India, v.126, p.320–332, 2022.

ZHANG, L. *et al.* Induction of diverse bioactive secondary metabolites from the mangrove endophytic fungus *Trichoderma sp.* (Strain 307) by co-cultivation with *Acinetobacter johnsonii* (Strain B2). **Marine Drugs**, China v.15, n. 35, 2018.

ZHANG F. *et al.* Thiopyranocromenone and other chromone derivatives from an endolytic fungus, *Preussia africana*. **Journal of Natural Products**, Estados Unidos, v. 75, n. 2, p. 230-237, 2012.

ZHUANG E ZHANG. Using cross-species co-cultures to discover new natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, Londres, v. 69, p. 252-262, 2021.

ZHENG, Y. K. *et al.* Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals of Microbiology**, China v. 66, n. 2, p. 529-542, 2016.

ZHU, X. *et al.* Penochalasin K, a new unusual chaetoglobosin from the mangrove endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* V11 and its effective semi-synthesis. **Fitoterapia**, Colombia, v. 123, p. 23-28, 2017.

ZOU, W., LIU, L., AND CHEN, J. Structure, mechanism and regulation of an artificial microbial ecosystem for vitamin C production. **Critical Reviews in Microbiology**, China, v.39, p.247–255, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A- RESULTADOS ANÁLISE DPPH

A) Dados curva de calibração

Leitura				
<i>Concentração (μM)</i>	<i>Absorbâncias</i>			<i>Média - Branco</i>
20	0,629	0,639	0,625	0,450
40	0,553	0,550	0,547	0,369
60	0,488	0,488	0,491	0,308
80	0,435	0,442	0,411	0,249
100	0,362	0,335	0,317	0,157
120	0,291	0,253	0,291	0,098
140	0,206	0,169	0,188	0,007
<i>Branco</i>	<i>Absorbâncias</i>			<i>Média</i>
EtOH PA	0,174	0,189	0,179	0,181
<i>Controle</i>	<i>Absorbâncias</i>			<i>Média - Branco</i>
EtOH PA + DPPH	0,686	0,708	0,691	0,514

B) Análise dos extratos

Amostras Extratos Brutos AcOEt	Massa (g)	Volume EtOH PA (L)	Concentração (g/L)	Absorbâncias		
Lasio + Preussia - Estático	0,0026	0,005	0,52	0,372	0,377	0,369
Lasio + Preussia - Agitado	0,0024	0,005	0,48	0,607	0,592	0,580
Lasio + Preussia - 7 Dias	0,0024	0,005	0,48	0,457	0,471	0,444
Preussia - Agitado	0,0026	0,005	0,52	0,211	0,235	0,215
Lasio - Estático	0,0025	0,005	0,50	0,485	0,490	0,474

C) Cálculos concentrações e %

Média - Branco	Desvio Padrão	[Antioxidante] no micro poço expressa em [Trolox] equivalente (μM)	Atividade oxi-redox da amostra expressa em equivalente Trolox ($\mu\text{mol}/\text{grama de extrato}$)	%
0,192	0,004	93,09	179,01	62,67
0,412	0,014	30,13	62,78	19,83
0,277	0,014	68,90	143,53	46,21
0,040	0,013	136,61	262,71	92,29
0,302	0,008	61,56	123,12	41,22

APÊNDICE B- RESULTADOS FENÓLICOS TOTAIS

A) Dados curva de calibração

Leitura				
<i>Concentração (µg/mL)</i>	<i>Absorbâncias</i>			<i>Média - Branco</i>
20	0,204	0,211	0,211	0,059
40	0,298	0,321	0,353	0,174
60	0,420	0,463	0,469	0,301
80	0,546	0,583	0,599	0,426
100	0,584	0,755	0,723	0,537
120	0,751	0,775	0,800	0,625
<i>Branco</i>	<i>Absorbâncias</i>			<i>Média</i>
Água Destilada	0,173	0,110	0,167	0,150
<i>Controle</i>	<i>Absorbâncias</i>			<i>Média</i>
EtOH PA	0,118	0,146	0,133	0,132

B) Análise dos extratos

Amostras Extratos Brutos AcOEt	Massa (mg)	Volume EtOH PA (mL)	Concentração (mg/mL)	Absorbâncias		
Lasio + Preussia - Estático	2,60	5,00	0,52	0,465	0,497	0,430
Lasio + Preussia - Agitado	2,40	5,00	0,48	0,292	0,310	0,309
Lasio + Preussia - 7 Dias	2,40	5,00	0,48	0,508	0,536	0,533
Preussia - Agitado	2,60	5,00	0,52	1,113	1,142	1,046
Lasio - Estático	2,50	5,00	0,50	0,318	0,299	0,300

C) Cálculos concentrações

Média - Controle	Desvio Padrão	[Compostos Fenólicos Totais] no micro poço expressa em [Ácido Gálico] equivalente (µg/mL)	Teor de Compostos Fenólicos Totais da amostra expressa em equivalente Ácido Gálico (µg/mgrama de extrato)
0,332	0,034	66,01	126,95
0,171	0,010	38,37	79,93
0,393	0,015	76,64	159,67
0,968	0,049	175,72	337,93
0,173	0,011	38,71	77,43

APÊNDICE C- RESULTADOS ANÁLISE FRAP

A) Dados curva de calibração

Leitura				
<i>Concentração (μM)</i>	<i>Absorbâncias</i>			<i>Média - Branco</i>
100	0,315	0,346	0,320	0,106
250	0,475	0,456	0,445	0,237
400	0,619	0,615	0,626	0,399
550	0,863	0,861	0,855	0,638
700	1,047	1,037	1,015	0,812
<i>Branco</i>	<i>Absorbâncias</i>			<i>Média</i>
Água + FRAP	0,232	0,201	0,231	0,221

B) Análise dos extratos

Amostras Extratos Brutos AcOEt	Massa (g)	Volume EtOH PA (L)	Concentração (g/L)	Absorbâncias		
Lasio + Preussia - Estático	0,0026	0,005	0,52	0,682	0,669	0,704
Lasio + Preussia - Agitado	0,0024	0,005	0,48	0,650	0,672	0,669
Lasio + Preussia - 7 Dias	0,0024	0,005	0,48	0,613	0,605	0,638
Preussia - Agitado	0,0026	0,005	0,52	0,667	0,647	0,653
Lasio - Estático	0,0025	0,005	0,50	0,555	0,545	0,535

C) Cálculos concentrações

Média - Branco	Desvio Padrão	[Antioxidante] no micro poço expressa em [Sulfato Ferroso] equivalente (μM)	Atividade oxi-redox da amostra expressa em equivalente Sulfato Ferroso (<math>\mu\text{mol/grama de extrato}</math>)
0,464	0,018	423,89	815,17
0,442	0,012	406,11	846,06
0,397	0,017	368,61	767,94
0,434	0,010	399,44	768,16
0,324	0,010	307,22	614,44