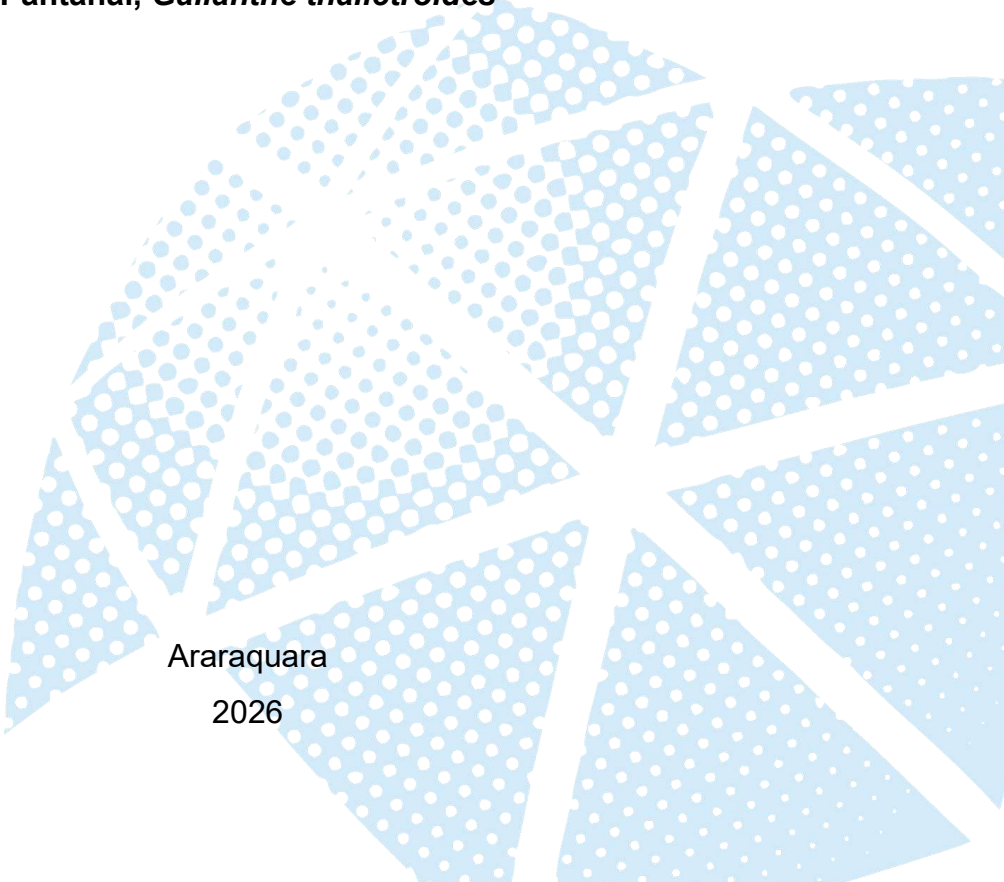


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

LUAN PATRICK GUERRA PINTO

**Bioprospecção do fungo *Fusarium* sp., isolado da planta medicinal do
Pantanal, *Galianthe thalictroides***

Araraquara
2026



LUAN PATRICK GUERRA PINTO

**Bioprospecção do fungo *Fusarium* sp., isolado da planta medicinal do
Pantanal, *Galianthe thalictroides***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Instituto de Química,
Araraquara, para obtenção do título de
Bacharel(a) em Química.

Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa

Araraquara

2026

P659b Pinto, Luan Patrick Guerra
Bioprospecção do fungo *Fusarium* sp., isolado da
planta medicinal do Pantanal, *Galianthe thalictroides*
/ Luan Patrick Guerra Pinto. -- Araraquara, 2026
39 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado -
Química) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Ian Castro-Gamboa

1. Produtos naturais. 2. Metabolômica. 3. Fungos
endofíticos. 4. Antibacterianos. 5. *Fusarium*. I. Título.

LUAN PATRICK GUERRA PINTO

**Bioprospecção do fungo *Fusarium* sp., isolado da planta medicinal do
Pantanal, *Galianthe thalictroides***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP) Instituto de Química,
Araraquara, para obtenção do título de
Bacharel(a) em Química.

Data da defesa: 19/06/2026

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ALAN CESAR PILON**
Data: 25/06/2026 17:28:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Alan Cesar Pilon

Documento assinado digitalmente
 **JOAO LUIZ BRONZEL JUNIOR**
Data: 26/06/2026 12:51:47-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. João Luiz Bronzel Júnior

Documento assinado digitalmente
 **JULIANA RODRIGUES**
Data: 26/06/2026 13:15:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Juliana Rodrigues

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química e ao grupo de pesquisa NuBBE, pelo espaço cedido e todo o suporte necessário para a realização deste trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo auxílio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de pesquisa (processo 14252).

RESUMO

A crescente resistência microbiana a antibióticos e a necessidade de alternativas sustentáveis para o controle de patógenos impulsionam a busca por novos compostos bioativos. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial biotecnológico do fungo endofítico *Fusarium* sp., isolado da planta medicinal do Pantanal *Galianthe thalictroides*, por meio de análises metabolômicas e ensaios biológicos. O fungo foi cultivado em diferentes períodos de incubação (7, 14, 21, 42 e 56 dias), e os extratos obtidos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS). O processamento dos dados permitiu a obtenção de 60 anotações putativas, incluindo sinais compatíveis com compostos de interesse biotecnológico, como beauvericina, farnesol, xantina e ciclopeptídeos. As análises metabolômicas evidenciaram elevada variabilidade química entre os diferentes tempos de cultivo, com diferenças marcantes na abundância relativa de metabólitos ao longo da incubação. Nos ensaios antibacterianos, o extrato obtido após 21 dias de cultivo apresentou o efeito inibitório mais evidente frente às linhagens bacterianas avaliadas, embora a atividade tenha sido moderada e sem efeito bactericida detectável nas condições testadas. A divergência entre os perfis metabolômicos observados nos tempos mais longos de cultivo e a atividade antibacteriana do extrato de 21 dias sugere a possível participação de metabólitos não anotados, compostos minoritários ou efeitos sinérgicos no extrato bruto. Em conjunto, os resultados indicam que *Fusarium* sp. apresenta diversidade metabólica relevante e constitui uma linhagem promissora para estudos futuros de bioprospecção, embora a confirmação estrutural dos metabólitos e a avaliação de frações ou compostos isolados sejam necessárias para melhor compreender seu potencial bioativo.

Palavras-chave: metabolômica; fungos endofíticos; *Fusarium* sp.; produtos naturais; atividade antibacteriana.

ABSTRACT

The increasing microbial resistance to antibiotics and the need for sustainable alternatives for pathogen control have driven the search for new bioactive compounds. In this context, this study aimed to investigate the biotechnological potential of the endophytic fungus *Fusarium* sp., isolated from the medicinal plant *Galianthe thalictroides* from the Brazilian Pantanal, through metabolomic analyses and biological assays. The fungus was cultivated under different incubation periods (7, 14, 21, 42, and 56 days) and the resulting extracts were analyzed by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS). Data processing led to 60 putative annotations, including signals compatible with compounds of biotechnological interest, such as beauvericin, farnesol, xanthine, and cyclopeptides. Metabolomic analyses revealed high chemical variability among cultivation times, with marked differences in the relative abundance of metabolites throughout incubation. In antibacterial assays, the extract obtained after 21 days of cultivation showed the most evident inhibitory effect against the bacterial strains evaluated, although the activity was moderate and no bactericidal effect was detected under the tested conditions. The divergence between the metabolomic profiles observed at longer cultivation periods and the antibacterial activity of the 21-day extract suggests the possible involvement of non-annotated metabolites, minor compounds, or synergistic effects within the crude extract. Overall, the results indicate that *Fusarium* sp. exhibits relevant metabolic diversity and represents a promising strain for future bioprospecting studies, although structural confirmation of the annotated metabolites and further evaluation of fractions or isolated compounds are required to better understand its bioactive potential.

Keywords: metabolomics; endophytic fungi; *Fusarium* sp.; natural products; antibacterial activity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
A importância de produtos naturais na área farmacêutica e agricultura	6
<i>Galianthe thalictroides</i>	7
Nicho Ecológico Endofítico	7
Fungos do Gênero <i>Fusarium</i>	8
Metabolômica global	9
2 OBJETIVOS	10
Objetivos gerais	10
Objetivos específicos	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS	10
Cultivo do fungo	11
Produção dos extratos	12
Construção dos perfis cromatográficos	Erro! Indicador não definido.
Espectrometria de massa	12
Ensaio Biológico	13
4 RESULTADOS	16
5 CONCLUSÃO	35

1 INTRODUÇÃO

A importância de produtos naturais na área farmacêutica e agricultura

A busca por novos compostos bioativos é constante, devido a problemas como a crescente resistência de bactérias aos antibióticos tradicionais e a doenças agrícolas responsáveis por perdas estimadas entre 20% e 40% das principais culturas alimentares em nível global, cenário que pode ser agravado pelas mudanças climáticas e pela maior disseminação de patógenos (Savary et al., 2019; Angelotti et al., 2024).

Um dos grandes desafios do tratamento hospitalar é a resistência antimicrobiana. Microrganismos resistentes a compostos já em uso representam uma das maiores ameaças à saúde pública, frequentemente denominada pandemia silenciosa. Esse cenário resulta na crescente ineficácia de antibióticos utilizados contra bactérias como *Staphylococcus*, *Escherichia* e *Streptococcus*. A crise se agrava pela escassez de novas estratégias terapêuticas, e estima-se que, caso o quadro atual persista, até 10 milhões de mortes anuais poderão ser atribuídas à resistência antimicrobiana até 2050, reforçando a necessidade de descoberta de novos agentes antimicrobianos (Strobel; Daisy, 2003; Salam et al., 2023).

Modelos climáticos projetam que o Brasil, assim como outros países tropicais, enfrentará maior frequência de eventos extremos, como secas prolongadas, ondas de calor e chuvas intensas (Lorenz et al., 2026). Essas condições podem favorecer a expansão geográfica de patógenos, alterar períodos de infecção e aumentar a severidade de epidemias agrícolas (Angelotti et al., 2024). O aumento de perdas em plantações devido a doenças agrícolas, muitas delas causadas por fungos, constitui um desafio preocupante, especialmente pela maior variabilidade observada em culturas de longa duração. Devido às mudanças climáticas é estimado que cerca de 46% das doenças agrícolas que ocorrem no Brasil devem se tornar mais graves até o ano de 2100 (Angelotti et al., 2024). O aumento da severidade e da frequência de doenças em um cenário de mudanças climáticas pode ampliar o uso de defensivos químicos, elevando custos de produção e impactos ambientais (Angelotti et al., 2024). Esse modelo de intensificação, entretanto, não é sustentável a longo prazo. Alternativas baseadas em microrganismos benéficos, como biofungicidas e promotores de crescimento vegetal, ganham relevância como componentes de estratégias integradas de manejo de doenças agrícolas em um cenário de mudanças

climáticas. Nesse contexto, destaca-se a busca por soluções mais sustentáveis para o controle de patógenos e pragas. No Brasil, o Programa Nacional de Bioinsumos, instituído pelo Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020, tem como propósito estimular a produção, o desenvolvimento e o uso de tecnologias baseadas em insumos biológicos. (Angelotti et al., 2024).

Nesse contexto, organismos como plantas e fungos constituem fontes relevantes de produtos naturais com potencial bioativo. A bioprospecção de microrganismos endofíticos, associada a abordagens metabolômicas, representa uma estratégia promissora para a descoberta de metabólitos com possível atividade antimicrobiana e antifúngica. (Figueiredo et al., 2011; Piombo et al., 2021).

Galianthe thalictroides

A planta da qual o fungo estudado neste trabalho foi isolado, *Galianthe thalictroides* também conhecida como baicuru apresenta utilização etnobotânica associada principalmente ao preparo de raízes e folhas na forma de “garrafadas”, chás e misturas adicionadas ao tereré, bebida tradicional consumida na região Centro-Oeste do Brasil (Figueiredo et al., 2011).

