



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Vannêssa Rodrigues Teles Maia

**Perfil antimicrobiano e antioxidante de extratos de fungos filamentosos do bioma
Caatinga.**

Maceió
2023

VANNÊSSA RODRIGUES TELES MAIA

Perfil antimicrobiano e antioxidante de metabólitos produzidos por fungos filamentosos do bioma Caatinga.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas-UFAL, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Estudos Clínicos e Laboratoriais

Orientador: Prof. Dr. Alysson Wagner F. Duarte

Coorientador: Profa. Dra. Aline C. de Queiroz

Maceió
2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

M217p Maia, Vannêssa Rodrigues Teles.
Perfil antimicrobiano e antioxidante de metabólitos produzidos por fungos filamentosos do bioma Caatinga / Vannêssa Rodrigues Teles Maia. – 2023.
111 f. : il.

Orientador: Alysson Wagner F. Duarte.

Co-orientadora: Aline C. de Queiroz.

Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal de Alagoas. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. Maceió, 2023.

Inclui produto educacional.

Bibliografia: f. 96-111.

1. Anti-infecciosos. 2. Antioxidantes. 3. Extratos fúngicos. 4. Semiárido. 5. Prospecção microbiana. 6. Concentração Inibitória Mínima. I. Título.

CDU: 616.282

Folha de Aprovação

Vannêssa Rodrigues Teles Maia

Perfil antimicrobiano e antioxidante de metabólitos produzidos por fungos filamentosos do bioma Caatinga

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal de Alagoas.



Documento assinado digitalmente

ALYSSON WAGNER FERNANDES DUARTE

Data: 08/11/2023 09:27:10-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte
UFAL/ *campus* Arapiraca
Orientador



Documento assinado digitalmente

ALINE CAVALCANTI DE QUEIROZ

Data: 08/11/2023 12:35:23-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Aline Cavalcanti de Queiroz
UFAL/ *Campus* Arapiraca
Coorientadora

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente

ANA PAULA DE ALMEIDA PORTELA DA SILVA

Data: 08/11/2023 11:22:49-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Ana Paula de Almeida Portela da Silva
UFAL/ *campus* Penedo
Examinadora externa



Documento assinado digitalmente

CAROLINNE DE SALES MARQUES

Data: 08/11/2023 14:02:00-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Carolinne de Sales Marques
UFAL/ *campus* Maceió
Examinadora interna



Documento assinado digitalmente

ELOIZA LOPES DE LIRA TANABE

Data: 08/11/2023 13:00:13-0300

Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dra. Eloiza Lopes de Lira Tanabe
UFAL/ Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - LABMIP
Examinadora interna

AGRADECIMENTOS

A Deus, por Sua imensa graça e infinita misericórdia.

A minha família, por todo apoio, força, compreensão, auxílio emocional e financeiro, e por acreditarem mais em mim do que eu mesma! Destaco o apoio do Artur, meu esposo, pela paciência e dedicação.

Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Alysson Wagner F. Duarte, por tamanha paciência, dedicação constante e todo conhecimento transmitido, pelas palavras de apoio, acolhimento e incentivo, além de ser uma grandiosa fonte de inspiração.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Aline C. de Queiroz, por seus ensinamentos, correções, sua doçura e ser fonte inspiradora. É um imensurável privilégio poder contar com ambos para desenvolver pesquisa!

Aos meus companheiros de laboratório, Nicolle, Kaline, Averlane, Jessia, Mariana, Kelly, Gilberto, Vanessa, Mayanne, agradeço pela amizade, companheirismo, pelos momentos divertidos e pela imensa ajuda de todos vocês nas práticas laboratoriais. Vocês certamente tornaram o percurso mais leve. Admiro cada um por tanta dedicação ao que fazem, vocês são raros! Em especial à Emanuely Sampaio, que foi a responsável por me acolher, guiar e ensinar uma infinidade de práticas laboratoriais, você é dona de um coração lindo, sem falar na sua inteligência e capacidade enormes. Obrigada pela amizade que construímos!

Ao prof. Dr. Adeildo por disponibilizar o Laboratório de Química e prestar imenso auxílio nos procedimentos e análises que enriqueceram esse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia e Imunidade – LAFI pelo acolhimento, apoio nas práticas desenvolvidas e momentos de descontração, Eder, Márcio, Kaycke, Cibele, Lillyana, Shakira, Camila, Anderson, vocês foram fantásticos!

Ao meu amigo querido, Magliones que tanto me incentivou e apoiou para que pudesse ingressar nessa etapa, você é muito especial!

À Universidade Federal de Alagoas - UFAL, ao Programa de Pós-graduação de Ciências Médicas – PPGCM, ao Laboratório de Microbiologia e Parasitologia – LABMIP, à Central Analítica do Núcleo de Ciências Exatas – CA-NCEX e ao Laboratório de Farmacologia e Imunidade – LAFI, pela estrutura de pesquisa para a condução deste estudo.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, no desenvolvimento desta pesquisa.

“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil - e, no entanto, é a coisa
mais preciosa que temos.”
Albert Einstein

RESUMO

O advento dos antibióticos revolucionou os tratamentos médicos, possibilitando o desenvolvimento de técnicas invasivas e cirúrgicas com viabilidade de recuperação e manutenção da vida dos indivíduos após os procedimentos cirúrgicos, como também a cura de doenças infecciosas antes fatais. Não obstante, o uso excessivo e irregular, além dos mecanismos genéticos desenvolvidos pelos próprios micro-organismos, fez emergir a resistência microbiana, problema crescente que se tornou uma preocupação mundial no século XXI, trazendo à tona a necessidade da pesquisa por novos antimicrobianos. A busca por novos compostos bioativos advindos de substâncias naturais tem grande potencial de aplicação e uso, além da atividade antimicrobiana, na busca por compostos com atividade antioxidante, essencial no combate ao processo de envelhecimento do organismo humano e às doenças degenerativas. Nessa perspectiva, a busca por fungos filamentosos produtores de bioativos do bioma Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, pode ser estratégico, uma vez que este ambiente se caracteriza por condições climáticas e ambientais únicas e os organismos endêmicos possivelmente produzem metabólitos secundários diferenciados. Assim, objetivou-se avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante de metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos de líquens da Caatinga de Alagoas. Para tanto foram selecionados 35 fungos, realizada a produção de metabólitos secundários por cultivo em meio sólido Ágar Czapek durante 15 dias à 30.0 °C, seguido da extração em acetato de etila (C₄H₈O₂) e avaliação de rendimento. A determinação da atividade antimicrobiana foi pelo método de difusão em disco e microdiluição de em caldo Sabouraud e o potencial de inibição antioxidante foi avaliado utilizando os métodos do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e do poder de redução do ferro (FRAP). Dos 35 fungos avaliados, quatro (11%) apresentaram atividade antimicrobiana e seis (17%) com perfil antioxidante. O extrato de *Penicillium* sp. 2UVC8, seguido do *Fusarium* sp. 3UVLFC1, demonstraram as melhores atividades contra *Staphylococcus aureus*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 125 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. As frações do extrato de *Fusarium* sp. 3UVLFC1 de acetato de etila, clorofórmica e hexânica, exibiram potencial promissor contra *S. aureus*. Na avaliação da atividade antifúngica, o extrato de *Fusarium* sp. 4UVLFC2 exibiu CIM = 31,2 µg/mL, frente à *C. albicans*. Contudo, para as cepas de bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* nenhum extrato exibiu efeito inibitório. Na determinação antioxidante, o extrato de *Fusarium* sp. 4LCEM2 obteve resultado promissor, com CE₅₀ = 180 µg/mL. No tocante à ação citotóxica frente aos linfócitos sanguíneos humano, os extratos de *Fusarium* sp. 3UVLFC1, *Penicillium* sp. 2UVC8 e *Penicillium* sp. 11LCL5 não apresentaram citotoxicidade mesmo em concentrações altas como 2000 e 1000 µg/mL. Já na análise dos extratos fúngicos realizadas em Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), foram encontrados sinais bastante complexos e outros bem semelhantes mesmo entre gêneros diferentes. Destarte, os resultados evidenciaram atividade antimicrobiana promissora para *S. aureus*, como também potencial antioxidante, sendo não citotóxicos aos linfócitos humanos. Tais resultados exaltam a riqueza da biodiversidade da Caatinga e a prospecção de seus micro-organismos, que são fontes de metabólitos com alto potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Atividade antioxidante. Extratos fúngicos. Semiárido. Prospecção microbiana. Concentração inibitória mínima.

ABSTRACT

The advent of antibiotics has been revolutionary in medical treatment, allowing the development of invasive and surgical techniques that have made it possible to recover and sustain human life after surgery, as well as to cure previously fatal infectious diseases. However, their excessive and irregular use, together with the genetic mechanisms developed by the microorganisms themselves, have led to the emergence of microbial resistance, a growing problem that has become a global concern in the 21st century, highlighting the need for research into new antimicrobial agents. In addition to antimicrobial activity, the search for new bioactive compounds derived from natural substances has great potential for application and use in the search for compounds with antioxidant activity, which is essential in combating the ageing of the human body and degenerative diseases. In this perspective, the search for filamentous fungi producers of bioactives from the Caatinga biome, an exclusively Brazilian biome, may be strategic, since this environment is characterised by unique climatic and environmental conditions and the endemic organisms may produce differentiated secondary metabolites. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial and antioxidant potential of secondary metabolites produced by filamentous fungi from lichens of the Caatinga of Alagoas. For this objective, 35 fungi were selected and the production of secondary metabolites was performed by cultivation in Czapek solid agar medium for 15 days at 30.0 °C, followed by extraction in ethyl acetate (C₄H₈O₂) and evaluation of the yield. Antimicrobial activity was determined by disc diffusion method and microdilution in Sabouraud broth, and antioxidant inhibition potential was evaluated by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical and iron reducing power (FRAP) methods. Of the 35 fungi evaluated, four (11%) showed antimicrobial activity and six (17%) exhibited an antioxidant activity. The extract of *Penicillium* sp. 2UVC8, followed by *Fusarium* sp. 3UVLFC1, demonstrated the best activities against *Staphylococcus aureus* with minimum inhibitory concentrations (MIC) of 125 µg/mL and 250 µg/mL, respectively. The ethyl acetate, chloroform and hexane fractions of *Fusarium* sp. 3UVLFC1 extract revealed promising potential against *S. aureus*. In the evaluation of antifungal activity, the extract of *Fusarium* sp. 4UVLFC2 demonstrated MIC = 31.2 µg/mL, against *C. albicans*. However, neither extract showed any inhibitory effect on the gram-negative bacteria strains *E. coli* and *P. aeruginosa*. In the antioxidant determination, the extract of *Fusarium* sp. 4LCEM2 obtained promising results with CE₅₀ = 180 µg/mL. As far as the cytotoxic effect against human blood lymphocytes is concerned, the extracts of *Fusarium* sp. 3UVLFC1, *Penicillium* sp. 2UVC8 and *Penicillium* sp. 11LCL5 did not show any cytotoxicity even at high concentrations such as 2000 and 1000 µg/mL. Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) analysis of the fungal extracts revealed quite complex signals. Others were very similar even among different genera. The results showed promising antibacterial activity against *S. aureus* and antioxidant potential without human lymphocyte cytotoxicity. These results emphasize the richness of the biodiversity of the Caatinga and the prospection of its microorganisms, which are sources of metabolites with a high biotechnological potential.