Estudos fitoquímicos demonstraram que *G. thalictroides* possui elevada diversidade metabólica, sendo descrita a produção de alcaloides β -carbolínicos com atividade citotóxica, ciclopeptídeos do tipo-Rubiaceae, além de flavonoides, cumarinas, antraquinonas e esteroides (Figueiredo et al., 2011). A presença dessas classes químicas reforça o potencial farmacológico da espécie e evidencia sua relevância como fonte de metabólitos bioativos.

Até o momento, entretanto, existem poucos relatos relacionados à investigação metabolômica e biológica de fungos endofíticos associados a essa espécie vegetal, o que evidencia o caráter ainda pouco explorado desse sistema e reforça a relevância do presente estudo para a bioprospecção de metabólitos fúngicos.

Nicho Ecológico Endofítico

Os fungos endofíticos constituem um grupo diverso de microrganismos que habitam tecidos vegetais de forma assintomática (Demain, 2014). Esses organismos estabelecem uma relação íntima com a planta hospedeira, ocupando um nicho ecológico altamente competitivo e dinâmico (Aly et al., 2011; Alam et al., 2021).

Nesse ambiente, a sobrevivência dos endófitos depende da capacidade de produzir metabólitos secundários que desempenham funções ecológicas essenciais. Tais compostos podem atuar como agentes antimicrobianos, antifúngicos, inseticidas ou moduladores de crescimento, contribuindo para a defesa da planta hospedeira contra patógenos. Em troca, o fungo se beneficia de abrigo, acesso a nutrientes e proteção contra variações ambientais extremas, caracterizando uma relação frequentemente mutualística (Kusari et al., 2014; Alam et al., 2021).

A intensa competição microbiana dentro dos tecidos vegetais favorece a evolução de vias biossintéticas especializadas, resultando em grande diversidade química. Como consequência, fungos endofíticos são reconhecidos como fontes promissoras de moléculas bioativas com potencial aplicação farmacêutica, agrícola e biotecnológica. Diversos compostos com atividade já foram descritos a partir desses microrganismos, evidenciando o papel do nicho endofítico como um reservatório de diversidade metabólica ainda pouco explorado (Kusari et al., 2014; Wei; Wu, 2020; Alam et al., 2021).

Fungos do Gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* engloba fungos ascomicetos filamentosos, inclui mais de 330 espécies agrupadas em 23 complexos de espécies, e foram encontradas em mais de 1000 espécies de plantas (Gasser et al., 2023; Wei; Wu, 2020). Várias espécies de *Fusarium* são capazes de produzir uma variedade de micotoxinas que são amplamente distribuídas na natureza, agindo como patógenos e sendo responsáveis por causar perdas em plantações de grãos e na pós-colheita (Gasser et al., 2023; Piombo et al., 2021). No entanto, muitas evidências também indicam que o gênero *Fusarium* possui capacidade potencial para produzir um grande número de metabólitos secundários com atividades biológicas significativas, como antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatórias e antioxidantes (Wei; Wu, 2020; Jiang et al., 2019).

Fungos desse gênero também podem ser encontrados como endófitos, apresentando interação comensal ou mutualística com a planta hospedeira. A linhagem endofítica objeto de estudo neste trabalho foi isolada da espécie vegetal *G. thalictroides*, coletada no domínio morfoclimático do pantanal. Popularmente conhecida como baicuru, a planta é utilizada tradicionalmente na forma de chás e garrafadas medicinais. A investigação do metabolismo da *G. thalictroides* revelou a

produção de diversas moléculas de interesse, com destaque para um novo alcaloide b-carbonílico que apresentou forte atividade citotóxica frente a linhagens cancerígenas (Figueiredo et al., 2011). No entanto, estudos sobre endófitos isolados dessa espécie vegetal ainda não foram publicados.

O estudo químico e biológico de fungos endofíticos pode contribuir para a identificação de linhagens promissoras e para a compreensão de sua diversidade metabólica (Santos et al., 2020). Nesse sentido, a investigação metabolômica de *Fusarium* sp., isolado de *G. thalictroides*, pode fornecer informações relevantes sobre os metabólitos secundários produzidos por essa linhagem e orientar estudos futuros de prospecção química e biológica.

Metabolômica global

A metabolômica é uma ferramenta essencial na prospecção de metabólitos secundários produzidos por microrganismos, plantas ou outros organismos e permite a análise abrangente do conjunto de metabólitos presentes em uma amostra, sem a necessidade de definição de compostos-alvo (Patti et al., 2012; Wolfender et al., 2019).

Essa abordagem é relevante na investigação metabólica de fungos endofíticos pois são microrganismos que apresentam elevada diversidade metabólica e capacidade de produzir moléculas estruturalmente complexas e biologicamente ativas (Kusari et al., 2012). Também permite a comparação de perfis químicos obtidos sob diferentes condições de cultivo como diferentes tempos de cultivo ou estratégias de extração, contribuindo para a compreensão da dinâmica de produção de metabólitos secundários (Bode et al., 2002).

A metabolômica global é geralmente realizada por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS), devido a sua elevada detectabilidade e exatidão de massa (Blaženović et al., 2018; Kim; Heyman, 2018).

Uma das principais vantagens dessa estratégia é a possibilidade de integrar dados químicos e biológicos, permitindo a correlação entre perfis metabolômicos e atividades observadas em bioensaios. Por este motivo essa abordagem tem sido amplamente utilizada na descoberta de novos compostos antimicrobianos, contribuindo para a identificação de metabólitos e direcionando etapas posteriores de fracionamento bioguiado e isolamento (Wolfender et al., 2019; Deshmukh et al., 2022).

2 OBJETIVOS

Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi utilizar uma abordagem metabolômica para investigar o perfil químico do fungo endofítico *Fusarium* sp., isolado da espécie vegetal *Galianthe thalictroides*, com ênfase na anotação putativa de metabólitos secundários e na avaliação preliminar de seu potencial antibacteriano.

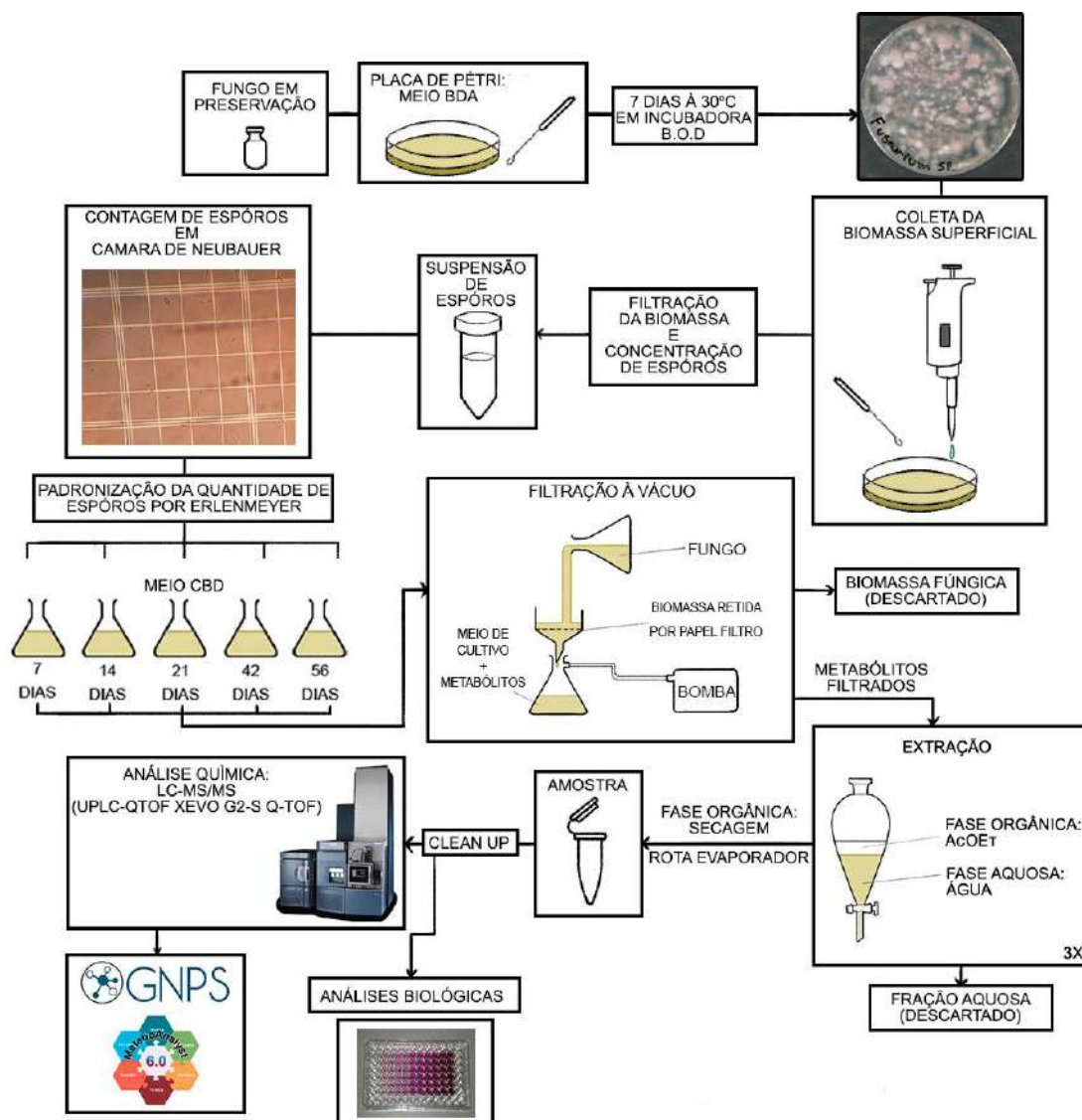
Objetivos específicos

- I. Realizar uma análise exploratória do perfil metabólico do fungo, anotando putativamente metabólitos presentes nos diferentes tempos de cultivo avaliados..
- II. Descrever variações no perfil metabolômico de *Fusarium* sp. ao longo de diferentes tempos de incubação, contribuindo para o conhecimento químico de fungos endofíticos associados a *G. thalictroides*.
- III. Testar a atividade antimicrobiana dos extratos através de ensaios frente a bactérias resistentes a antibióticos;
- IV. Correlacionar os resultados biológicos e os dados metabolômicos evidenciando a presença de metabólitos potencialmente associados a atividade observada e evidenciando o potencial do fungo como fonte de novas moléculas bioativas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A figura 1 resume as etapas experimentais adotada neste trabalho, desde o cultivo do fungo *Fusarium* sp. e obtenção dos extratos, até as análises metabolômicas por LC-HRMS e os ensaios biológicos empregados para avaliação do potencial biotecnológico dos metabólitos produzidos.

Figura 1 - Fluxograma da metodologia realizada.



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Cultivo do fungo

O fungo *Fusarium* sp. foi recuperado da preservação e transferido para placas contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA), nas quais foi cultivado por 7 dias, a 30 °C, em incubadora B.O.D. Esse período de crescimento foi utilizado para permitir o desenvolvimento da colônia e a formação de esporos viáveis para a etapa subsequente de inoculação. Após o cultivo em meio sólido, foi preparada uma suspensão de esporos em condições assépticas, cuja concentração foi determinada por contagem em câmara de Neubauer. A suspensão obtida foi então ajustada para $5,0 \times 10^6$ esporos/mL, de modo a padronizar a quantidade inicial de inóculo utilizada nos cultivos em meio líquido Caldo Batata Dextrose (CBD) da fabricante NEOGEN.

O processo de incubação foi padronizado para garantir a mesma quantidade inicial de esporos. Para isso, o endófito *Fusarium* foi inicialmente cultivado por sete dias em meio sólido Batata Dextrose Ágar. Em seguida, os esporos aéreos foram coletados com uma alça de platina estéril e transferidos para um tubo de ensaio de vidro contendo água destilada previamente esterilizada em autoclave. A concentração de esporos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e ajustada para $5,0 \times 10^6$ esporos/mL em um novo tubo de ensaio. Todos os experimentos subsequentes foram conduzidos a partir dessa solução.