Keywords: Antimicrobials. Antioxidant activity. Fungal extracts. Semiarid. Microbial prospection. Minimum inhibitory concentration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Demonstração de mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. ..	18
Quadro 1 - Aspectos gerais da produção de antimicrobianos por fungos filamentosos de origem ambiental: espécie fúngica, meio de incubação, forma de extração dos metabólitos, composto antimicrobiano, micro-organismos sensíveis e referências.	29
Figura 2 - Demonstração geral do mecanismo de oxidação lipídica, onde RH- ácido graxo insaturado, R°- radical livre, ROO° - Radical peróxido e ROOH – hidroperóxido.	34
Figura 3 - Mapa do Brasil destacando o bioma Caatinga.	38
Figura 4 - Ensaio de produção de biomassa fúngica de isolados da Caatinga. (A) Pesquisadora vertendo, com auxílio de pipeta de 20 mL, o meio de cultura nas placas de Petri. (B) Repique do fungo com o uso de perfurador. (C) Distribuição dos discos de fungo desenhando um triângulo.	43
Figura 5 - Visualização do processo de extração de metabólitos secundários produzidos por fungos da Caatinga. (A) Fungo crescido após 14 dias em meio de cultura Ágar Czapek, 2% de glicose; (B) Repartição e transferência dos micélios fúngicos para Erlenmeyer. (C) Acetato de etila (100 mL) sendo adicionado aos fungos. (D) Fungos repartidos, embebidos em acetato de etila e vedados com parafilme.	44
Figura 6 - Visualização do esquema de filtração e concentração dos extratos fúngicos. (A) Passagem dos extratos juntamente com o acetato de etila, por filtração, para outro Erlenmeyer. (B) Extratos pigmentados após filtração.	44
Figura 7 - Esquema de ensaio de triagem em meio líquido, utilizando microplaca de 96 poços em concentrações de 1000 µg/mL (cor púrpura) e 500 µg/mL (cor lilás). Enquanto a cor cinza escura representa o DMSO 2%, a cor cinza representa o DMSO 1%, a cor branca representa o branco e a cor azul clara representa o controle positivo. Os poços em amarelo, da linha H, representam poços vazios.	47
Figura 8 - Esquema do ensaio de avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos fúngicos em microplaca de 96 poços, nas concentrações de 2000 µg/mL a 15,62 µg/mL.	48
Figura 9 - Esquema de ensaio de microdiluição em microplaca de 96 poços, do extrato 3UVLFC1 em frações de acetato de etila, clorofórmica e hexânica, em concentrações de 2000 µg/mL a 15,62 µg/mL.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	Água Destilada Esterilizada
ADPRT	Adenosina Difosfato Ribosil Transferase
AHL	Acil homoserina lactona
AIEC	<i>Escherichia coli</i> Aderentes-invasoras
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica aviária
A-YEPD	Ágar <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
Bap	Proteína associada a biofilme
BHT	Hidroxitolueno Butilado
BPS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CIM	Concentração Inibitória Mínima
C1fB	Fator de agregação B
C-YPD	Caldo <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
DD	Disco difusão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
Eap	Proteína de aderência extracelular
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
eDNA	DNA extracelular
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasora
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
EPS	Exopolissacarídeos
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Extraintestinal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FnBPA	Proteína de ligação a fibrinogênio A
FnBPB	Proteína de ligação a fibrinogênio B

FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
Hlb	Toxina beta
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU	Infecções do trato urinário
LABMIP	Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	<i>Multidrug-resistant</i>
MH	Mueller-Hinton
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MSSA	<i>Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus</i>
NMEC	<i>Escherichia coli</i> meningite neonatal
NTEC	<i>Escherichia coli</i> Necrotoxigênica
ONU	Organização das Nações Unidas
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAI	<i>Pathogenicity islands</i>
PNAG	N-acetil-glucosamina polimérica
PQS	Pseudomonas quinolona sinal
RAM	Resistência antimicrobiana
SasG	Proteína de superfície de <i>Staphylococcus aureus</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> Produtora de Toxina Shiga
TGI	Trato gastrointestinal
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TSA	Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
VISA	<i>Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus</i>
VRSA	<i>Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
4 METODOLOGIA	41
5 PRODUTO	65
5.1 Artigo 1: Perfil antimicrobiano e antioxidante de metabólitos de fungos filamentosos isolados de líquens da Caatinga	66
6 CONCLUSÕES	103
7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	104
REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

A busca e o desenvolvimento de novas fontes de compostos com atividade antimicrobiana são urgentes conforme alerta da Organização das Nações Unidas (ONU), uma vez que a escassez de novos antimicrobianos está aumentando a mortalidade e morbidade devido à permanência das infecções que estão mais difíceis de tratar. Em 2017 a Organização Mundial de Saúde (OMS) listou as bactérias mais ameaçadoras e, dentre elas, estão *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são responsáveis por causar um crescente número de infecções com desfecho fatal, uma vez que estão envolvidas principalmente em casos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (WHO, 2017).

Poucos micro-organismos são tão adaptáveis quanto às bactérias *Escherichia coli* e a levedura *Candida albicans*, as primeiras possuem grande versatilidade por serem micro-organismos encontrados comumente na microbiota intestinal dos seres humanos e outros mamíferos, mas podem ser potentes agentes patogênicos para o homem e para os animais (Kaper, 2004). A incidência de infecções fúngicas vem aumentando juntamente com a resistência medicamentosa e a *C. albicans*, bem como as últimas bactérias mencionadas, são micro-organismos comensais, habitam a microbiota humana, mas quando há desequilíbrio da imunidade podem se tornar patógenos ameaçadores e por em risco a vida de muitos indivíduos (Vila et al., 2020).

Um aspecto comum desses micro-organismos mencionados e que atua como fator de virulência é a capacidade de formação de biofilmes, os quais viabilizam o fortalecimento desses micro-organismos, aumentando a sua resistência aos agentes terapêuticos, seja pela dificuldade de acesso desses, seja pela produção de toxinas pelos micro-organismos. A formação de biofilme por bactérias e leveduras constitui um dos principais mecanismos associados à instalação e evolução de doenças no organismo humano. Os biofilmes são estruturas complexas, constituídas por diferentes espécies microbianas, podendo ser monoespécies ou multiespécies, envoltos em uma matriz orgânica, formada principalmente de exopolissacarídeos (EPS), além de enzimas, proteínas e outras moléculas (Santos et al., 2020b).

Por outro lado, a demanda por compostos com atividade antioxidante tem sido crescente, uma vez que substâncias com essa atividade inviabiliza a ação de radicais livres, substâncias resultantes das atividades orgânicas inerentes ao corpo humano e que causam danos ao mesmo, como o processo de envelhecimento, doenças degenerativas, câncer entre outras patologias (Tavares et al., 2018).

O uso de substâncias de fonte natural no combate a doenças tem origem antiga, todavia ainda possui um grande potencial exploratório, posto que viabiliza a descoberta de novos princípios ativos no intuito de impedir sua resistência ao uso repetitivo de substâncias já conhecidas, amenizar ou inviabilizar efeitos adversos, além de propiciar a descoberta de potencializadores dos efeitos de substâncias já utilizadas e isso incrementa seu potencial de ação. E, nessa perspectiva, compostos naturais com atividade antimicrobiana oriundos de organismos da região da Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, têm sido reportados, como extratos de plantas (Dantas-Medeiros, 2020), óleos essenciais vegetais (Pereira; Teixeira; Medeiros, 2021), e metabólitos microbianos, principalmente por actinobactérias (Moura et al., 2021).

No entanto, são limitados os estudos com a avaliação de metabólitos produzidos por fungos filamentosos da Caatinga, podendo esse ambiente ser um reservatório natural de organismos promissores na descoberta de novos protótipos de fármacos antimicrobianos e antioxidantes. Em vista disso, faz-se o questionamento: produtos naturais como metabólitos fúngicos produzidos por isolados da Caatinga apresentam atividade antimicrobiana e/ou antioxidante? A hipótese desse estudo é que fungos filamentosos desse ambiente pouco conhecido podem produzir compostos com potencial antimicrobiano e antioxidante diferenciado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil antimicrobiano e antioxidante de metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos isolados de líquens da Caatinga de Alagoas.

2.2 Objetivos específicos

Cultivar fungos isolados de líquens da Caatinga para produção de metabólitos secundários;

Realizar a extração de metabólitos secundários e avaliação de rendimento de produção;

Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos fúngicos contra cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* e atividade antifúngica contra *C. albicans*;

Avaliar o perfil antioxidante dos extratos fúngicos;

Realizar o fracionamento de extratos fúngicos com atividade antimicrobiana e analisar a respectiva atividade a partir das frações;

Analisar a citotoxicidade dos extratos fúngicos em linhagens de linfócitos;

Caracterizar os extratos quanto a sua composição química.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Problemática das infecções microbianas

3.1.1 Resistência Antimicrobiana

Nos últimos anos tem sido crescente o relato da resistência antimicrobiana nos diferentes ambientes de saúde, sendo as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), uma problemática urgente de saúde pública (Denissen et al., 2022). A resistência antimicrobiana (RAM) adquirida acontece quando micro-organismos como bactérias e fungos se modificam com o passar do tempo e, com isso, não respondem mais a antimicrobianos aos quais anteriormente eram susceptíveis (WHO, 2021). Desse modo, as infecções ficam mais complicadas de serem tratadas e o risco de disseminação de patógenos se eleva consideravelmente, causando maior morbidade e mortalidade. Ressalta-se que o termo antimicrobiano trata de antivirais, antifúngicos e antibacterianos (Boparai; Sharma, 2019).

A RAM configura-se como uma ameaça global à saúde pública, uma vez que a OMS considera como uma das dez ameaças predominantes à saúde (ANVISA, 2021). Em 27 de fevereiro de 2017 a OMS publicou o primeiro documento listando os agentes patogênicos com maior resistência aos antibióticos e os classificou em três grupos de prioridades: crítica, alta e média, conforme a demanda de desenvolvimento de novos antimicrobianos (WHO, 2017). Tal prioridade foi descrita de acordo com a demanda de desenvolvimento de novos antimicrobianos que façam frente às bactérias multirresistentes.