Para os experimentos em meio líquido, foram preparados 20 erlenmeyers, cada um contendo 200 mL de meio de cultivo, conforme as especificações do fabricante (Neogen). Foram preparados 15 erlenmeyers inoculados, correspondentes a três cultivos independentes para cada um dos cinco tempos avaliados: 7, 14, 21, 42 e 56 dias, além de cinco controles negativos sem inoculação. No entanto, devido à baixa massa obtida em algumas réplicas, os extratos correspondentes ao mesmo tempo de cultivo foram reunidos antes das análises químicas e biológicas. Dessa forma, as análises metabolômicas devem ser interpretadas como exploratórias e descritivas, uma vez que as réplicas biológicas não foram mantidas de forma independente na etapa analítica. Os controles tiveram como finalidade acompanhar possíveis contribuições do próprio meio de cultura ou de eventuais interferentes do processo experimental nas análises químicas e biológicas posteriores.

Produção dos extratos

Após cada período de cultivo, o conteúdo dos erlenmeyers foi filtrado para separar a biomassa fúngica do meio líquido contendo os metabólitos extracelulares. A biomassa foi descartada, e o filtrado foi submetido à extração líquido-líquido com acetato de etila. Cada amostra foi extraída três vezes, utilizando-se 200 mL de AcOEt em cada extração. As fases orgânicas obtidas foram reunidas e concentradas em evaporador rotativo até a remoção do solvente. Devido à baixa massa obtida em algumas réplicas, os extratos correspondentes ao mesmo tempo de cultivo foram reunidos antes das análises químicas e biológicas.

Espectrometria de massa

Os extratos secos foram preparados para análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de alta resolução (LC-HRMS). As amostras

foram preparadas realizando o *clean up* por extração em fase sólida, passando os extratos por um cartucho Sep-Pak C18 (500 mg), as amostras foram preparadas na concentração de 250ppm de extrato. A seguir, foram analisadas em um sistema UPLC-QToF Xevo G2-S Q-TOF (Waters Corporation), fonte de ionização por eletrospray (ESI), coluna Kinetex C18, 150 x 4,60mm. Os parâmetros cromatográficos foram: fluxo gradiente linear exploratório, com fase móvel A (0,1% de ácido fórmico, em H₂O) e B (0,1% de ácido fórmico, em acetonitrila); (B): 5-100% de 10 minutos, em vazão de 0.5 mL/min, temperatura da coluna de 50°C e volume de injeção de 1 µL. A epigalocatequina (10 ppm) foi utilizada como padrão interno.

Análises em DDA (Data Dependent Aquisition) foram realizadas com capilar: 2,5 kV; rampa de energia de colisão LM, começo: 10 eV; rampa de energia de colisão LM fim: 30 eV; rampa de energia de colisão HM, começo: 50 eV; rampa de energia de colisão HM fim: 70 eV; energia de colisão: 4 eV

Os dados espectrométricos foram analisados por ferramentas computacionais, como o GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) (Wang et al., 2016) para auxiliar na desreplicação e anotação de substâncias conhecidas e formação de redes moleculares para propagar as anotações de maior confiança, e o Metaboanalyst (Pang et al., 2024) para análises estatísticas e discriminantes, de forma a destacar como o fungo alterou sua produção metabólica de acordo com o tempo de incubação.

Ensaio Biológicos

As análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Moleculares (LEMiMo) da Profa. Dra. Ilana Camargo, da USP-São Carlos.

Para a triagem inicial:

Cada composto foi diluído em DMSO para a preparação de uma solução estoque 100× concentrada. Posteriormente, a solução estoque foi diluída 1:100 em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (MHCA) (BD), contendo corante H (Biolog) na proporção de 1,05%, seguida de filtração em membrana de 0,22 µm para evitar possíveis contaminações. A partir disso, cada composto foi testado a 512 µg/mL e a adição do inóculo foi realizada de acordo com o método de microdiluição em caldo (CLSI, 2015). No controle positivo foi adicionada bactéria sem o composto para se observar o crescimento da mesma em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado. No

controle negativo, há apenas o meio de cultura caldo Mueller-Hinton cátion ajustado, sem bactéria, para mostrar que não há contaminação do mesmo. Nos casos em que o composto testado não pode ser filtrado devido à formação de uma suspensão no meio, além do controle negativo padrão, é adicionado um segundo controle negativo. Neste, há o caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado com 512 µg/mL de composto, sem bactéria. Este controle é monitorado para verificar a possível presença de crescimento bacteriano. Caso haja detecção de redução do corante H, há indicativo da presença de bactérias no meio e, portanto, da presença de possível contaminação. Caso não haja a redução do corante H, tem-se a ausência de contaminação.

A incubação foi realizada com o auxílio do aparelho Equipamento Multiusuário OmniLog Phenotypic Microarray (Biolog Inc, Hayward, CA, EUA) (Processo FAPESP 2019/07606-8 referente a esse EMU), a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h, que faz a leitura cinética do crescimento bacteriano (a cada 15 minutos) baseada no metabolismo, seguida também de leitura visual das placas após o período de incubação.

Quando não houve crescimento bacteriano, a triagem foi considerada positiva e indica que houve atividade antibacteriana na concentração testada. Neste caso, a concentração inibitória mínima pode ser 512 µg/mL ou menos ($\leq 512 \mu\text{g/mL}$). Quando houve crescimento bacteriano, a triagem foi considerada negativa e indica que não há atividade antibacteriana na concentração testada. A triagem negativa não exclui a possibilidade deste composto apresentar atividade antibacteriana em concentrações maiores, por isso, o resultado é expresso como “ $> 512 \mu\text{g/mL}$ ”. Os testes foram realizados em triplicata.

Caso alguma amostra tenha resultado de triagem positivo ($\leq 512 \mu\text{g/mL}$), uma maior quantidade deste composto poderá ser solicitada para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM).

Os dados foram coletados no software Biolog - Omnilog Data Collection v. 3.0 e os gráficos foram confeccionados com o auxílio do software Origin® 2020 v.9.7.0.185 (OriginLab), quando necessário.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima:

Para a determinação da CIM, foram utilizadas todas as linhagens da espécie bacteriana que se mostraram sensíveis ao composto. Cada composto foi diluído em DMSO e preparado uma solução estoque 10x concentrada, posteriormente, a solução estoque foi diluída 1:100 em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) (BD),

contendo corante H (Biolog) na proporção de 1,05%, seguida de filtração em membrana de 0,22 µm para evitar possíveis contaminações, todo o procedimento foi realizado seguindo o preconizado pelo (CLSI, 2013). A partir disso, cada composto foi testado em 512 µg/ml, ou na maior concentração em que foi possível dissolver o composto sem que houvesse precipitação. Dos poços do composto a 512 µg/ml partiram as diluições seriadas (1:2) até a concentração de 0,06 µg/ml. A incubação foi realizada com o auxílio do aparelho OmniLog® (Biolog) a 36 °C ± 1 °C por 24h, seguida de leitura visual das placas na qual observou-se até qual concentração o composto conseguia inibir o crescimento do microrganismo. No controle positivo foi adicionada bactéria apenas com DMSO sem composto para se observar o crescimento da mesma em caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado. No controle negativo, há apenas o meio de cultura caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado, sem bactéria, para mostrar que não há contaminação do mesmo, ambos controles também receberam o corante H na mesma proporção. Os testes foram realizados em triplicata.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima:

Após a leitura visual da CIM, inoculou-se 100 µL do conteúdo do poço equivalente a CIM, uma diluição abaixo e duas acima, em placa de MHCA-Ágar por técnica de microgota, sem estriar. A placa foi incubada em estufa a 37°C por 24 horas, quando foi feita a leitura visual para observar qual concentração não houve o crescimento bacteriano. Para a determinação da atividade como bactericida ou bacteriostática, os compostos que tiveram a razão CBM/CIM menor ou igual a quatro foram considerados bactericidas, acima disso sendo consideradas bacteriostáticas (Pankey; Sabath, 2004).

Descarte/ Tratamento de Resíduos

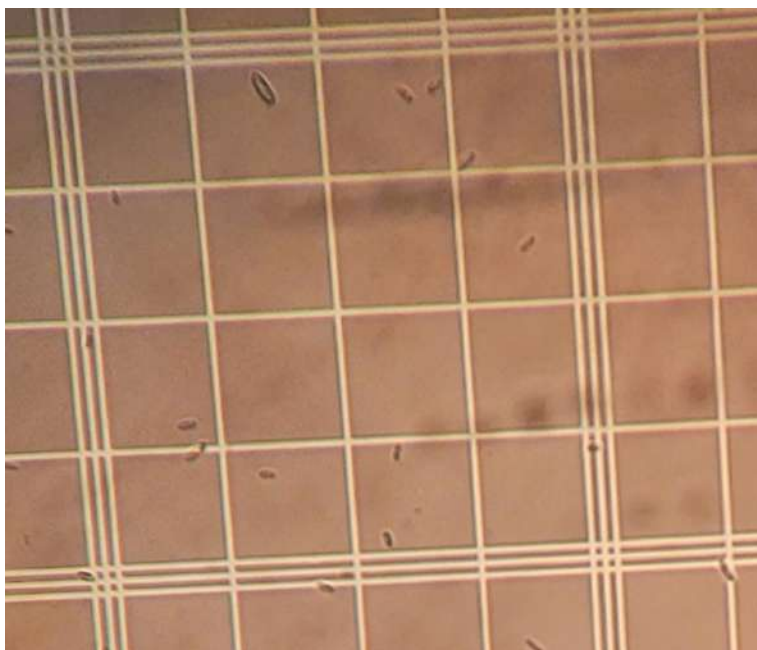
Os solventes orgânicos recuperados nas partições, extrações e demais procedimentos foram tratados, segregados e destinados, a local adequado, conforme as normas e os procedimentos descritos no site www.iq.unesp.br

Para os descartes dos materiais contaminados com o fungo ou das biomassas foram submetidos à esterilização em autoclave, utilizando vapor saturado sob pressão a 121 °C por 15 a 20 minutos.

4 RESULTADOS

O fungo foi inoculado em meio PDB, preparado conforme as recomendações do fabricante NEOGEN, dissolvendo a quantidade adequada do meio em água ultrapura com resistividade de 18 uS (micro Siemens).

Figura 2 - Contagem de esporos em Câmara de Neubauer.



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Após o tempo determinado de crescimento os extratos foram preparados conforme descritos na seção de Materiais e Métodos, obtendo a massa dos extratos descritos na Tabela 1. Devido à baixa massa obtida em algumas réplicas, os extratos correspondentes ao mesmo tempo de cultivo foram reunidos antes das análises químicas e biológicas. Assim, as massas apresentadas na Tabela 1 correspondem aos extratos combinados de cada tempo de cultivo. Essa estratégia permitiu obter material suficiente para as análises, mas limita a interpretação estatística dos dados, uma vez que as réplicas biológicas não foram mantidas de forma independente. Os extratos secos foram solubilizados em MeOH-H₂O (95:5) na concentração de 0,25mg/mL previamente à análise de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, utilizando a metodologia descrita na seção anterior.

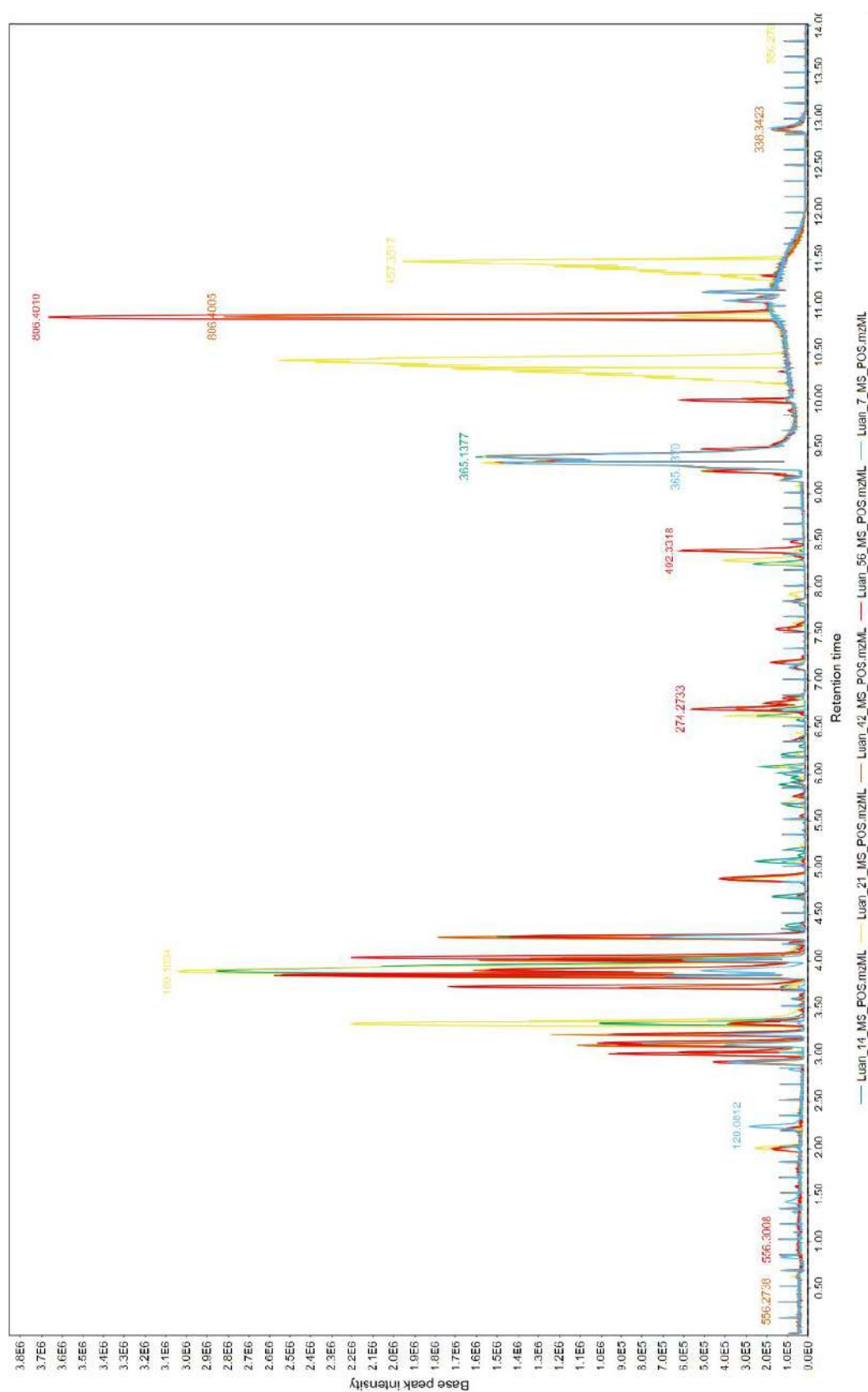
Tabela 1 - Massa dos extratos após a eliminação completa dos solventes. Os brancos correspondem aos controles negativos preparados para cada tempo de cultivo, contendo apenas o meio de cultura, sem inoculação do fungo.

Experimento	Massa do extrato (mg)
Branco 1	16,3
7 dias	43,3
Branco 2	5,2
14 dias	41
Branco 3	6,3
21 dias	38
Branco 4	9,6
42 dias	16,1
Branco 5	26,6
56 dias	11,7

Fonte: elaborada pelo próprio autor.

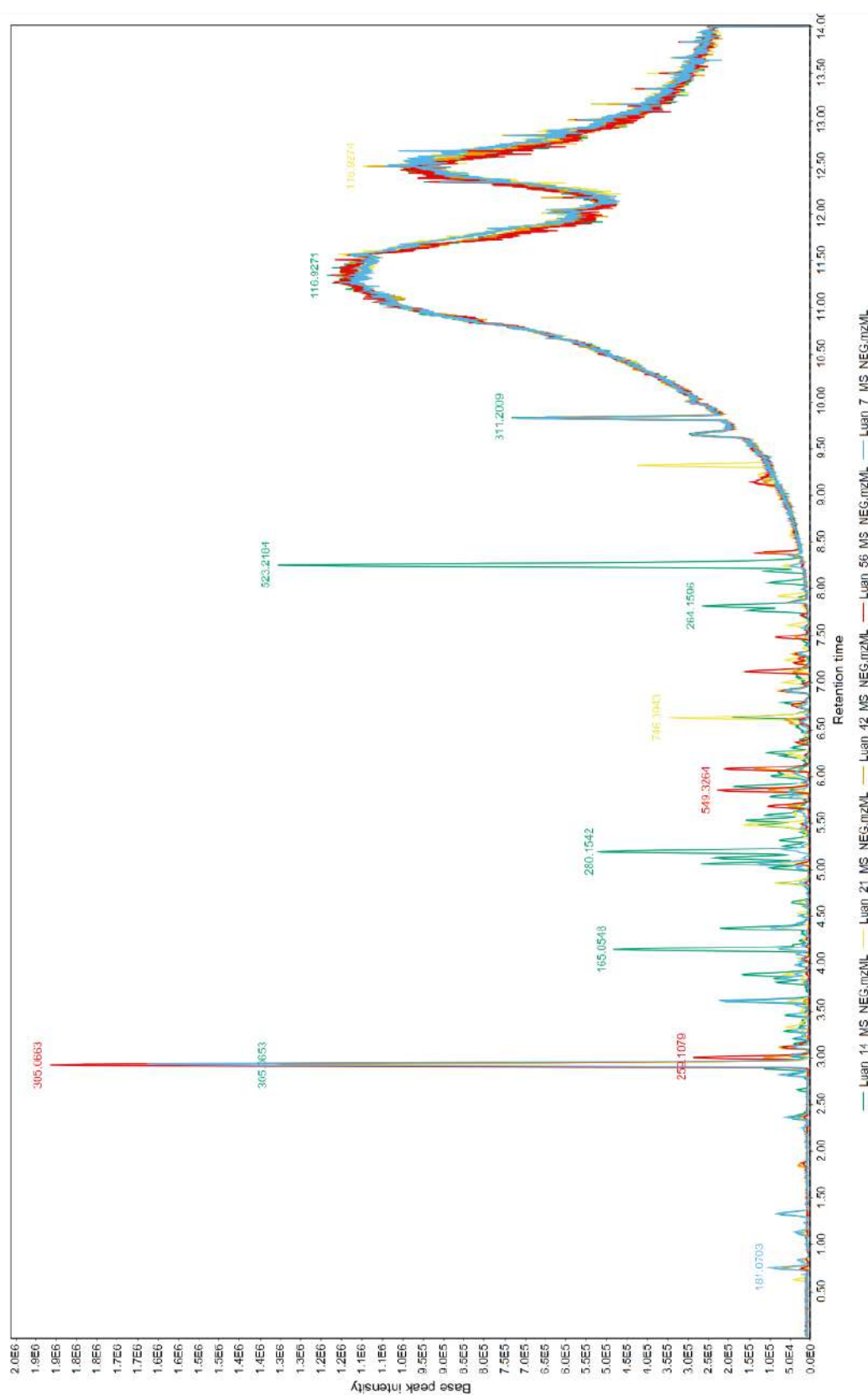
Os dados de espectrometria de massas foram tratados inicialmente pela conversão dos dados brutos “.WatersRAW” para o formato de código aberto “.mzML” (Martens et al., 2011), mais comum na comunidade de espectrometria de massas, para subsequente acesso e utilização utilizando programas de livre acesso, como MZMine (Schmid et al., 2023).

Figura 3 - Cromatogramas das análises em espectrômetro de massas no modo positivo.



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Figura 4 - Cromatogramas das análises em espectrômetro de massas no modo negativo.



Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Concomitantemente, foi feita uma curadoria de substâncias já relatadas como produto natural derivado de fungos do gênero *Fusarium* utilizando a plataforma online Natural Products Atlas (<https://www.npatlas.org/>), contendo 3283 substâncias ao todo, com importantes informações como o nome comum, a massa neutra, e estrutura (em formato de SMILES). Os espectros foram importados para o MZMine 4.5.0. Os sinais correspondentes aos metabólitos foram extraídos utilizando os seguintes parâmetros: Mass detection: MS level 1: signal intensity above 1E3; Chromatogram builder -> MS level 1; minimum consecutive number of scans: 5; Minimum intensity for consecutive scans 1E3; minimum absolute height: 3E3; m/z tolerance: 10 ppm. Local minimum feature resolver: chromatographic threshold: 89.1%; min ratio of peak/top edge: 1.8; peak duration range: 0 - 1.51; minimum scans (data points): 4. ¹³C isotope filter: intra-sample tolerance: 3 ppm; monotonic shape: yes; representative isotope: most intense; maximum charge: 2. Join aligner: sample-to-sample tolerance: 8 ppm; weight for m/z: 3; weight for rt: 1; retention time tolerance: 0.1 min. Feature finder (multithreaded): intensity tolerance: 20%; sample-to-sample tolerance: 20 ppm; minimum scans (data points): 2. Correlation grouping (metaCorrelate): rt tolerance: 0.06 min; minimum feature height: 0E0; intensity threshold for correlation: 1E3; feature shape correlation: min data points: 5; min data points on edge: 2; measure: Pearson; min feature correlation: 85%. feature height correlation: minimum samples: 2; measure: Pearson; min correlation: 70%. Ion identity networking: mz tolerance (intra-sample): 3 ppm; check: all features; ion identity library: M+ H; Na; NH₄; K <positivo>, M-H; M+Cl; M+FA <negativo>. Feature list blank subtraction: minimum # of detection in blanks: 3; quantification: area, fold change increase: 300%; only keep features above fold change. Local compound database search: database file: <biblioteca curada exportada pelo Natural Products Atlas>.csv; columns: "neutral mass", "formula", "SMILES", "name"; m/z tolerance: 10 ppm; use adducts: [M+H], [M+Na], [M+NH₄] <positivo>, [M-H], [M+Cl] <negativo>. Export to GNPS/FBMN. Export for statistics (Metaboanalyst). Export all annotations to a CSV file.

O processamento de dados pelo MZMine gerou uma matriz de dados de quantificação relativa, derivados da área dos sinais extraídos. Os sinais foram extraídos e resolvidos baseados na relação massa carga (m/z) e tempo de retenção (t_R), diferenciando corretamente a presença de isômeros e outras substâncias que compartilham a mesma m/z . Foi aplicado um filtro para a exclusão de isótopos,

seguido pelo alinhamento dos sinais das diferentes amostras. O módulo *feature finder* interroga a presença de falsos negativos e re-inclui na lista sinais eliminados em etapas anteriores, baseado em uma porcentagem de tolerância de intensidade definida pelo usuário. Os módulos *Correlation grouping* e *Ion identity networking* correlacionam sinais que possuem mesmo formato de pico e tempo de retenção, e anota os íons moleculares pela diferença de massa em daltons.

Os sinais extraídos foram desreplicados dentro do MZMine utilizando a biblioteca produzida internamente com os metabólitos previamente relatados no gênero *Fusarium*, e biblioteca de compostos do GNPS utilizando o módulo Local compound database search. Foram obtidas 60 anotações putativas, incluindo sinais compatíveis com metabólitos fúngicos e análogos estruturais (Tabela 2).

Tabela 2 - Anotações putativas de metabólitos detectados no extrato de *Fusarium* sp. por busca em banco de dados e/ou similaridade espectral MS/MS. O símbolo (*) indica compostos anotados com base em similaridade espectral com o composto nomeado, não correspondendo necessariamente a uma identificação inequívoca.

m/z	tR (min)	Anotação putativa	Aduto
262.13	0.83	N-frutossil isoleucina	
153.04	1.12	Xanthine	[M+H] ⁺
268.1	1.26	Adenosine	[M+H] ⁺
294.15	1.41	L-tert-leucine_D(-)-Fructose	[M+H] ⁺
196.1	2.01	Ácido 4-pentinoico	[M+Na] ⁺
169.1	2.21	*Leu-Pro	[M+H] ⁺
310.13	2.22	*N-frutossil isoleucina	[M+K] ⁺
328.14	2.22	N-frutossil fenilalanina	[M+H] ⁺
120.08	2.23	L-quinurenina	[M+H] ⁺
166.09	2.23	Fenilalanina	[M+H] ⁺
227.1	2.36	*PirroGlu-Val	[M+H] ⁺
146.06	2.95	4-hidroxiquinolina	[M+H] ⁺
188.06	3.02	L-triptofano	[M+H] ⁺
261.12	3.1	*ciclo(L-Val-L-Pro)	[M+H] ⁺
303.13	3.18	*Ile-Gly-Ile	[M+H] ⁺
197.13	3.22	*ciclo(prolina-leucina)	[M+H] ⁺
178.09	3.33	Ácido 5,6,7,8-tetrahydroquinolina-2-carboxílico	[M+H] ⁺
185.13	3.45	*Ácido cis-5-dodecenoico	[M+H] ⁺
169.08	3.52	Carbolina	[M+H] ⁺
219.11	3.59	*Phe-Phe	[M+H] ⁺

. **Fonte:** elaborada pelo próprio autor.