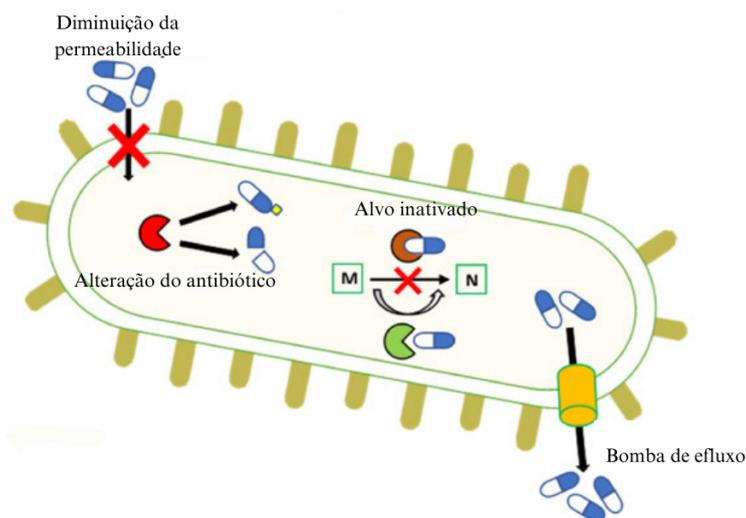
Um êxito histórico foi a descoberta dos antibióticos, permitindo a cura de doenças e infecções, fossem elas simples, complexas ou iminentemente fatais, como também viabilizando a realização de transplantes de órgãos e demais procedimentos desafiadores da medicina (Hutchings et al., 2019). No entanto, a dispersão das bactérias que possuem resistência aos antimicrobianos está sendo um prenúncio do retorno aos tempos remotos, antes das conquistas de tratamentos tão imprescindíveis à humanidade (Watkins, 2016).

Ao analisar, brevemente, o histórico dos antibióticos é possível observar que a resistência também o acompanhou. Fato interessante aconteceu com a penicilina, pois sua descoberta aconteceu em 1928 e o reconhecimento da ação de uma penicilinase bacteriana aconteceu antes mesmo da utilização dessa substância como medicação (Lewis, 2020). Em 1937 as sulfonamidas foram difundidas, porém logo em seguida, aproximadamente após dois anos, sua resistência foi relatada. Por outro lado, em 1944 foi inserida a estreptomicina e os

mecanismos de resistência contra ela surgiram durante o curso de sua utilização, fato semelhante foi acontecendo com os demais medicamentos (Davies, 1996).

As bactérias podem manifestar determinados genes de resistência que provocam falha no mecanismo de ação de fármacos, esses genes podem ser próprios do seu gênero ou ela pode adquirir de outras bactérias, de vírus ou mesmo do ambiente, quando incorporam material liberado de bactérias lisadas, assim como podem sofrer mutações nos seus genes (Wang et al, 2022). Ademais, há diferentes estratégias que esses micro-organismos utilizam para inativar os antimicrobianos: redução da permeabilidade da membrana plasmática, aumento do sistema de efluxo, produção de enzimas capazes de modificar ou degradar o antimicrobiano, alteração do local de ligação ou o bloqueio do alvo (Barbosa et al., 2020; Pulingam et al., 2022) (figura 1).

Figura 1: Demonstração de mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos.



Fonte: Imagem adaptada de Pulingam et al., 2022.

As infecções acarretadas por bactérias multirresistentes a antimicrobianos têm crescido assustadoramente ao tempo em que vêm ocasionando um número também crescente de mortes, em 2020 estimava-se 700.000 mortes/ano em todo o mundo, supondo-se um aumento para dez milhões de mortes no ano de 2050, equivalente a 1.200 mortes a cada hora. Isto porque, há um crescente número de micro-organismos vem desenvolvendo estratégias

adaptativas, como mutações genéticas, com o intuito de esquivarem-se da ação dos antibióticos, culminando com os diversos mecanismos de resistência e colocando em risco o tratamento de infecções (Watkins, 2016). Assim, torna-se evidente o quanto a resistência antibiótica é um problema crítico para a saúde mundial (Hampton, 2013; Paterson, 2020).

Outros fatores que contribuem consideravelmente para o aumento da resistência aos medicamentos são as prescrições sem necessidade ou inadequadas, os pacientes que não cumprem o regime adequado da prescrição medicamentosa ou que não seguem os horários adequados e as recomendações médicas (Bologa et al., 2013).

3.2 Aspectos gerais de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*

De maneira geral, cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* possuem características comuns como a ocorrência na microbiota normal humana, entretanto, podem causar graves infecções por serem organismos oportunistas (Gómez et al., 2022). Especialmente quando ocorrem em sítios anatômicos diferentes daqueles que são reportados como integrantes da microbiota própria, além da preocupação crescente dessas cepas com a resistência antimicrobiana adquirida (Samreen et al., 2021).

Staphylococcus aureus são bactérias em forma de cocos, Gram-positivas, aeróbias, catalase positivas, o que significa que são capazes de hidrolisar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Enquanto crescem, essas bactérias podem produzir pigmentos carotenoides de coloração amarelada ou dourada, daí a origem de seu nome (Kong, 2016). Nos seres humanos, elas podem ser encontradas como integrantes da microbiota normal em pele e mucosas, tendo preferência pela mucosa nasal. São responsáveis por causar desde simples infecções de pele até toxemias graves, como pneumonia, infecções cardiovasculares, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico, dentre outras bacteremias nosocomiais, além de relacionar-se à produção de enterotoxinas (Cheung, 2021).

A *S. aureus* tem imensa pluralidade de fatores de virulência, o que facilita sua disseminação, tornando um micro-organismo com elevada resistência e endêmico em hospitais, causando uma preocupante morbimortalidade. Dentre esses fatores de virulência destacam-se: mecanismos de evasão do sistema imunológico do hospedeiro, produção de grande variedade de toxinas, bem como de fatores proteicos e não proteicos que viabilizam a colonização do hospedeiro (De Leo et al., 2010). Outro elemento que se destaca em sua

virulência é o fato de ser capaz de produzir coagulase, enzima que viabiliza a formação de coágulo, impedindo o acesso do sistema imunológico ao foco de infecção (Kong, 2016).

Em 1961, dois anos após o início do uso de antibiótico no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, foi registrada pela primeira vez a bactéria *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA do inglês *Methicillin-Resistant S. aureus*), a qual se espalhou facilmente ao redor do mundo (Klebens et al., 2007), quando comparada com *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA do inglês *Methicillin-Susceptible S. aureus*). Diante dos seus fatores de virulência, essa bactéria tem facilidade de adquirir resistência aos antibióticos mais utilizados, como exemplo as cepas *S. aureus* intermediário à vancomicina (VISA do inglês *Vancomycin-Intermediate S. aureus*) e *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA do inglês *Vancomycin-Resistant S. aureus*) (Kong, 2016).

Conforme mencionado, *S. aureus* é uma espécie bacteriana que se destaca por causar infecções comunitárias e nosocomiais, pois possui características bem versáteis e riqueza de fatores de virulência. Antes do surgimento dos antibióticos a mortalidade causada por infecções decorrentes desse patógeno era superior a 80%. Na década de 1940, com o advento comercial da penicilina, houve uma melhoria radical no prognóstico dos pacientes infectados (Santos et al., 2021). Apesar disso, logo em seguida, a resistência antibiótica começou a ser registrada (Prescott, 2014), sendo um dos micro-organismos que mais se apresenta na progressão das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), sobretudo quando se refere a pneumonias, bacteremias, endocardite e infecções de sítios cirúrgicos (Grudmann et al., 2014). Em 2019 na China, essa espécie alcançou o primeiro lugar entre as bactérias Gram-positivas segundo o resultado do Sistema de Vigilância de Resistência Antimicrobiana desse país (Wang et al., 2022). Ainda, taxas de letalidade em torno de 15 a 25% foram apresentadas em estudos populacionais em diferentes regiões no mundo, assim como taxas de incidência de 15 a 40 por 100.000 habitantes por ano (Laupland et al., 2013).

Já a *E. coli* é uma espécie de bactéria que faz parte da família *Enterobacteriaceae*, sendo bacilos Gram-negativos, habitantes preponderantes do trato gastrointestinal (TGI) dos humanos, mais especificamente no intestino grosso em sua camada mucosa, mas também são encontrados no intestino de outros mamíferos. Durante a infância, são as primeiras espécies bacterianas que colonizam os humanos e são empregadas como indicadores de qualidade da água e de alimentos, na verificação de contaminação de origem fecal (Tenailon et al., 2010). Ainda se caracterizam por seu metabolismo anaeróbio facultativo, sendo fermentativo e respiratório, pois produzem ácido e gás, permitindo a fermentação de vários açúcares como a lactose, maltose, glicose, entre outros (Andreatti Filho, 2007).

Durante seu processo evolutivo, cepas dessa bactéria alcançaram potencial patogênico, através da obtenção de genes de virulência, viabilizado por mutações ou por meio de transferência horizontal de material genético (Saviolli, 2010), conferindo-lhes maior capacidade de adaptação (Kaper, 2004). Esses genes de virulência têm a capacidade de codificar proteínas que propiciam a penetração, invasão e colonização dos seus hospedeiros, ademais localizam-se em ilhas de patogenicidade no cromossomo bacteriano (PAIs do inglês *pathogenicity islands*) ou em material genético extra-cromossômico, que são os plasmídeos (Zhao et al., 2021).

A patogenicidade da *E. coli* ocorre pela junção de diferentes fatores de virulência, os quais diferem conforme o sorotipo (Kuhnert et al., 2000). Os fatores de virulência estão contidos no corpo bacteriano e a *E. coli* possui estruturas antigênicas que favorecem a definição dos seus sorotipos. Tal definição leva em consideração a classificação de Kauffmann, realizada em 1947, dos antígenos somáticos (Öhne - "O"), capsulares (Kapsei - "K"), flagelares (Hauch - "H") e fimbriais (Fimbriae - "F"). Além dessas, ainda há amostras rugosas, autoaglutinantes, que não devem ser sorotipadas em razão da perda da cadeia de polissacarídeos, seja ela total ou parcial (Rocha, 2008). Vale ressaltar que o antígeno somático "O" é um lipopolissacarídeo (LPS), substância que faz parte da parede celular das bactérias Gram-negativas e confere-lhes resistência (Magalhães et al., 2007).

Há cepas de *E. coli* com diferentes estratégias adaptativas coexistindo ao mesmo tempo, pois elas suportam ambientes inconstantes, de modo que a pressão seletiva de cada hospedeiro difere (Tenaillon et al., 2010). Amostras patogênicas de *E. coli* evidenciam que seus mecanismos de virulência são específicos e que podem ser constituintes inerentes do micro-organismo ou de genes adquiridos por meio de plasmídeos, que definem o aparecimento de linhagens diarreio gênicas e, nesse caso não causam doenças extraintestinais, ou linhagens que causam patologias extraintestinais. Considerando esse fatores, foi realizada a classificação dessas bactérias em patótipos: *E. coli* Enteropatogênica (EPEC), *E. coli* Produtora de Toxina Shiga (STEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasora (EIEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* patogênica aviária (APEC), *E. coli* meningite neonatal (NMEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Necrotoxigênica (NTEC), *E. coli* Aderentes-invasoras (AIEC) e *E. coli* Patogênica Extraintestinal (ExPEC), essas últimas não recebem nomenclaturas específicas e podem ser isoladas de infecções em diferentes localidades como os pulmões, abdômen, entre outros sítios anatômicos (Croxen, 2010; Saviolli, 2010).