Tabela 2 - Anotações putativas de metabólitos detectados no extrato de *Fusarium* sp. por busca em banco de dados e/ou similaridade espectral MS/MS. O símbolo (*) indica compostos anotados com base em similaridade espectral com o composto nomeado, não correspondendo necessariamente a uma identificação inequívoca (continuação).

261.12	3.63	*Phe-Leu	[M+H] ⁺
211.14	3.7	*ciclo(L-Val-L-Pro)	[M+Na] ⁺
183.09	3.75	Harman	[M+H] ⁺
315.13	3.79	Ascomatato de metila	[M+H] ⁺
211.14	3.84	*ciclo(L-Val-L-Pro)	[M+Na] ⁺
180.1	3.89	Ácido fusárico	[M+H] ⁺
211.14	4.01	*ciclo(L-Val-L-Pro)	[M+Na] ⁺
245.13	4.03	*ciclo(Phe-4-hidroxi-Pro)	[M+H] ⁺
311.14	4.19	*ciclo(Phe-Leu)	[M+Na] ⁺
245.13	4.25	*ciclo(Phe-4-hidroxi-Pro)	[M+H] ⁺
265.1	4.26	Ácido 3-(4-hidroxifenil)propiónic	[M+Na] ⁺
284.14	4.39	*piperazinediona derivada	[M+H] ⁺
195.06	4.54	*Caffeato de etila	[M+H] ⁺
243.09	4.57	Lumicromo	[M+H] ⁺
247.14	4.65	*Phe-Pro	[M+H] ⁺
164.11	4.69	N-acetil-2-feniletilamina	[M+H] ⁺
261.16	5.07	*ciclo(L-Leu-L-Pro)	[M+H] ⁺
246.24	5.76	Ácido 12-metiltridecanoico	[M+Na] ⁺
271.06	5.78	*Dihidrokaempferol	[M+H] ⁺
193.13	6.08	*Costunolida	[M+H] ⁺
203.18	6.33	*Esclareolida	[M+H] ⁺
690.4	6.44	Fumonisina B4	[M+H] ⁺
251.14	6.57	Trigonelina	[M+H] ⁺
748.41	6.62	*Fumonisina B2	[M+H] ⁺
203.18	6.64	*Suspeito terpênico	[M+H] ⁺
165.09	6.69	*Caffeato	[M+H] ⁺
318.3	6.76	Ácido 12-hidroxi-octadecanoico	[M+Na] ⁺
290.27	6.77	Ácido 6-hidroxi-hexanoico	[M+Na] ⁺
194.12	6.77	Ácido 3,3-dimetilacrílico	[M+Na] ⁺
205.2	7.19	Farnesol	[M+H] ⁺
330.34	8.34	Ácido icosanoico	[M+Na] ⁺
346.33	8.38	*D-eritro-esfinganina	[M+H] ⁺
490.32	9.17	Oxysporidinone	[M+H] ⁺
263.24	9.31	Ácido (R,Z)-12-hidroxi-octadec-9-enoico	[M+H] ⁺
476.34	9.47	Homoserina	[M+H] ⁺
512.41	10.38	*Fosfatidilcolina hexadecenil	[M+H] ⁺
801.44	10.89	Beauvericina	[M+NH ₄] ⁺
784.42	10.89	Beauvericina	[M+H] ⁺

. **Fonte:** elaborada pelo próprio autor.

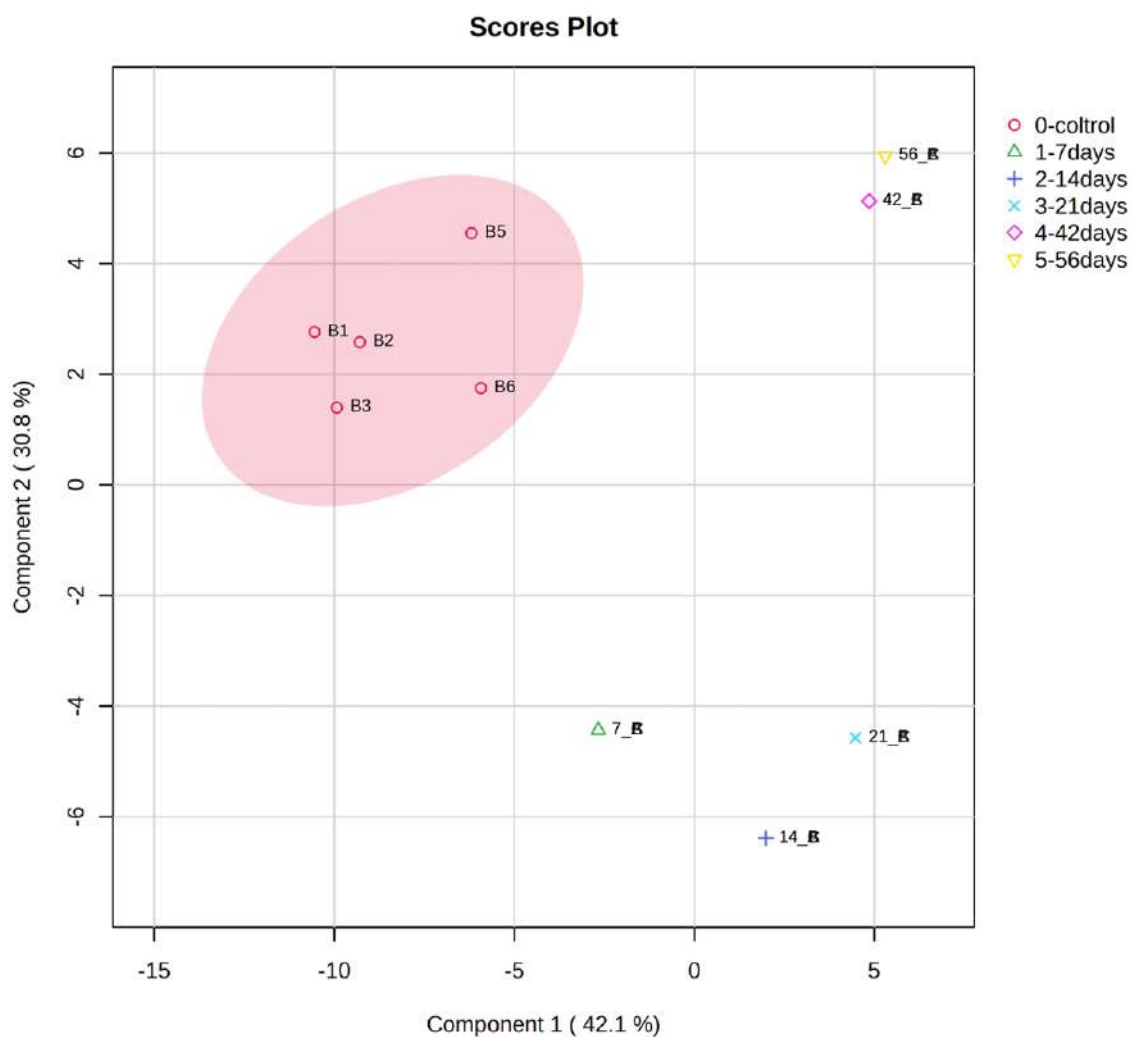
Tabela 2 - Anotações putativas de metabólitos detectados no extrato de *Fusarium* sp. por busca em banco de dados e/ou similaridade espectral MS/MS. O símbolo (*) indica compostos anotados com base em similaridade espectral com o composto nomeado, não correspondendo necessariamente a uma identificação inequívoca (conclusão).

806.4	10.89	Beauvericina	[M+Na] ⁺
282.28	11.06	*Ácido trans-vaccênico	[M+H] ⁺

. **Fonte:** elaborada pelo próprio autor.

Os cromatogramas e a matriz resultante do processamento dos dados indicaram diferenças no perfil químico relativo dos extratos de *Fusarium* sp. ao longo dos tempos de incubação. Para visualizar essa variação, os dados foram projetados em uma análise exploratória de PLS-DA, apresentada na Figura 5. Considerando que os extratos de cada tempo foram reunidos antes das análises, essa abordagem deve ser interpretada de forma descritiva.

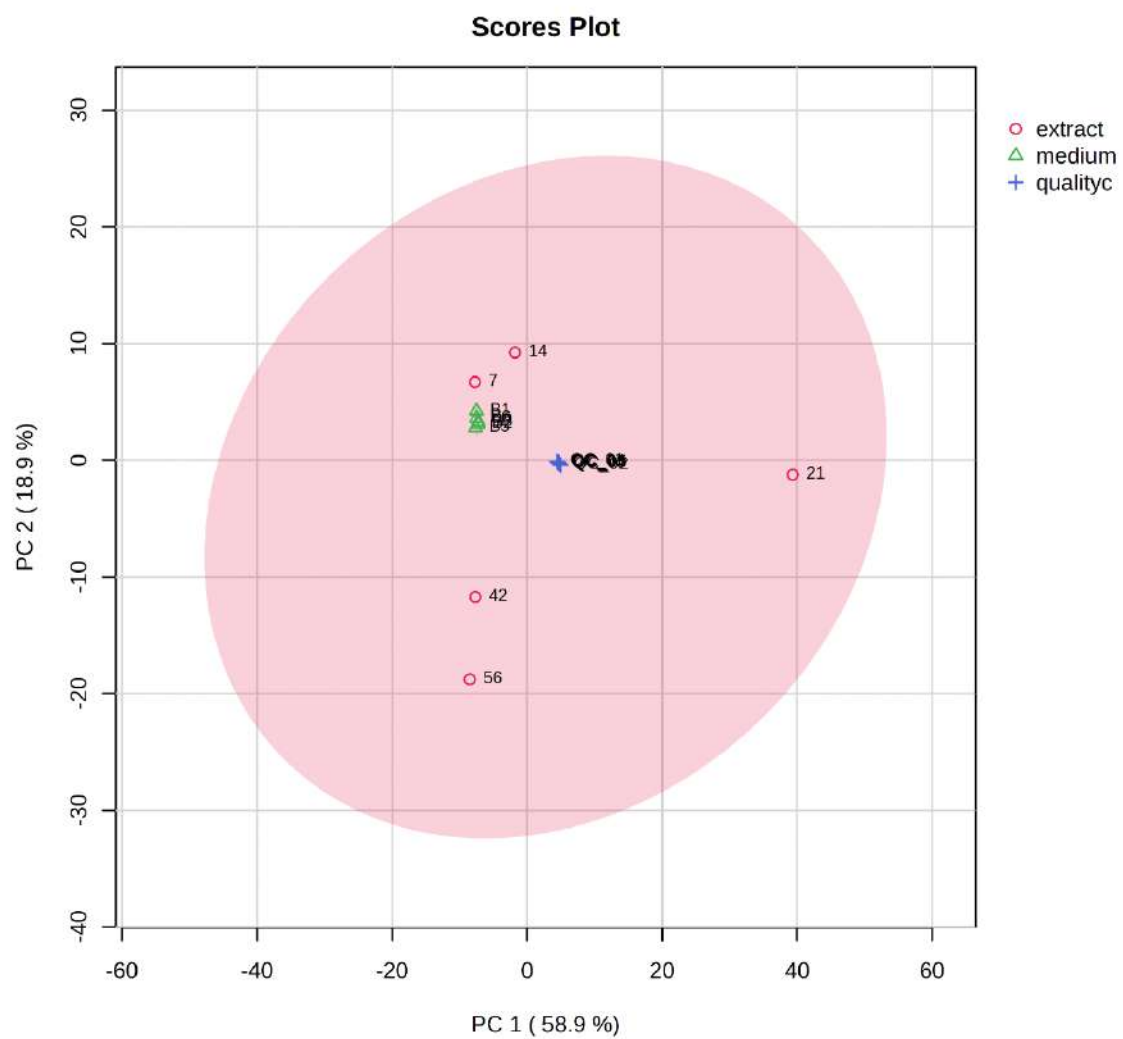
Figura 5 - Gráfico PLS-DA correspondente aos experimentos em seus diferentes tempos de cultivo



. **Fonte:** elaborada pelo próprio autor.

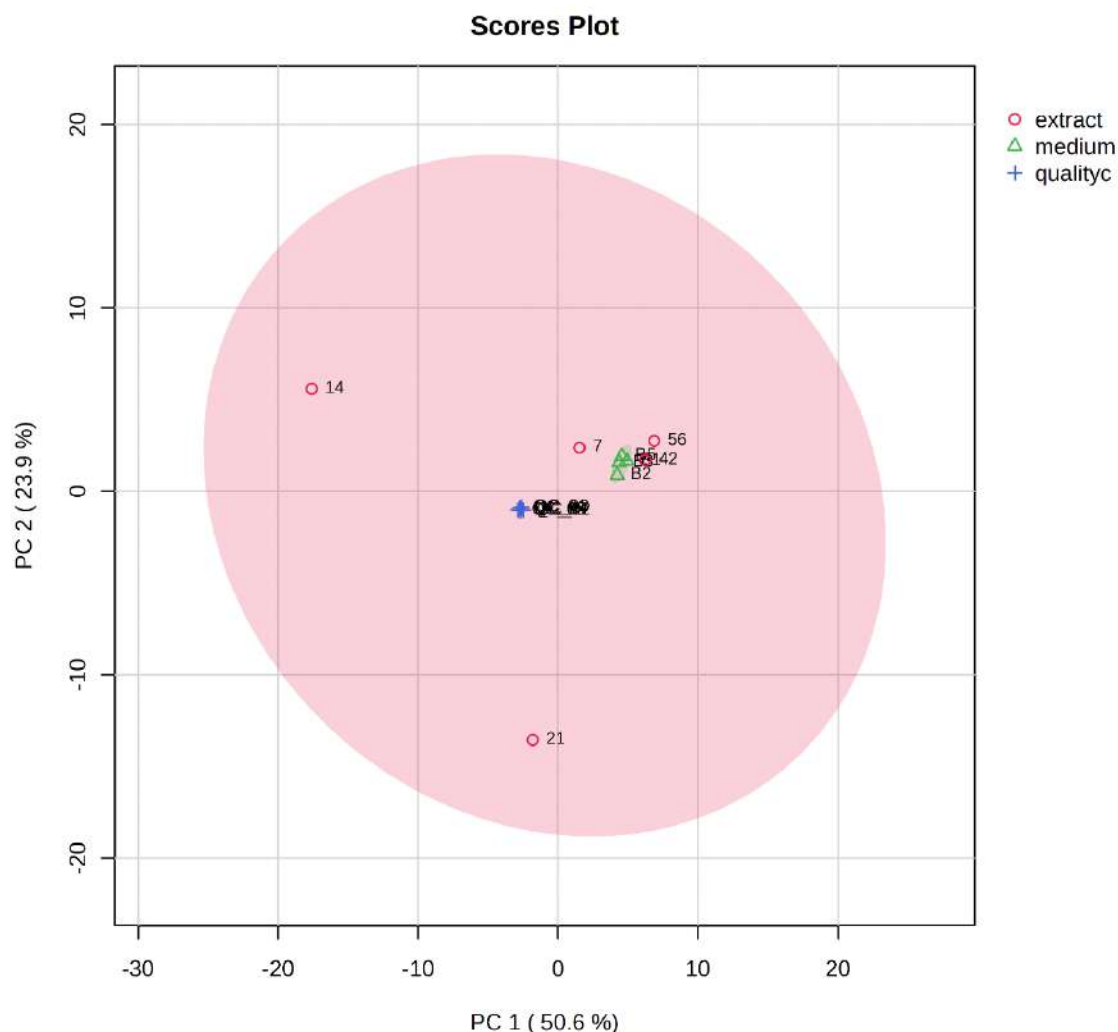
No gráfico, observa-se o agrupamento das amostras controle, correspondentes aos brancos do meio de cultivo, em uma região delimitada por um círculo avermelhado. Esse agrupamento é esperado, uma vez que essas amostras não foram inoculadas com o fungo e, portanto, apresentam perfis químicos mais semelhantes entre si. Além disso, verifica-se um distanciamento entre os extratos obtidos nos tempos iniciais e intermediários de cultivo (7, 14 e 21 dias) e aqueles provenientes dos tempos mais avançados (42 e 56 dias). Esse padrão sugere que o tempo de incubação está associado a alterações no perfil metabólico relativo de *Fusarium* sp.

Figura 7 - Gráfico PCA do modo positivo.



. **Fonte:** elaborada pelo próprio autor.

Figura 7 - Gráfico PCA do modo negativo.



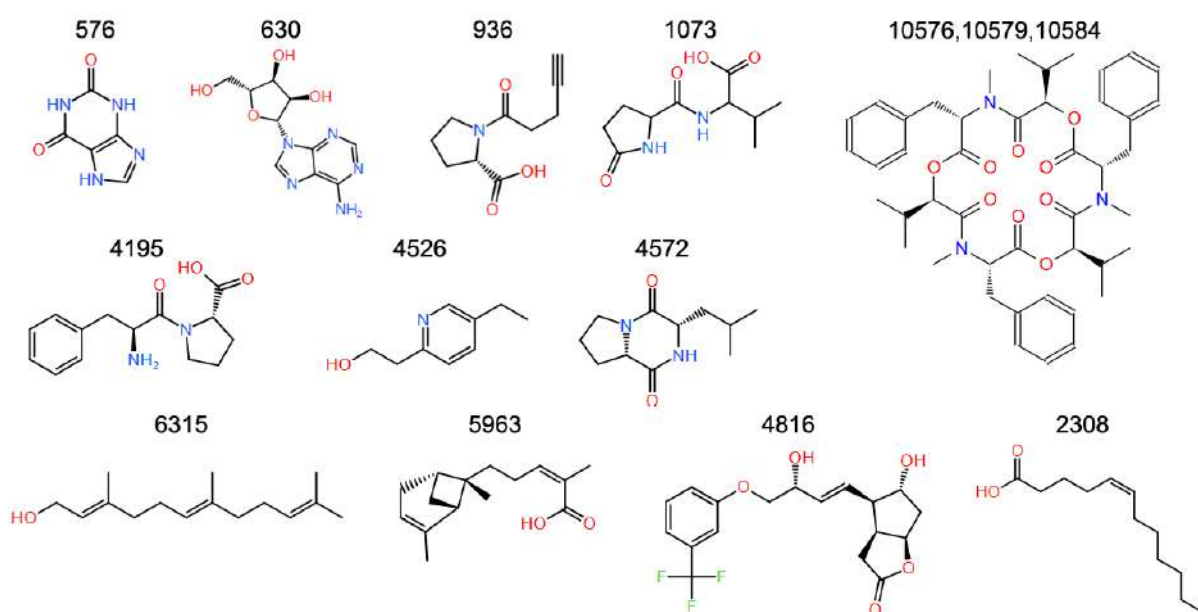
. **Fonte:** elaborada pelo próprio autor.

Nos gráficos de PCA, observa-se a sobreposição dos pontos correspondentes aos brancos e aos controles de qualidade (QC). Os QCs, obtidos pela mistura de alíquotas dos diferentes tempos de cultivo, apresentaram baixa dispersão, indicando estabilidade instrumental ao longo das injeções. Também se observa separação entre os extratos e os brancos, sugerindo diferenças entre o perfil químico do meio de cultivo e o perfil metabólico dos extratos fúngicos. Também é possível observar o distanciamento entre os pontos correspondentes aos extratos e aqueles referentes aos brancos do meio de cultivo, sugerindo diferenças entre o perfil químico das amostras fúngicas e o perfil do meio não inoculado. A separação entre os extratos obtidos em diferentes tempos de cultivo reforça a influência do período de incubação sobre o perfil metabólico relativo de *Fusarium* sp. O extrato de 21 dias apresentou

maior distanciamento em relação aos demais em ambos os modos de ionização, indicando composição química diferenciada nesse tempo de cultivo.

As *features* ou anotações putativas que mais contribuíram para a separação dos grupos na análise exploratória de PLS-DA estão indicadas nos gráficos de VIP scores (Figuras 8 e 9). Esses resultados devem ser interpretados como indicativos de variação relativa entre os tempos de cultivo, e não como confirmação inequívoca da identidade ou da relevância biológica dos compostos.

Figura 8 - Compostos apresentados na tabela VIPScores. Em vermelho: os compostos detectados em maior quantidade no tempo de 56 dias de cultivo. Em Verde: compostos em maior quantidade no tempo de 21 dias de cultivo. Em azul: composto em maior quantidade no tempo de 7 dias de cultivo



5963:*Ácido (2Z)-5-[[[(1S,5S,6S)-2,6-dimetilbíciclo[3.1.1]hept-2-en-6-il]-2-metil-2-pentenoico

4526:5-etil-2-piridinetanol

6315:Farnesol

10576,10579,10584:Beauvericina

936:Ácido 4-pentinoico-L-prolina **4816:*** (+)-Lactona diol de fluprostenol **1073:***PirroGlu-Val

935:NCGC0381402-01

2308:*Ácido cis-5-dodecenoico

4572:*Ciclo(L-Leu-L-Pro)