Uma revisão de literatura realizada entre os períodos de janeiro de 2007 a março de 2018 evidenciou que bacteremias causadas por *E. coli* são comuns em países de alta renda, a taxa de incidência foi de 40 por 100.000 pessoas por ano e que essa taxa foi aumentando juntamente com o aumento da faixa etária atingida, chegando a ser maior que 300 em indivíduos de 75 a 85 anos de idade. De modo geral, a *E. coli* causou 27% dos casos registrados de bacteremia, desses 18% nosocomial, 32% associado à assistência médica e 33% adquirido na comunidade. Sendo a taxa de letalidade estimada em 12% (Bonten et al., 2021). Ademais, estima-se que a cada 10 pessoas, uma delas adoça por ingerir alimento contaminado, em 2018 a espécie *E. coli* foi responsável por mais de 63.000 mortes por doenças transmitidas por alimentos (WHO, 2018).

Por outro lado, a *P. aeruginosa* pertencente à família *Pseudomonadaceae*, apresenta-se em forma de bacilos, sendo bactérias Gram-negativas, aeróbias, com simples exigências nutricionais para desenvolverem-se, sendo capazes de oxidar glicose, possuindo motilidade advinda de flagelos polares e habitam diversos ambientes, sejam eles terrestres ou aquáticos, tecidos vegetais ou animais e locais bióticos ou abióticos (Azam, 2019). Ressalta-se que esses micro-organismos fazem parte da microbiota habitual da pele humana e em indivíduos saudáveis não provoca doenças, sendo então, um patógeno oportunista, que depende das condições do hospedeiro em harmonia com a atuação dos seus fatores de virulência para causar patologia (Pollack, 2000).

A OMS publicou uma lista prioritária de patógenos bacterianos, evidenciando que é urgente a pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos e a espécie *P. aeruginosa* está elencada na categoria "crítica" dessa lista (Tacconelli et al., 2018). Esse patógeno está relacionado à inúmeras infecções agudas e crônicas, como infecções do trato urinário (ITU), otite externa, pneumonia associada à ventilação mecânica, fibrose cística, lesões de feridas e queimaduras, ossos e infecções articulares, bacteremia e infecções sistêmicas (Botelho, 2019).

Essas bactérias possuem como característica própria uma baixa sensibilidade a antimicrobianos, em razão da baixa permeabilidade da sua membrana, como também a sua capacidade de formar biofilme, de produzir enzimas β -lactâmicas e aumentar a expressão da bomba de efluxo (Jurado-Martin, 2021). Ademais, assim como a *E. coli*, as *P. aeruginosa* expressam resistência através da aquisição de genes externos por intermédio da transferência horizontal ou por mutações de genes cromossômicos. Tal fato limita as opções terapêuticas, uma vez que esse micro-organismo é resistente a uma grande parte dos agentes antimicrobianos, incluindo aqueles mais escolhidos para o tratamento de bactérias multirresistentes (MDR do inglês *multidrug-resistant*): do carbapenem às cefalosporinas de

terceira geração (Azam, 2019), que são β -lactâmicos, fluorquinolonas e aminoglicosídeos, daí decorrendo uma alta taxa de morbidade e mortalidade (Chegini, 2020).

De acordo com dados de um estudo realizado no período de 2010 a 2015, em 703 unidades de terapia intensiva ao redor do mundo, as infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* tornaram-se uma grande preocupação, sobretudo devido a sua resistência a diferentes antimicrobianos. Corroborando com esse problema, em 2016 o Centro de Prevenção e Controle de Doenças da Europa publicou um relatório com dados de 2014 informando que essa espécie bacteriana era a mais isolada em casos de pneumonia adquirida em unidades de terapia intensiva em países europeus, bem como era a espécie mais prevalente em infecções do trato urinário e sanguínea adquiridas em unidades de terapia intensiva (Botelho, 2019). Estima-se que 11% das infecções nosocomiais são causadas por *P. aeruginosa* e que sua taxa de mortalidade atinge 60%, tendo como mais suscetíveis os indivíduos imunocomprometidos (Ambutsi, 2021).

Já a *Candida albicans* é um fungo dimórfico que comumente coloniza a mucosa dos sistemas gastrointestinal e genitourinário dos humanos, onde convive em equilíbrio com os demais componentes da microbiota, contudo quando há queda da imunidade do hospedeiro esse micro-organismo tem capacidade patogênica (Vila et al., 2020). Outrossim, possui habilidade de se adaptar às alterações de pH, de temperatura, de disponibilidade de O₂ e nutrientes (Santos et al., 2006).

Nas infecções em humanos, sejam superficiais ou invasivas e em diferentes localizações do corpo, *C. albicans* tem sido frequentemente isolado em forma de levedura (Simitsopoulou et al., 2013). Seus fatores de virulência viabilizam a adaptação da espécie ao ambiente, dentre eles citam-se: produção de adesinas, de proteínas lipolíticas e proteolíticas. Ademais, sua característica dimórfica enseja a mutação de leveduras para hifas e isso implica em uma maior capacidade de invasão aos tecidos e maior termotolerância (Akbari, 2015), além da capacidade de formação de biofilmes (Vila et al., 2020). O fato de ser comensal facilita ainda mais sua rápida adaptação às mudanças ambientais do hospedeiro, mesmo quando há restrição de nutrientes, sendo comum a indução à formação de pseudohifas como um indicador de maior virulência dessa espécie (Dadar et al., 2018)

Esse fungo possui susceptibilidade inerente aos antifúngicos sistêmicos que são aplicados na terapêutica de infecções sanguíneas (candidemia). Todavia, já foram registrados casos de resistência adquirida aos azóis e equinocandinas, que são medicamentos antifúngicos (Mattei et al., 2013). É relevante salientar que a espécie *C. albicans* tem elevada habilidade de formar biofilme, promovendo a adesão não só aos tecidos do hospedeiro, mas também a

equipamentos médicos, como cateteres, por exemplo e isso viabiliza a disseminação do patógeno via sistema circulatório, dificultando o tratamento (Vila et al., 2020).

A *C. albicans* está fortemente associada à candidíase invasiva, sendo responsável por 46,3% de incidência dessa patologia, como também está associada a uma taxa de mortalidade de aproximadamente 40%, por infecções sistêmicas (Dadar et al., 2018). Infecções fúngicas causadas por *Candida* spp., especialmente em indivíduos imunocomprometidos ou com doença crônica de base, são de grande preocupação por elevada morbidade e mortalidade (Santos et al, 2020b).

3.3 Fungos e a prospecção de antimicrobianos

3.3.1 Características gerais dos fungos filamentosos e produção de antimicrobianos

Os fungos fazem parte do reino *Fungi*, são eucariontes heterótrofos, podendo apresentar-se de forma unicelular, como as leveduras ou de forma filamentosa, contendo hifas. Ademais são dimórficos, ou seja, possuem a capacidade de mudar de forma de acordo com as alterações ambientais onde se encontram (Tedersoo et al., 2010). Por apresentarem uma notável habilidade de adaptação, são capazes de colonizar diversos ambientes, assim podem ser encontrados em todos os ecossistemas, inclusive aqueles que possuem características extremas (Onofri et al., 2011; Selbmann et al., 2013).

Em 2007, foi proposta a classificação mais atual do reino *Fungi*, sendo respaldada em estudos filogenéticos e organizada da seguinte forma: sete filos, dez subfilos, 35 classes, 12 subclasses e 129 ordens. Os filos são: Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Glomeromycota, Microsporidia e Neocallimastigomycota. Já o grupo Zygomycota não possui mais valor taxonômico e passou a ser separado em quatro subfilos: Entomophthoromycotina, Kickellomycotina, Mucoromycotina e Zoopagomycotina (Hibbett et al., 2007).

Os fungos filamentosos promovem a decomposição de matéria orgânica complexa, como lignina e celulose, além de outros polímeros e realizam a ciclagem de nutrientes, contribuindo, desse modo, para a sustentabilidade do meio ambiente (Dashtban et al., 2010). Tais organismos ainda contribuem efetivamente na evolução de espécies vegetais, uma vez que atuam em sua nutrição e constituem simbiose com plantas (Buée, 2009), por esses motivos têm relevância crucial nos diferentes ambientes em que se localizam. Outrossim, esses organismos dispõem de alta diversidade metabólica, que lhes permite

degradar não somente resíduos orgânicos, mas também substâncias com características tóxicas (Harms et al., 2011).

Os fungos possuem uma imensa diversidade de espécies e são reconhecidos por gerarem uma grande variedade de compostos bioativos que atuam em diferentes áreas, como a biomédica, farmacêutica, agricultura, industrial, têxtil e tantas outras. O Quadro 1 evidencia um compilado de estudos com antimicrobianos produzidos por fungos filamentosos isolados de diferentes localidades, como: solo, mar, mangue, raiz de planta, algas e esponjas marinhas. Para tanto, foram utilizados diferentes meios de cultura com o intuito de fornecer um ambiente adequado para o desenvolvimento dos micro-organismos pesquisados, entre os meios empregados estão: Czapek enriquecido com glicose, ágar batata dextrose, levedura sacarose, extrato de malte e caldo batata dextrose.

Quadro 1. Aspectos gerais da produção de antimicrobianos por fungos filamentosos de origem ambiental: espécie fúngica, meio de incubação, forma de extração dos metabólitos, composto antimicrobiano, micro-organismos sensíveis e referências.

Fungo	Amostra e local de isolamento	Meio de cultura / incubação	Extração (solvente)	Composto antimicrobiano	Micro-organismos sensíveis (MIC)	Referência
<i>Aspergillus</i> sp. DHE 4	Solo (província de Qalyubia, Egito)	Czapek com glicose por 4 dias a 28°C e ágar batata dextrose, 7 dias a 28°C	Acetato de etila	4 - hidroxí - 4 - metil - tetrídó - pírona; R (-) -mevalonolactona, composto poli-hidroxí esteroidal, ácido kójico juntamente com uma mistura de α/β -glicosídeo	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida albicans</i> (não informa a MIC)	ABDEL-RAZEK, A.S. et al., 2020
<i>Emericella</i> sp.	Mar (não informa a localização)	NI	NI	Emericellamide A e B	MRSA (A, MIC 3.8; B, MIC 6.0 μ M)	BARBOSA, F. et al., 2020
<i>Pestalotia</i> sp. CNJ-32	Isolado da alga marrom <i>Rosenvingea</i> sp. coletado nas Ilhas Bahamas	NI	NI	Pestalone	MRSA (MIC 0.037 μ g/mL) VREF (MIC 0.078 μ g/mL)	
<i>Leucostoma personii</i>	Mangue vermelho (<i>Rhizophora mangle</i>)	NI	NI	Cytosporone B	MRSA (MIC 78 μ M)	
<i>Leucostoma personii</i>	Mangue vermelho (<i>Rhizophora mangle</i>)	NI	NI	Cytosporone E	MRSA (MIC 72 μ M) MSSA (MIC 72 μ M)	
<i>Lindgomycetaceae</i> family	Isoladas de uma esponja do Mar Báltico e da Antártida.	NI	NI	Lindgomycin (50) e ascosetin (51)	<i>B. subtilis</i> (50, MIC 2.2; 51, MIC 3.4 μ M), <i>Staphylococcus epidermidis</i> (50, MIC 4.6; 51, MIC 6.3 μ M) <i>S. aureus</i> (50, MIC 2.7; 51, MIC 2.9 μ M) <i>Propionibacterium acnes</i> (50, MIC 4.7; 51, MIC 2.8 μ M) MRSA (50, MIC 3.2; 51, MIC 5.1 μ M) <i>Candida albicans</i> (50, MIC 5.7; 51, MIC 8.0 μ M)	
<i>Penicillium meleagrimum</i> var. <i>viridiflavu</i>	Mar (não informa a localização)	NI	NI	Melearoride A e B	Sinergismo com fluconazol contra <i>C. albicans</i> resistente a azol	
<i>Penicillium meleagrimum</i> var.	Mar (não informa a localização)	NI	NI	PF1163A, B, H e F	<i>C. albicans</i> resistente ao azol (A,	

<i>viridiflavu</i>					MIC 1; B, MIC2; H, MIC 16; F, MIC 8 µg/mL) Sinergismo com fluconazol contra <i>C. albicans</i> resistente	
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	Mar (não informa a localização)	NI	NI	Didymellamide A	<i>C. albicans</i> resistente ao azol (MIC 3,1 µg/mL) <i>C. albicans</i> sensível ao azol (CIM 3,1 µg/mL) <i>C. glabrata</i> (CIM 3,1 µg/mL) <i>Cryptococcus neoformans</i> (CIM 1,6 µg/mL)	
<i>Trichoderma</i> sp.	Mar da Groenlândia	NI	NI	Pyridoxatin	<i>B. subtilis</i> (IC 50 5 µM) <i>S. epidermidis</i> (IC 50 4 µM) MRSA (IC 50 4 µM) <i>C. albicans</i> (IC 50 26 µM) <i>Trichophyton rubrum</i> (IC 50 4 µM)	
<i>Aspergillus candidus</i> KUFA 0062		NI	NI	Preussin	<i>S. aureus</i> (MIC 32 µg/mL) <i>Enterococcus faecalis</i> (MIC 32 µg/mL) MRSA (MIC 32 µg/mL) VRE (MIC 32 µg/mL) Efeito sinérgico com oxacilina contra MRSA Efeito sinérgico com colistina contra <i>E. coli</i>	
<i>Zygosporium</i> sp. KNC52		NI	NI	Sulfoalkylresorcinol	MRSA (MIC 12.5 µg/mL) MDR <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MIC 166 µg/mL) <i>Mycobacterium bovis</i> (MIC 166 µg/mL) <i>Mycobacterium avium</i> (MIC 166 µg/mL) MDR <i>P. aeruginosa</i> (MIC 50 µg/mL)	
<i>Aspergillus candidus</i> KUFA 0062	Isolado da esponja marinha <i>Epipolassis</i> sp.	NI	NI	Petromurin C	Efeito sinérgico com oxacilina contra MRSA	
<i>Aspergillus terreus</i> var. <i>africanos</i>	Solo (Sultanato de Omã)	Quatro meios diferentes (extrato de levedura sacarose batata dextrose, czapek's dox e extrato de malte de levedura ágar extrato de malte) e incubadas por 5-7 dias a 25°C	Extraído com n-butanol (saturado com água) e reextraído novamente por quatro vezes repetidas.	Petromurin C	<i>Candida albicans</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus gordonii</i> , e <i>Streptococcus mutans</i>	ALKHULAIFI, M. et al., 2019

<i>Aspergillus flavus</i> DPUA 1451	Solo (Sultanato de Omã)	Quatro meios diferentes (extrato de levedura sacarose batata dextrose, czapek's dox e extrato de malte de levedura ágar extrato de malte) e incubadas por 5-7 dias a 25°C	Extraída por refluxo em 2 litros de etanol fervido por 120 min e reextraída novamente por três vezes	Não informado	<i>Candida tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. albicans</i> DPUA 1706	
<i>Alternaria alternata</i>	Isolado de Picrorhiza kurroa de Garhwal Himalaia, Índia.	Ágar batata dextrose incubado por 15 dias a 25°C	metanol e acetato de etila	NI	<i>Escherichia coli</i> (MTCC 443) <i>Serratia marcescens</i> (MTCC-97), <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC-441), <i>Staphylococcus aureus</i> (MTCC-740)	CHANDRA, H. et al., 2021
<i>Fusarium proliferatum</i> ACQR8	Tecidos radiculares de <i>Cissus quadrangularis</i> L.	Caldo batata dextrose, 21 dias a 27°C	Extraído com acetato de etila, filtrado por três vezes utilizando tecido de musseline em funil, a parte orgânica foi coletada e concentrada em evaporador rotativo e foram para secagem	ácido N-hexadecanóico (19,54%), fenol, 2,4-di-terc-butil (16,94%), ácido 1,2-benzenodicarboxílico, éster dibutílico (7,93%), metil 14-metilpentadecanoato (5,86%), E-15-heptadecenal (4,91%), óxido de limoneno (2,97%), ácido 9-octadecenóico (Z)-, éster metílico (2,47%) e outros	<i>K. pneumoniae</i> (40 mg/mL), <i>S. boydii</i> (46.67 mg/mL), <i>E. faecalis</i> (120 mg/mL), <i>E. coli</i> (106.67 mg/mL), <i>S. aureus</i> (70 mg/mL), <i>S. typhi</i> (50 mg/mL), <i>A. hydrophila</i> (66.67 mg/mL), <i>R. solani</i> (0,2 mg/mL), <i>F. oxysporum</i> (1,6 mg/mL), <i>T. mentagrophyte</i> (2,0 mg/mL), <i>M. gypseum</i> (2,33 mg/mL)	SINGH, A. et al., 2021

NI = Não informado

Fonte: a autora (2023).

Já para realizar a extração dos compostos com atividade antimicrobiana, destacam-se os solventes: acetato de etila ($C_4H_8O_2$), n-butanol ($C_4H_{10}O$), etanol (C_2H_5OH) e metanol (CH_3OH). Esse compilado evidencia que, mesmo diante de diferentes técnicas e espécies fúngicas, os metabólitos secundários produzidos por fungos de lugares distintos apresentaram resultados satisfatórios em relação à ação antimicrobiana (Quadro 1). Esses estudos enriquecem o conhecimento sobre os compostos sintetizados por fungos, bem como intensifica o seu valor na área de produtos naturais (Singh et al., 2021).

3.4 Produtos naturais como fontes de antimicrobianos

3.4.1 Contextualização histórica

A utilização de micro-organismos para combater doenças remonta a um passado bem distante, há registros em papiro de Ebers, datado de 1550 A.C., informando o uso de solo medicinal e pão mofado como fármacos (Hass, 1999). Há mais de 2000 anos em locais como China, Grécia e Egito aplicava-se emplastro de pão mofado para tratar feridas e também na tentativa de utilizar micro-organismos produtores de antimicrobianos com o intuito de prevenir doenças (Hutchings, 2019). Nessa conjuntura, no século XIX evidenciou-se que bactérias causam infecções, fato que impulsionou a pesquisa de processos terapêuticos, culminando, meio século depois, com a descoberta dos antibióticos (Davies, 2010).

Em 1890 relata-se a primeira vez em que um antibiótico foi utilizado. Os médicos alemães Emmerich e Low isolaram micro-organismos de bandagens empregadas em feridas infectadas e perceberam que havia uma coloração verde-azulada, em seguida realizaram a cultura do *Bacillus pycyanus*, que atualmente recebe o nome de *P. aeruginosa*, aplicaram seus extratos em indivíduos doentes e os denominaram de piocianase (Hutchings, 2019). E em 1928 temos a descoberta da penicilina, famoso achado característico pela contaminação da placa de Petri do biólogo e médico Alexander Fleming, enquanto ele estudava sobre a bactéria *S. aureus*, a amostra bacteriana ficou por uma ou duas semanas em temperatura ambiente e “mofou”, então ele observou que as bactérias haviam perdido sua ação ou haviam sido mortas pelo fungo *Penicillium notatum* (Geddes, 2008). Então por volta de 1930 o termo "antibiótico" foi utilizado pela primeira vez por Selman Waksman, bioquímico que registrou que os micro-organismos são capazes de produzir compostos que destroem outros micro-organismos, em tempo em que identificou Actinomycetes filamentosos que vivem no solo e, a partir disso, descobriu diferentes antibióticos produzidos por produtos naturais ou metabólitos secundários, dentre eles estreptomicina e neomicina (Waksman, 2010).

Diante de todas as conquistas a partir de produtos naturais com ações antimicrobianas tão efetivas deu-se a era do ouro, de 1940 a 1960, lembrando que muitos desses fármacos ainda estão em uso na atualidade. Já na década de 1970, com o uso excessivo dos medicamentos, devido ao *boom* de descobertas e ao largo uso, possivelmente contribuiu para o crescente desenvolvimento dos mecanismos de resistência dos micro-organismos. A partir desse momento houve um hiato na história, novas descobertas foram realizadas, mas relativamente pouco se comparada à época do auge (Prescott, 2014; Katz, 2016).

3.4.2 Caracterização dos produtos naturais de maneira geral e sua atividade antimicrobiana

Produtos naturais são definidos como substâncias químicas oriundas de fontes fúngicas, bacterianas, vegetais e animais, que são classificados também como metabólitos secundários e possuem diversas funções biológicas com aplicabilidade econômica na medicina, veterinária, agricultura, dentre outros (Katz, 2016). O termo “metabólitos secundários” é bastante utilizado para descrever substâncias que os organismos produzem, mas que não possuem função primária no seu desenvolvimento, contudo são importantes para sua sobrevivência, proporcionando vantagens adaptativas (Katz, 2016; Kavanagh, 2017).

A natureza tem uma imensa diversidade química, de forma que os produtos naturais são tidos como montantes de compostos bioativos com capacidade terapêutica, assim cada vez mais pesquisadores buscam isolar produtos naturais de micro-organismos em busca de conhecer seus mecanismos de ação e explorar suas potencialidades (Huang, 2021). Além disso, esses produtos geralmente apresentam boa biodisponibilidade, o que é ideal para os ensaios funcionais (Ding et al., 2017). As principais ações descritas dos metabólitos secundários são comunicação, regulação e defesa. Ademais, eles apresentam inúmeras funções fisiológicas e químicas, podendo agir como hormônios, vitaminas, toxinas, neurotransmissores, por exemplo. As possibilidades de atividades são incontáveis (Berdy, 2012). Outra ação estudada dos produtos naturais é sua ação antienvhecimento, estima-se que a cada 300 compostos que possuem essa atividade, 185 deles sejam derivados de produtos naturais, uma vez que a maioria dos seus extratos têm apresentado ação antioxidante. Ressaltando-se que os mecanismos de ação são diferentes entre si (Ding et al., 2017).