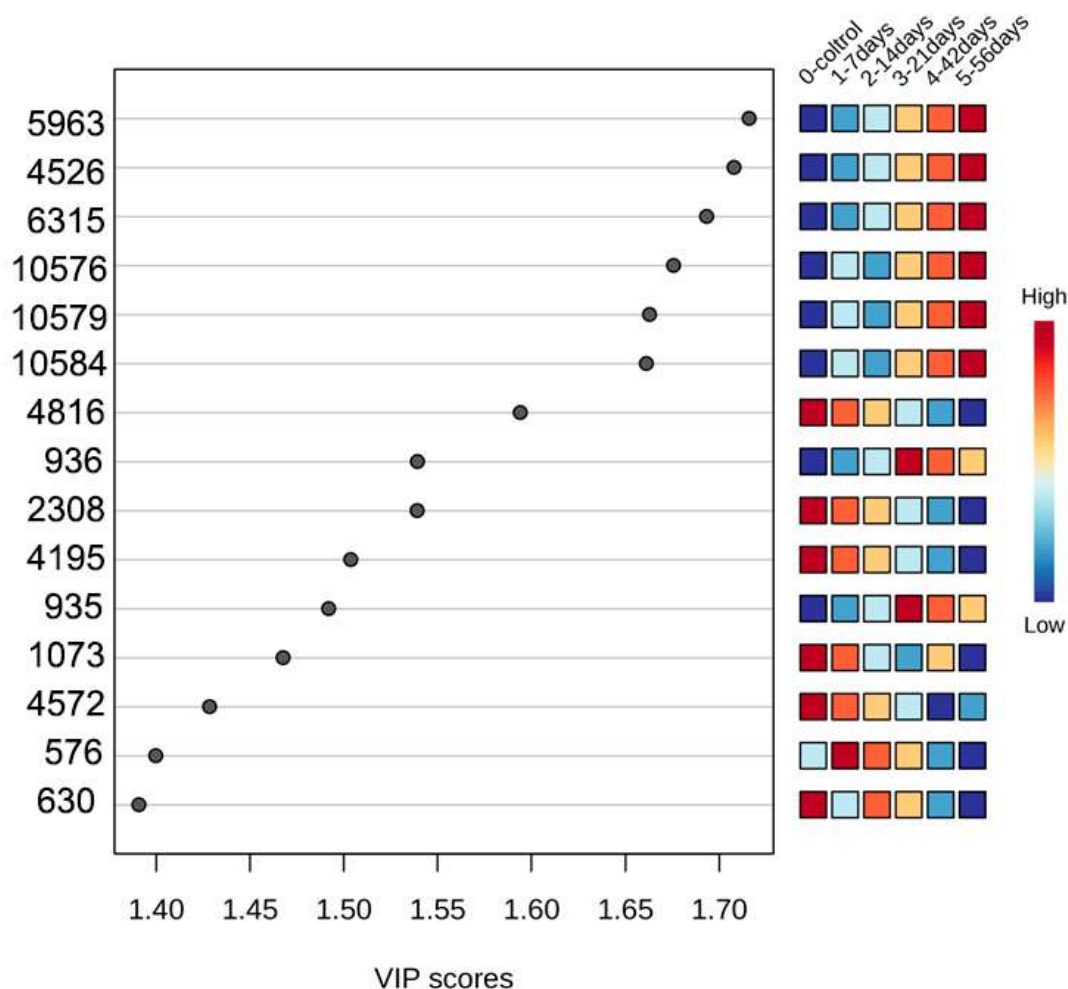
576:Xantina

4195:*Phe-Pro

630:Adenosina

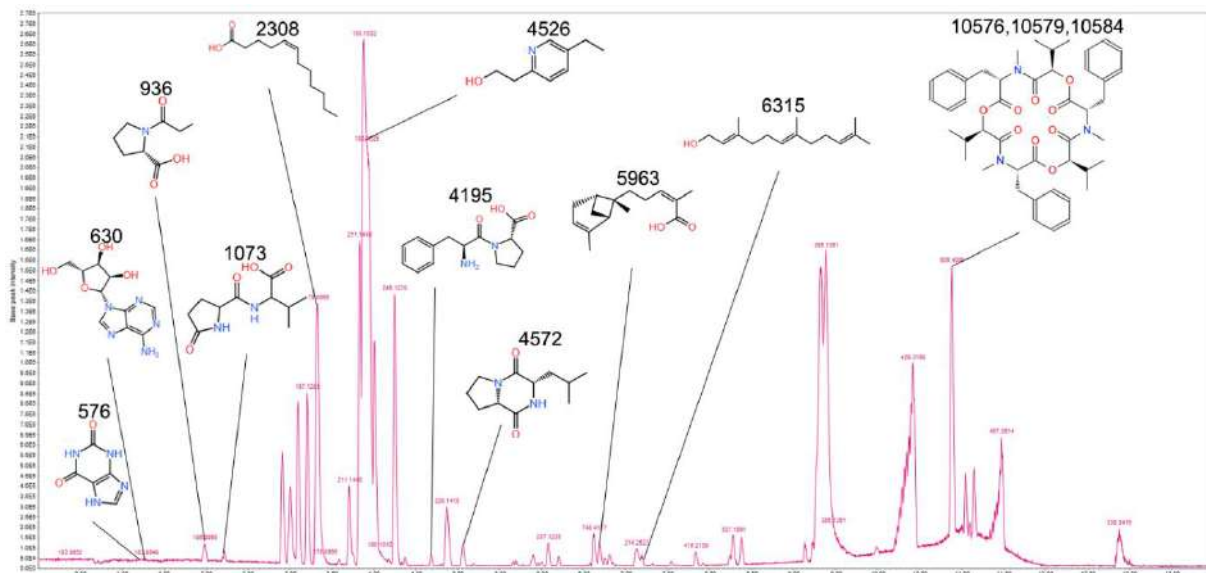
. **Fonte:** elaborada pelo próprio autor.

Figura 9 - Gráfico da pontuação VIP da análise de PLS-DA. Maiores valores representam maior contribuição na separação dos grupos de acordo com o gráfico de escore (Figura 7). Os números correspondem aos compostos ilustrados na figura 8. As cores das caixas se referem à abundância relativa de cada composto de acordo com o tempo de incubação do *Fusarium* (vermelho = mais alta; azul = mais baixa)



. **Fonte:** elaborada pelo próprio autor.

Figura 10 - Cromatograma representativo dos compostos anotados presentes nos extratos com destaque para os compostos ilustrados na figura 8.



. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

A análise dos compostos putativamente anotados também permitiu relacionar alguns sinais aos tempos de cultivo nos quais apresentaram maior abundância relativa. Observou-se que os compostos ácido (2Z)-5-[(1S,5S,6S)-2,6-dimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-en-6-il]-2-metil-2-pentenoico, 5-etil-2-(piridin-2-il)etanol, farnesol e beauvericina foram mais abundantes no extrato obtido após 56 dias de cultivo. Por outro lado, os sinais atribuídos ao ácido 4-pentinoico-L-prolina e ao composto NCGC0381402-01 apresentaram maior contribuição no extrato de 21 dias, enquanto a xantina foi mais representativa no tempo de 7 dias. Essa distribuição sugere que o tempo de incubação influencia de maneira importante o perfil químico relativo do fungo *Fusarium* sp., favorecendo a produção ou o acúmulo de diferentes metabólitos ao longo do cultivo.

É importante destacar que os compostos indicados com asterisco (*) correspondem a anotações putativas baseadas em similaridade espectral ou em busca em banco de dados. Portanto, essas anotações não devem ser interpretadas como identificações inequívocas, mas sim como indicativos da possível presença de compostos análogos ou estruturalmente relacionados aos metabólitos nomeados. A confirmação definitiva dessas substâncias exigiria análises complementares, como

comparação com padrões autênticos, aquisição de espectros MS/MS de maior qualidade, isolamento e elucidação estrutural por técnicas espectroscópicas.

Alguns dos metabólitos putativamente anotados apresentam interesse biotecnológico descrito na literatura, entre eles a beauvericina. Esse composto é associado a diferentes atividades biológicas, incluindo efeitos antibacterianos e antifúngicos (Wu et al., 2018). No entanto, no presente trabalho, sua presença foi indicada apenas de forma putativa, e não houve avaliação de compostos isolados ou de atividade antifúngica. Assim, qualquer possível contribuição da beauvericina para a atividade dos extratos deve ser considerada uma hipótese a ser investigada em estudos futuros.

Assim, considerando a complexidade química dos extratos obtidos, é possível que a atividade observada não esteja associada a um único metabólito majoritário, mas sim ao conjunto de compostos presentes em cada tempo de cultivo. Nesse sentido, a maior abundância relativa de beauvericina, farnesol e outros metabólitos no extrato de 56 dias indica um perfil químico de interesse para estudos futuros. No entanto, como a melhor resposta antibacteriana foi observada no extrato de 21 dias, é provável que compostos minoritários, metabólitos ainda não anotados ou interações sinérgicas entre diferentes constituintes estejam envolvidos na atividade biológica detectada. ([Shekhar-Guturja](#) et al., 2016; Li et al., 2024)

O farnesol, também anotado putativamente nos extratos analisados, constitui um metabólito de reconhecido interesse biológico, especialmente por seu papel descrito na literatura como molécula envolvida em processos de *quorum sensing* (Hornby et al., 2001). Em fungos, esse composto tem sido associado à regulação de eventos celulares importantes, incluindo a modulação da transição morfológica entre formas leveduriformes e filamentosas, bem como à interferência na formação de biofilmes (Hornby et al., 2001). Como os biofilmes estão frequentemente relacionados ao aumento da resistência microbiana e à menor susceptibilidade a agentes antimicrobianos, compostos capazes de interferir nesse processo despertam interesse para estudos de controle microbiano e desenvolvimento de estratégias terapêuticas combinadas (Hornby et al., 2001).

Além de sua ação sobre processos de comunicação celular e formação de biofilmes, o farnesol também tem sido relacionado à indução de estresse oxidativo em células fúngicas. Esse efeito pode envolver o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), alterações na função mitocondrial e ativação de vias associadas à

morte celular programada. Nesse contexto, alguns estudos sugerem que o farnesol pode contribuir para processos apoptóticos em fungos, caracterizados por eventos como dano mitocondrial, desbalanço redox e ativação de mecanismos intracelulares relacionados à perda de viabilidade celular. Essa propriedade amplia o interesse do composto, especialmente em estratégias combinadas com antifúngicos convencionais, nas quais o farnesol poderia atuar como modulador da resposta celular e potencializador da atividade de outros agentes.

Além da relevância em sistemas fúngicos, há relatos de atividade antibacteriana atribuída ao farnesol. Togashi et al. (2008), por exemplo, descreveram efeito desse composto frente a *Staphylococcus aureus*, sugerindo que sua ação pode estar relacionada à alteração da integridade da membrana bacteriana e ao comprometimento de processos essenciais à viabilidade celular. Esses dados indicam que o farnesol pode exercer efeitos biológicos em diferentes tipos de microrganismos, embora sua atividade dependa fortemente da concentração utilizada, do organismo-alvo e das condições experimentais empregadas (Bezerra et al., 2020).

No presente trabalho, a anotação putativa de farnesol em extratos de *Fusarium* sp. sugere a presença de sinais compatíveis com esse metabólito, especialmente em determinados tempos de cultivo. Entretanto, é importante ressaltar que o composto não foi isolado, purificado ou testado individualmente. Além disso, não foram realizados ensaios específicos para investigar mecanismos de ação, interferência em biofilmes, modulação de *quorum sensing*, alterações de membrana, produção de espécies reativas de oxigênio ou indução de apoptose. Dessa forma, embora o farnesol represente um metabólito de interesse biotecnológico e possa contribuir para a atividade global do extrato bruto, sua participação direta nos efeitos antibacterianos observados deve ser interpretada com cautela.

Assim, a possível relação entre a presença de farnesol e a atividade biológica detectada permanece como uma hipótese a ser investigada em estudos futuros. Para confirmar essa associação, seriam necessárias etapas adicionais, como confirmação estrutural da anotação, isolamento ou aquisição de padrão autêntico, avaliação do composto isolado frente às linhagens bacterianas testadas e comparação de sua atividade com aquela observada no extrato bruto. Estudos complementares também poderiam avaliar a capacidade do farnesol de modular biofilmes, alterar a permeabilidade celular, induzir estresse oxidativo ou desencadear processos apoptóticos em modelos microbianos específicos (Bezerra et al., 2020).

As xantinas e seus derivados já foram investigados por sua atividade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante, além de efeitos conhecidos no sistema nervoso central (como a cafeína e a teofilina) (Singh et al., 2018). Derivados de xantina apresentaram ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Além de também apresentarem atividade antifúngica, nematocida, antiinflamatória, antioxidante e antitumoral (Singh et al., 2018), sendo a xantina considerada um promissor precursor para a síntese de outros fármacos como a Aminofilina, Acefilina e Proxifilina que agem como broncodilatadores, a Pentoxifilina utilizada no tratamento de distúrbios circulatórios periféricos e cerebrais ou até a Cafeína que estimula liberação de dopamina e noradrenalina.

O perfil metabólico revela ciclopeptídeos e análogos dicetopiperazínicos que apresentam alta estabilidade química, baixa toxicidade e uma ampla gama de atividades biológicas destacando-se as atividades antifúngica e antibacteriana. Por exemplo a ciclo(Tyr-Pro) que apresenta fraca atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e apresenta aumento significativo na atividade quando encapsulada por lipossoma que auxilia na penetração celular e resistência enzimática (Kilian et al., 2011). Já a ciclo(L-Pro-D-Leu) foi reportada inibindo o crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, fungos importantes por produzirem micotoxinas. Este composto apresentou MIC de 8 µg/mL contra *A. flavus* e bloqueou a produção de aflatoxinas, sugerindo efeito sobre a biossíntese de metabólitos secundários tóxicos (Nishanth Kumar et al., 2013).

Tabela 3 - Resultado da triagem realizada com os extratos na concentração de 512 µg/mL.