3.5 Micro-organismos como fontes de antimicrobianos

Se por um lado os micro-organismos causam doenças em humanos, por outro têm contribuído sobremaneira na descoberta de drogas responsáveis por curar inúmeras enfermidades, como ainda continuam sendo objeto de estudos e ensaios clínicos importantes, fornecendo mais e mais pistas (Saklani, 2008). Os micro-organismos predominam no desenvolvimento de agentes terapêuticos e, dentre eles, bactérias do filo Actinobacteria são os que mais produzem compostos bioativos, sendo aplicados na agricultura, medicina e veterinária (Jakubiec-Krzesniak et al., 2018). Dos antimicrobianos descobertos entre os anos de 1945 e 1978, 55% foram derivados de actinomicetos do gênero *Streptomyces* e, dentre as classes de antibióticos conhecidas até 2019, 64% delas foram derivadas de actinomicetos filamentosos (Hutchings, 2019).

As drogas oriundas dos actinomicetos, apresentam atividades antimicrobianas distintas, assim possuem espectros diferentes. De acordo com as condições de cultivo, bem como com o meio de cultivo utilizado e da espécie isolada, a natureza dos ativos desenvolvidos será distinta (Waksman, 2010). Diferentes métodos são constantemente elaborados com o objetivo de ativar os metabólitos secundários dos actinomicetos, como, por exemplo, o uso de culturas combinadas e com isso alcançar atividades distintas, como antifúngica, antibacteriana, antiviral, antitumoral e enzimática (Jakubiec-Krzesniak et al., 2018).

Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas, conhecidas como actinobactérias e possuem algumas características que se assemelham a fungos, como a formação de esporos aeróbicos, ainda se caracterizam com substrato de micélio aéreo, além de serem filamentosas e portarem hifas aéreas (Bhatti, 2017). As actinobactérias são amplamente difundidas, de modo que são encontradas em ambientes terrestres, marinhos e também de água doce, ademais suas atividades envolvem fragmentação de matéria orgânica e substâncias xenobióticas (Ballav, 2012). Dentro do filo de actinobactérias, o gênero *Streptomyces* produz diversas classes de antibióticos, dentre eles citam-se: eritromicina, cloranfenicol, neomicina, estreptomicina, tetraciclina, nistatina, como também agentes antitumorais, vitaminas e aminoácidos (Santana, 2015).

3.6. Atividade antioxidante de produtos microbianos

3.6.1 Estresse oxidativo e Atividade antioxidante

Para o funcionamento habitual do organismo existe uma série de reações acontecendo no corpo e determinadas reações provocam a liberação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERNs), que causam danos oxidativos em biomoléculas importantes como ácidos nucleicos e lipídeos, além de influenciarem em processos celulares como apoptose, provocando processos patológicos e degenerativos no organismo humano (Ujam et al., 2021).

O oxigênio é de fundamental importância para o funcionamento do metabolismo dos seres aeróbicos, porém quando ocorrem as reações de ganho e perda de elétrons, o que é esperado dos processos celulares, há a formação dos compostos reativos, que são ou originam radicais livres. As EROs são moléculas de O_2 com elétrons isolados, altamente reativas e originadas por reações endógenas e exógenas. Comumente, nas moléculas os elétrons se organizam em pares, ganhando estabilidade e o contrário ocorre quando os elétrons estão desemparelhados, o que viabiliza as reações em cadeia que findam por desestabilizar o equilíbrio molecular (Scharffetter-Kochanek et al., 2000).

Analisando o oxigênio pela sua estrutura eletrônica, verifica-se que ele tende a ganhar um elétron de cada vez, possibilitando a formação de compostos intermediários com alta reatividade, tais como: o radical hidroxila (OH^\cdot), o ânion radical superóxido ($O_2^\cdot^-$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Ridaoui et al., 2021). Dentre as organelas e estruturas celulares que participam das reações endógenas que originam os radicais livres podemos citar as membranas, núcleos, mitocôndrias, peroxissomos, lisossomos e retículo endoplasmático. Já as reações exógenas envolvidas nessa produção estão relacionadas a hábitos de vida dos indivíduos, tais como o uso de tabaco, solventes orgânicos, pesticidas, exposição excessiva e desprotegida à radiação solar e poluição ambiental (Boulebd, 2020).

É importante destacar que as ERO/ERN desempenham papéis fisiológicos como na regulação do crescimento celular, na fagocitose, ação no sistema imunológico, sinalização intracelular, produção de energia e atuação na formação de substâncias biológicas, tais como enzimas e hormônios. Portanto, os radicais livres também são capazes de produzir efeitos favoráveis ao organismo quando produzidos de maneira regular (Hadidi et al., 2022). Contudo, quando a geração de ERO/ERN torna-se maior do que a capacidade antioxidante celular, acontece uma condição designada estresse oxidativo, sendo bastante danosa às células do organismo (Munteanu; Apetrei, 2021). Sendo assim, faz-se necessária a utilização de

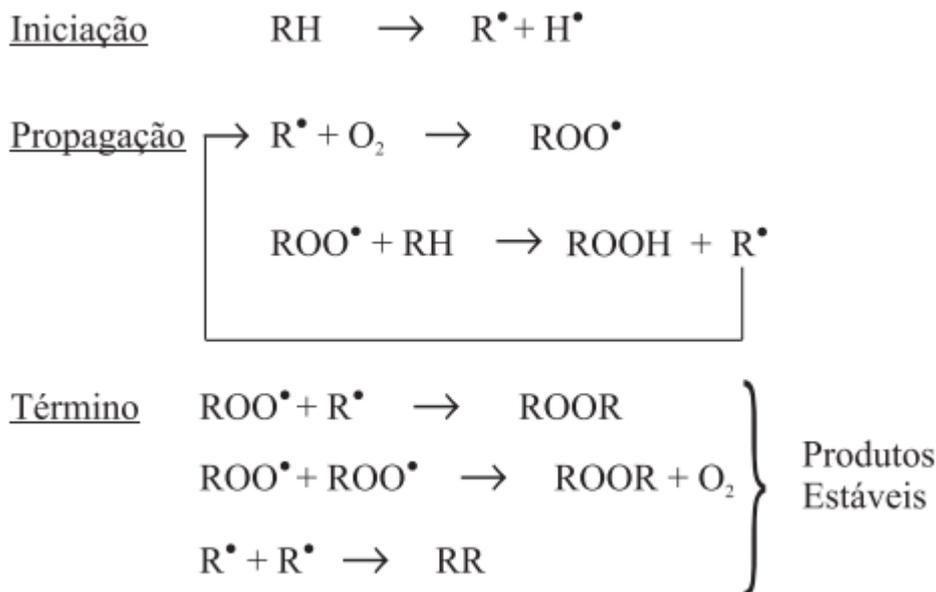
substâncias com ação antioxidante, as quais são capazes de neutralizar os radicais livres (Tavares et al., 2018), prevenindo a oxidação de moléculas do organismo e impedindo as reações oxidativas em cadeia (Ujam et al., 2021).

As substâncias com ação antioxidante são classificadas em enzimáticas e não enzimáticas, onde as primeiras são enzimas como a catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase e superóxido-dismutase (SOD), enquanto as não enzimáticas são vitaminas (A, C e E), pigmentos naturais, minerais, carotenoides, compostos fenólicos dentre outras. Ademais, tais substâncias podem ter origem natural como o α -tocoferol, o ácido ascórbico e ácido gálico ou podem ser de origem sintética e neste caso são umas das mais aplicadas na indústria alimentícia, por exemplo, com o intuito de inviabilizar a oxidação lipídica dos produtos, aumentando assim o tempo de vida de prateleira dos produtos alimentícios. Dentre os exemplos de antioxidantes sintéticos, destacam-se o butil-hidroxitolueno (BHT), o hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2 ácido carboxílico (Trolox) e butil-hidroxianisol (BHA) (Boulebd, 2020).

Outrossim, os antioxidantes também são classificados em primários e secundários, sendo os primeiros doadores de elétrons aos radicais livres, assim permitem que os produtos em que são aplicados fiquem mais estáveis termodinamicamente, nessa classe encontram-se o BHT, BHA, carotenoides e tocoferóis. Enquanto os secundários decompõem hidroperóxidos e, com isso, diminuem a taxa de iniciação da oxidação ao tempo em que favorecem a atividade antioxidante dos primários, nesse grupo encontram-se os ácidos ascórbico, cítrico e tartárico. Alguns antioxidantes possuem mais de um mecanismo de atuação e, por isso, são tidos como antioxidantes de múltipla função (Couttolenc et al, 2020). Ainda, os antioxidantes secundários também são classificados como sinergistas, uma vez que viabilizam a atividade dos antioxidantes primários (Battistella, 2020).

O processo oxidativo acontece em três etapas: iniciação, propagação e término, como pode ser visto na figura 2. Na iniciação, há a remoção de um hidrogênio de carbono alílico na molécula do ácido graxo, o que viabiliza a formação de radicais livres, em condições adequadas de luz e calor. Na etapa da propagação, os radicais livres suscetíveis ao ataque do oxigênio são convertidos a outros radicais, que são os peróxidos e hidroperóxidos, produtos primários da oxidação. Trata-se de um processo autocatalítico e os radicais formados nesta etapa são propagadores da reação. Já na etapa do término, dois radicais se combinam e formam produtos estáveis, secundário da reação e obtido por cisão e rearranjo dos peróxidos (Battistella, 2020).

Figura 2: Demonstração geral do mecanismo de oxidação lipídica, onde RH- ácido graxo insaturado, R°- radical livre, ROO° - Radical peróxido e ROOH – hidroperóxido.



Fonte: Ramalho e Jorge, 2006.

É importante ressaltar que, mesmo sendo bem efetivos e importantes para o aumento da vida útil de diversos produtos, os antioxidantes sintéticos possuem seu uso restrito em alguns países como o Canadá, por exemplo. Tal restrição é em razão de causarem efeitos deletérios ao organismo humano e por isso há um grande interesse em prospectar novos antioxidantes procedentes de fontes naturais (Liu, 2022).

3.6.2 Antioxidantes de origem fúngica

A produção de metabólitos secundários por micro-organismos é bastante estudada, pois é a partir deles que se obtêm inúmeros compostos bioativos. Há em torno de 23.000 metabólitos secundários de ação conhecida, sendo cerca de 42% deles produzidos por fungos, mais 42% produzidos por actinomicetos e 16% por eubactérias (Castro, 2020).

Na composição dos micro-organismos há grupos de genes críticos que ao serem ativados quando estão submetidos a fatores limitantes ou situações extremas viabilizam a produção dos metabólitos secundários e, muitos deles, apresentam potencial antioxidante (Rani, 2021). Os fungos produzem diversas enzimas, dentre elas, as enzimas antioxidantes, que atuam também como defesa microbiana contra à ação do sistema imunológico como ocorre nos lisossomos, com altos níveis de agentes oxidantes, diante de infecções causadas

por esses micro-organismos patogênicos. As peroxirredoxinas (Pxr) são exemplos dessas enzimas que atuam protegendo esses micro-organismos contra a ação oxidativa de defesa do hospedeiro humano. Vale destacar, que as Prxs apresentam seis classes distintas e relacionam-se com a patogênese dos micro-organismos (Oliveira et al, 2021).

Os fungos produzem uma gama de metabólitos secundários que apresentam atividades com aplicabilidades biotecnológicas importantes, ao exibirem atividades antibacterianas e antifúngicas, tendo como vantagem o fato de que a prospecção química dos seus metabólitos, quando comparado a fontes vegetais, pode acontecer com mais facilidade e em larga escala por meio do processo de fermentação, sem que haja prejuízos ao meio ambiente (Hyde et al, 2019; Keller, 2019). Além disso, fontes sintéticas dos compostos antioxidantes podem provocar toxicidade ao homem, através dos produtos que originam na sua degradação, o que limita seu uso (Kaur et al, 2020). Nessa conjuntura, a produção de compostos bioativos vem se destacando na medicina, com ênfase em seu impacto positivo sobre as doenças relacionadas ao estresse oxidativo. Uma vez que os compostos antioxidantes possuem propriedades farmacológicas, por meio de atividades anti-inflamatórias, antimicrobianas e, até mesmo, antitumorais (Hyde et al, 2019).

O metabolismo dos fungos é capaz de produzir diferentes compostos orgânicos com atividade antioxidante, dentre eles estão as substâncias: alcalóides, ácidos fenólicos, carotenoides, polifenóis, terpenos, xantonas e seus derivados, importantes na promoção da atividade antioxidante, favorecendo à saúde tanto de humanos quanto de animais (Romão et al, 2022). Nesse contexto, estudos referem que fungos dos gêneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Diaporthe* e *Penicillium* são capazes de produzir substâncias bioativas com atividade antioxidante (Rai et al, 2022).

Os compostos fenólicos têm capacidade de inutilizar a peroxidação lipídica, promover a quelação de íons metálicos e coibir a decomposição de hidroperóxidos em radicais livres, tudo isso devido ao fato de serem doadores de hidrogênio bastante efetivos, ou seja, são doadores de elétrons para radicais livres (Chandra, 2020), além disso sua estrutura favorece a atividade antioxidante, pois esses compostos apresentam anéis aromáticos, ligações duplas e muitos grupos funcionais (Duda-Chodak, 2023). Através do processo fermentativo, seja por meio de cultura sólido ou líquido, possibilita meios adequados para que diferentes cepas fúngicas produzam ácidos gálico e ferúlico, por exemplo. Tais ácidos orgânicos têm ação antioxidante, pois apresentam de dois a quatro grupos hidroxilas reativas. Assim como esses, outros compostos fúngicos, como a astaxantina e a zeaxantina, também possuem grupos hidroxila reativos, o que associa ao efeito antioxidante (Zhang et al, 2018).

Ainda sobre a produção de compostos fenólicos, foi comprovado que os fungos *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp., *Torula* sp. e *Phoma* sp. são bons produtores de antioxidantes, destacando-se o ácido benzóico, rutina e terpenóides (Chandra, 2020). Em relação à produção de carotenoides, os fungos filamentosos que recebem destaque na formação de β -caroteno são: *Blakeslea trispora*, *Fusarium sporotrichioides*, *Mucor circinelloides*, *Neurospora crassa* e *Phycomyces blakesleeanus*. β -caroteno é um pigmento fúngico com atividade antioxidante, além de ser precursor da vitamina A, sendo importante para beneficiar a visão, pele e sistema imunológico (Hyde et al, 2019). Outro carotenoide com ação antioxidante é o licopeno, o qual é produzido pela espécie *Blakeslea trispora*,

3.6.3 Métodos de atividade antioxidante

A fim de pesquisar, *in vitro*, a atividade antioxidante de substâncias com esse potencial, incluindo extratos vegetais, há diferentes métodos descritos na literatura que variam de acordo com a forma de inibição da cadeia de reação de oxidação, ocorrendo das seguintes formas: quando o antioxidante age como acceptor de elétrons ou como doador de hidrogênio, formando radicais estáveis, ou ainda pela inibição de determinadas vias produtoras de radicais livres (Couttolenc et al, 2020). Cada método possui uma forma de avaliação mais adequada, que pode ser por espectrofotometria, cromatografia ou por técnica eletroquímica. Outrossim, os ensaios baseados na transferência de elétrons estão na dependência do solvente e do pH, por outro lado, os testes baseados na doação de hidrogênio dependem tanto do pH e do solvente quanto da energia empregada na dissociação da ligação do grupo que atua doando o hidrogênio (Siddeeg et al, 2021).

Os métodos que envolvem a doação de hidrogênio são os testes de: Parâmetro Antioxidante de Retenção de Radicais Peroxil Total (TRAP), Capacidade Antioxidante de Radicais Hidroxílicos (HORAC), Capacidade Total de Eliminação de Radicais Oxirídricos (TOSC) e de Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio (ORAC). Enquanto aqueles que transferem um elétron são: Potência Antioxidante Redutora Férrica (FRAP), Capacidade Antioxidante Redutora Cúprica (CUPRAC) e o de Folin–Ciocalteu. Já os testes que englobam a transferência de elétron e de hidrogênio são os testes de: 2,2'-Azinobis-(3-ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (Munteanu; Apetrei, 2021).

Aqui serão destacados os métodos DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*), que são técnicas colorimétricas, de rápida execução e de baixo custo. O primeiro método fundamenta-se na captura do radical DPPH,

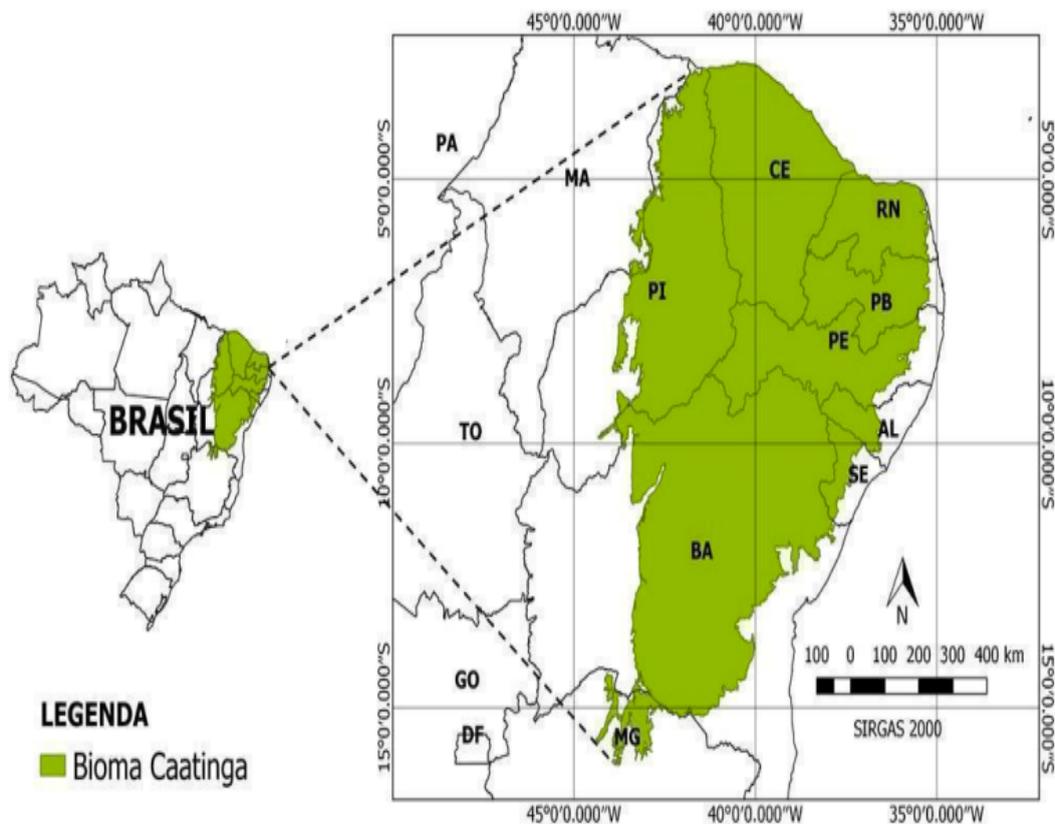
havendo uma reação de oxirredução, passando então para DPPH-H, ao mesmo tempo em que há um declínio na absorbância e uma alteração da coloração que varia de roxo para amarelo (Pires et al, 2017). Ao passo que, o método FRAP baseia-se na transferência de um único elétron, para tal utiliza-se a substância TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) que possui o íon Fe^{3+} e viabiliza a produção do íon Fe^{2+} , assim quando a redução se processa há uma mudança na cor da substância de roxo claro para roxo intenso (Pires et al., 2017; Munteanu; Apetrei, 2021).

3.7 Bioma Caatinga

3.7.1 Bioma Caatinga: Características gerais e riqueza biológica

A Caatinga é um bioma unicamente brasileiro, situado nas regiões de clima semiárido dos seguintes estados: Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe e a parte norte de Minas Gerais (**Figura 3**), portanto sua maior concentração ocorre na região nordeste do Brasil e abrange o total de 1.262 municípios. Apresenta uma área aproximada de 844.453Km², correspondendo a 11% do território brasileiro, 70% da região nordeste (IBGE, 2014; IBGE, 2019) e uma população de 30 milhões de habitantes, sendo a região semiárida mais populosa do mundo (Andrade et al., 2020), equivalente, em média, a 56% da população do Nordeste (IBGE, 2019).

Figura 3: Mapa do Brasil destacando o bioma Caatinga.



Fonte: Silva, 2019.

Esse bioma é habitualmente chamado de "Polígono da Seca", pois se caracteriza pelo clima semiárido, com chuvas irregulares, vegetação arbustiva, seca, decídua e espinhosa. Assim, as espécies da flora são adaptadas à escassez hídrica, já que o índice pluviométrico anual varia de 240 a 1500 mm, geralmente limitado de janeiro a março. As temperaturas anuais variam em torno de 27 °C, portanto, elevadas e com insolação, o que requer adequação da biota à sobrevivência devido às particularidades ambientais da região (Lisboa et al., 2020), ainda apresenta uma média anual de evaporação em torno de 2000mm e umidade relativa do ar em torno de 50% (SUDENE, 2021).

Pela sua diversidade vegetal, a Caatinga é um território de valor inestimável, contudo apenas 8,4% do seu território recebe proteção por unidades de conservação, ademais parte significativa desse bioma não existe em outro local do globo, tornando-se de suma relevância sua preservação (Moura *et al.*, 2021). Após os biomas Mata Atlântica e Cerrado brasileiros, a Caatinga é o bioma mais deteriorado pelas ações antrópicas (Magalhães et al., 2019), principalmente pela cultura agrícola, pastagens e corte de madeira descomedido (Moura et al.,

2016), disso decorrem alterações significativas no solo, diminuição do desenvolvimento vegetal e, até mesmo, perda da diversidade biológica (Coelho et al., 2018).