Linhagens bacterianas	GTB-04 7 dias	GTB-04 14 dias	GTB-04 21 dias	GTB-04 42 dias	GTB-04 56 dias
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	>512	>512	≤512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	>512	>512	≤512	>512	>512
<i>S. aureus</i> ATCC 8095	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	>512	>512	>512	>512	>512
<i>E. faecium</i> ATCC 700221	>512	>512	>512	>512	>512
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	>512	>512	≤512	>512	>512
<i>E. coli</i> ATCC 25922	>512	>512	≤512	>512	>512
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	>512	>512	>512	>512	>512
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	>512	>512	>512	>512	>512

Fonte: Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo)

Os ensaios de triagem realizados na concentração de 512 µg mL⁻¹ (Tabela 3) permitiram identificar diferenças claras no potencial antibacteriano entre os extratos avaliados. Observou-se que a maioria das amostras não apresentou inibição detectável do crescimento bacteriano nas condições testadas, sendo classificadas como inativas nesta etapa inicial.

Em contraste, o extrato obtido após 21 dias de cultivo demonstrou inibição consistente do crescimento microbiano frente algumas das linhagens testadas, sendo selecionado para as etapas subsequentes de avaliação quantitativa (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultado da CIM e CBM para o extrato referente a 21 dias de cultivo

Linhagens bacterianas	CIM (mg/L)	CBM (mg/L)	CBM/CIM	Atividade*
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	512	>512	N.D	N.D
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	512	>512	N.D	N.D
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	512	>512	N.D	N.D
<i>E. coli</i> ATCC 25922	256	>512	N.D	N.D

Fonte: Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo)

Nota-se a necessidade de concentrações elevadas de extrato para inibir o crescimento microbiano (CIM - Concentração Inibitória Mínima) indicando baixa atividade antibacteriana frente às linhagens testadas. Os valores de CBM superiores a 512 mg/L indicam que o extrato não apresentou efeito bactericida detectável nas concentrações avaliadas. Assim, os resultados sugerem atividade antibacteriana limitada, associada à inibição do crescimento microbiano, mas sem evidência de efeito letal nas condições testadas.

Observa-se inibição maior da *Escherichia coli* ATCC 25922, com CIM de 256 mg/L, enquanto as demais linhagens apresentaram CIM de 512 mg/L. Entretanto, mesmo nesse caso, a ausência de CBM detectável sugere atividade antibacteriana limitada.

5 CONCLUSÃO

O cultivo do fungo endofítico *Fusarium* sp., isolado da planta medicinal do Pantanal *Galianthe thalictroides*, permitiu a obtenção de extratos metabólicos com elevada diversidade química ao longo dos diferentes tempos de incubação avaliados. A análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução evidenciou variações expressivas no perfil metabólico do fungo, indicando que o tempo de cultivo influencia diretamente a produção relativa de metabólitos secundários.

As anotações putativas realizadas indicaram a presença de compostos de interesse biotecnológico, como beauvericina, farnesol, xantinas e ciclopeptídeos, classes ou moléculas já associadas na literatura a diferentes atividades biológicas, incluindo efeitos antibacterianos, antifúngicos e moduladores de processos celulares.

Observou-se que parte desses sinais apresentou maior abundância relativa nos tempos mais longos de cultivo, especialmente em 56 dias, sugerindo que períodos prolongados de incubação podem estar associados a alterações relevantes no perfil químico do extrato.

Entretanto, os ensaios biológicos revelaram que o extrato obtido após 21 dias de cultivo apresentou o melhor desempenho frente às linhagens bacterianas avaliadas, sendo o único a demonstrar inibição consistente do crescimento microbiano na etapa de triagem. Esse resultado indica que a atividade antibacteriana não está necessariamente associada aos metabólitos mais abundantes ou aos compostos anotados com maior evidência nos tempos tardios de cultivo. Pelo contrário, a atividade observada pode estar relacionada à presença de metabólitos minoritários, compostos ainda não anotados ou efeitos sinérgicos entre diferentes constituintes do extrato bruto.

A ausência de efeito bactericida detectável até a maior concentração testada demonstra, contudo, que a atividade antibacteriana observada foi limitada nas condições avaliadas. Assim, os resultados não permitem atribuir alto potencial bioativo ao extrato bruto, mas apontam para uma atividade discreta, predominantemente associada à inibição do crescimento bacteriano. Nesse sentido, a linhagem de *Fusarium* sp. estudada mostra-se relevante como objeto de investigação química e biológica, especialmente pela diversidade metabólica observada e pela possibilidade de produção de compostos bioativos ainda não caracterizados.

Dessa forma, o presente trabalho contribui para o conhecimento do potencial metabólico de fungos endofíticos associados a plantas medicinais do Pantanal e reforça a importância da integração entre metabolômica e bioensaios na bioprospecção de produtos naturais. Estudos futuros envolvendo fracionamento bioguiado, confirmação estrutural dos metabólitos anotados, avaliação de compostos isolados e testes frente a outros modelos biológicos poderão esclarecer quais constituintes estão efetivamente relacionados à atividade observada e ampliar a compreensão do potencial biotecnológico dessa linhagem fúngica.

REFERÊNCIAS

- ALAM, Beena; Lǐ, Jùn wén; Gě, Qún; *et al.* Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa? **Frontiers in Plant Science**, v. 12, art. 791033, 2021.
- ALY, Amal Hassan; DEBBAB, Abdessamad; PROKSCH, Peter. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 6, p. 1829–1845, 2011.
- ANGELOTTI, Francislene; HAMADA, Emília; BETTIOL, Wagner. A Comprehensive Review of Climate Change and Plant Diseases in Brazil. **Plants**, v. 13, n. 17, p. 2447, 2024.
- BEZERRA, Camila Fonseca; DE ALENCAR JÚNIOR, José Geraldo; DE LIMA HONORATO, Rosilaine; *et al.* Antifungal activity of farnesol incorporated in liposomes and associated with fluconazole. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 233, p. 104987, 2020.
- BLAŽENOVIC, Ivana; KIND, Tobias; JI, Jian; *et al.* Software Tools and Approaches for Compound Identification of LC-MS/MS Data in Metabolomics. **Metabolites**, v. 8, n. 2, p. 31, 2018.
- BODE, Helge Björn; BETHE, Barbara; HÖFS, Regina; *et al.* Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. **ChemBioChem**, v. 3, n. 7, p. 619–627, 2002.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement. **CLSI, 2013**. (CLSI document M100-S23).
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 10. ed. Wayne, PA: **CLSI, 2015**. CLSI document M07-A10.
- DEMAIN, Arnold L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 185–201, 2014.
- DESHMUKH, Sunil K.; DUFOSSÉ, Laurent; CHHIPA, Hemraj; *et al.* Fungal Endophytes: A Potential Source of Antibacterial Compounds. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 2, p. 164, 2022.
- FIGUEIREDO, Patricia; GARCEZ, Fernanda; CEPA MATOS, Maria de Fatima; *et al.* A New Cytotoxic β -Carboline Alkaloid from *Galianthe thalictroides*. **Planta medica**, v. 77, p. 1852–4, 2011.
- GASSER, Katharina; SULYOK, Michael; SPANGL, Bernhard; *et al.* *Fusarium proliferatum* secondary metabolite profile *in vitro* depends on the origin of the isolates and is clearly reduced in stored garlic. **Postharvest Biology and Technology**, v. 200, p. 112312, 2023.
- HORNBY, J. M. *et al.* Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2982–2992, 2001.

JIANG, Chun-Xiao; LI, Jie; ZHANG, Jun-Min; *et al.* Isolation, Identification, and Activity Evaluation of Chemical Constituents from Soil Fungus *Fusarium avenaceum* SF-1502 and Endophytic Fungus *Fusarium proliferatum* AF-04. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 7, p. 1839–1846, 2019.

KILIAN, G.; MILNE, P. J.; TSHANGA, S. S.; *et al.* Antimicrobial activity of liposome encapsulated cyclo(L-tyrosyl-L-prolyl). **Pharmazie**, v. 66, n. 6, p. 421–423, 2011.

KIM, Young-Mo; HEYMAN, Heino M. Mass Spectrometry-Based Metabolomics. **Methods in Molecular Biology**, v. 1775, p. 107–118, 2018.

KUSARI, Souvik; HERTWECK, Christian; SPITELLER, Michael. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 7, p. 792–798, 2012.

KUSARI, Souvik; SINGH, Satpal; JAYABASKARAN, Chelliah. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 297–303, 2014.

LI, Hui; CHEN, Haisheng; SHI, Jing; *et al.* Combination of fluconazole with natural compounds: A promising strategy to manage resistant *Candida albicans* infections. **Fungal Biology Reviews**, v. 50, p. 100398, 2024.

LORENZ, Camila; CAVENDISH, Thais Araújo; DE AZEVEDO, Thiago Salomão; *et al.* Brazil is already experiencing the brutal impacts of climate change. **Revista de Saúde Pública**, v. 60, p. e6, 2026.

MARTENS, Lennart; CHAMBERS, Matthew; STURM, Marc; *et al.* mzML—a Community Standard for Mass Spectrometry Data. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 10, n. 1, p. R110.000133, 2011.

NISHANTH KUMAR, S.; MOHANDAS, C.; NAMBISAN, Bala. Purification of an antifungal compound, cyclo(l-Pro-d-Leu) for cereals produced by *Bacillus cereus* subsp. *thuringiensis* associated with entomopathogenic nematode. **Microbiological Research**, v. 168, n. 5, p. 278–288, 2013.

PANG, Zhiqiang; LU, Yao; ZHOU, Guangyan; *et al.* MetaboAnalyst 6.0: towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W398–W406, 2024.

PANKEY, G. A.; SABATH, L. D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 38, n. 6, p. 864–870, 2004.

PATTI, Gary J.; YANES, Oscar; SIUZDAK, Gary. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 263–269, 2012.

PIOMBO, Edoardo; ROSATI, Marco; SANNA, Martina; *et al.* Sequencing of non-virulent strains of *Fusarium fujikuroi* reveals genes putatively involved in bakanae disease of rice. **Fungal Genetics and Biology**, v. 156, p. 103622, 2021.

SALAM, Md Abdus; AL-AMIN, Md Yusuf; SALAM, Moushumi Tabassoom; *et al.* Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. **Healthcare**, v. 11, n. 13, p. 1946, 2023.

SANTOS, Ana Carla da Silva; DINIZ, Athaline Gonçalves; TIAGO, Patricia Vieira; *et al.* Entomopathogenic *Fusarium* species: a review of their potential for the biological control of insects, implications and prospects. **Fungal Biology Reviews**, v. 34, n. 1, p. 41–57, 2020.

SAVARY, Serge; WILLOCQUET, Laetitia; PETHYBRIDGE, Sarah Jane; *et al.* The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019.

SCHMID, Robin; HEUCKEROTH, Steffen; KORF, Ansgar; *et al.* Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. **Nature Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 447–449, 2023.

SHEKHAR-GUTURJA, Tanvi; GUNAHERATH, G M Kamal B; WIJERATNE, E M Kithsiri; *et al.* Dual action antifungal small molecule modulates multidrug efflux and TOR signaling. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 10, p. 867–875, 2016.

SINGH, Nivedita; SHRESHTHA, Ashwinee Kumar; THAKUR, M. S.; *et al.* Xanthine scaffold: scope and potential in drug development. **Heliyon**, v. 4, n. 10, p. e00829, 2018.

STROBEL, Gary; DAISY, Bryn. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

TOGASHI, Naoko; INOUE, Yoshihiro; HAMASHIMA, Hajime; *et al.* Effects of Two Terpene Alcohols on the Antibacterial Activity and the Mode of Action of Farnesol against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 13, n. 12, p. 3069–3076, 2008.

WANG, Mingxun; CARVER, Jeremy J.; PHELAN, Vanessa V.; *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 2016.

WEI, Jihua; WU, Bin. Chemistry and bioactivities of secondary metabolites from the genus *Fusarium*. **Fitoterapia**, v. 146, p. 104638, 2020.

WOLFENDER, Jean-Luc; NUZILLARD, Jean-Marc; VAN DER HOOFT, Justin J. J.; *et al.* Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 704–742, 2019.

WU, Q.; PATOCKA, J.; NEPOVIMOVA, E.; KUCA, K. A review on the synthesis and bioactivity aspects of beauvericin, a *Fusarium* mycotoxin. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 9, p. 1338, 2018.