O nome Caatinga significa mata branca e é derivado do idioma tupi-guarani (Conafer, 2022), esse bioma foi batizado assim pela prevalência da sua vegetação típica do semiárido: xerófitas. Supõe-se que haja 5000 espécies de plantas, sendo 380 delas endêmicas (Cavalcante et al., 2017), destacando-se as seguintes: xique-xique, mandacaru, juazeiro e macambira (Freitas, 2005; Queiroz et al., 2017). Em relação aos animais vertebrados, por volta de 1400 espécimes fazem parte desse bioma, sendo 23% delas endêmicas, ademais cerca da metade das variedades de lagartos e peixes são endêmicas. Em 2018 foram registradas 548 espécies de aves, delas 509 eram consideradas residentes da Caatinga e esse número provavelmente deve aumentar, pois estudos taxonômicos ainda estão em andamento (Garda et al., 2018).

Essa região possui grande importância por sua biodiversidade e alta pluralidade de espécies vegetais, incluindo plantas medicinais, que são amplamente manuseadas pela população local. Tal fato contribuiu para o desenvolvimento de consistentes estudos farmacológicos que evidenciaram que plantas desse bioma se mostraram capazes de evitar o desenvolvimento e aderência bacteriana, bem como diminuir inflamação e viabilidade de protozoários flagelados (Silva et al., 2015; Santos et al., 2018).

Conforme posto, muitas características da Caatinga não são encontradas em outras localidades do globo e isto inclui, além, da vegetação e dos animais, os micro-organismos, que desenvolvem adaptações exclusivas para sobreviver nessa região semiárida. Deste modo, os micro-organismos retirados desse bioma, são verdadeiras fontes de biomoléculas com grande potencial de apresentar novas atividades biológicas (Rocha et al., 2019). E, para que eles sobrevivam adequadamente, precisam enfrentar as condições apresentadas pelo clima característico da região, destarte é necessário que desenvolvam mecanismos para superar as alterações de temperatura, insolação, solo com alta salinidade e pouca disponibilidade de nutrientes. Assim, somente os micro-organismos com habilidade genética de adaptação metabólica conseguem sobreviver (Cary et al., 2010; Caruso et al., 2011).

3.7.2 Fungos da Caatinga: aspectos gerais e potencial biotecnológico

Os fungos são encontrados em diversos locais no globo, uma vez que se desenvolvem em diferentes substratos e condições ambientais, além de exercerem relações com outros organismos, como plantas, animais e, até mesmo, com outros fungos. Outrossim, eles possuem a capacidade de se adequar a altas e baixas temperaturas, de forma que vivem

satisfatoriamente bem em ambientes considerados extremos, como é o caso da região semiárida (Oliveira et al., 2013).

Objetivando o enfrentamento das alterações climáticas do semiárido da Caatinga, a maior parte da vegetação possui relação simbiótica com fungos micorrizos, vencendo, desse modo, os estresses ambientais, pois os fungos proporcionam às plantas maior tolerância e resistência, ao dirimir as deficiências nutritivas do solo e o estresse hídrico (Souza et al., 2003). Outra associação mutualística importante ocorre entre os líquens e as algas, essas últimas fornecem nutrientes aos fungos e recebem deles um ambiente adequado com acesso a minerais e água, propiciando seu desenvolvimento (Barbosa-Silva et al., 2019).

No Brasil, há o registro de 5500 espécies de fungos e 850 delas localizam-se na região semiárida. Considerando todas as características mencionadas, é possível compreender a existência de uma ampla variedade de fungos na Caatinga e que, nessa região, interferem ativamente nesse ecossistema (Silva et al., 2020c). Os fungos são essenciais para o equilíbrio do ecossistema quando exercem suas funções de renovação de solo, ciclagem de nutrientes e tratamento de resíduos, por exemplo. Mas eles também atuam em outro meio, o biotecnológico, exercendo função importante na produção de bebidas, alimentos, bioplásticos, biodiesel, indústrias têxtil, cosmética e farmacêutica (Peixoto; Luz; Brito, 2016).

No solo da Caatinga foram encontrados e registrados fungos filamentosos dos gêneros: *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Pithomyces*, *Humicola*, *Myrothecium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Monodictys*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Scytalidium*, *Staphylotrichum* e *Stillbella*. Salienta-se que houve predominância dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que são comumente encontrados em ambientes desérticos (Oliveira, 2013).

Sendo uma enorme parcela da riqueza genética da Caatinga exclusiva desse bioma, ela passa a ser um importante local para bioprospecção (Melo, 2016), termo conhecido como a maneira de se retirar o valor econômico da biodiversidade com base na exploração sistemática de organismos com potencial econômico e que podem culminar no desenvolvimento de produtos (Saccaro Júnior, 2011). Na indústria farmacêutica, os fungos recebem notório destaque, principalmente na produção de antimicrobianos, imunossupressores e agente hipocolesterolemizante. De modo que são uma rica fonte de compostos bioativos, que podem apresentar novas ações em busca de suprir uma necessidade tão urgente de novas descobertas quando se trata de antimicrobianos (Oliveira, 2013). Pois apesar do grande número de fungos e bactérias encontrados no bioma Caatinga, os micro-organismos ainda têm seu potencial biotecnológico pouco explorado (Costa et al., 2014).

Diante disso, acessar e estudar a riqueza fúngica do bioma Caatinga pode resultar na descoberta de novas aplicabilidades desses organismos e a hipótese dessa pesquisa é que os extratos produzidos por fungos filamentosos não liquenicos isolados de líquens da Caatinga de Alagoas apresentam atividades antimicrobiana e antioxidante com perspectivas a aplicações biotecnológicas nessas temáticas.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Trata-se de estudo experimental, de enfoque *in vitro*, desenvolvido no Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – LABMIP, em parceria com a Central Analítica do Núcleo de Ciências Exatas – CA-NCEX e o laboratório de Farmacologia e Imunidade – LAFI, todos da Universidade Federal de Alagoas - UFAL

4.2. Origem e cultivo dos fungos filamentosos da Caatinga

Foi utilizado um acervo de 35 fungos filamentosos previamente isolados de amostras de líquens de uma região preservada, a Reserva da Tocaia e outra de impacto antrópico, a Serra do Gugí, ambas do município de Santana do Ipanema, região do semiárido alagoano. Os isolados de fungos filamentosos da Caatinga, pertencentes ao LABMIP estavam criopreservados em glicerol (20%), armazenados em ultrafreezer a -80°C, de modo que foram descongelados em temperatura ambiente. Os isolados foram reativados em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose, o qual fora vertido manualmente em placas de Petri (60x15mm) recobrimdo toda sua base, utilizando para isso, em média 10 mL de meio de cultura em cada placa.

Após a solidificação do meio de cultura, cada placa de Petri recebeu um disco do fungo utilizando-se uma alça microbiológica, adequadamente flambada e resfriada. Assim como cada placa fora sinalizada com os códigos fúngicos, a data do procedimento e as iniciais de quem o executou. As placas de Petri foram devidamente vedadas para evitar o risco de contaminação e, em seguida, foram incubadas em estufa de 30°C por 7 dias para análise da pureza e transferência dos isolados para os ensaios de produção de antimicrobianos.

4.3 Identificação dos fungos

4.3.1 Identificação macroscópica e microscópica de fungos filamentosos

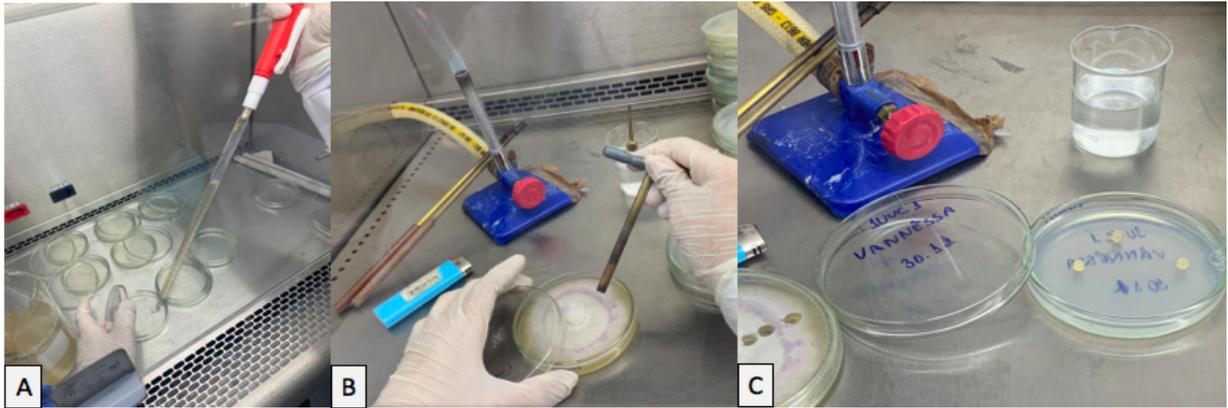
As culturas das amostras que apresentaram atividade biológica foram observadas em suas características macromorfológicas: aspecto da borda, coloração da colônia e textura da superfície. Ademais, os fungos filamentosos foram submetidos à técnica de microcultivo, o que permitiu a visualização microscópica das estruturas reprodutivas. Para tanto, utilizou-se uma alça de inoculação para remover uma alíquota de cada colônia e transferir para as extremidades de um quadrado pequeno (1 x 1 cm) de meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose, depositado sobre uma lâmina e, logo em seguida, foi posicionada uma lamínula sobre o meio de cultura. Todo esse conjunto situava-se dentro de uma placa de Petri e sobre um papel filtro previamente umedecido com solução salina, a fim de fornecer um ambiente úmido adequado ao crescimento fúngico. Em seguida, foram incubados a 25°C e visualizados no sétimo dia de crescimento.

4.4. Produção e extração dos metabólitos secundários

4.4.1. Produção dos metabólitos secundários fúngicos

Essa etapa foi executada em meio Ágar Czapek acrescido de glicose (2%), conforme Oliveira (2013), com pequena modificação. Após esterilização do material e do meio de cultura, utilizou-se pipeta de vidro de 20 mL, objetivando a padronização do volume nas placas de Petri (90x15mm). Na sequência, os isolados que haviam sido reativados foram, então, repicados para as placas de Petri com o meio de cultura já solidificado. Em cada placa foram adicionados três discos do fungo, cada um com 6mm de diâmetro, correspondente à medida do perfurador utilizado, espaçados de tal forma que desenhavam um triângulo. Para essa fase foram feitas seis réplicas, pois o intuito foi de se obter uma grande quantidade de biomassa produtora de extratos fúngicos (**Figura 4**). As placas de Petri foram incubadas em estufa bacteriológica sob temperatura de 30,0°C por 14 dias.

Figura 4: Ensaio de produção de biomassa fúngica de isolados da Caatinga, em meio Czapeck, acrescido de glicose (2%). (A) Pesquisadora vertendo, com auxílio de pipeta de 20 mL, o meio de cultura nas placas de Petri. (B) Repique do fungo com o uso de perfurador. (C) Distribuição dos discos de fungo desenhando um triângulo.



Fonte: a autora (2023).

4.4.2 Extração dos metabólitos fúngicos

Após 14 dias de crescimento dos fungos filamentosos e produção de pigmentos, foram utilizadas 6 placas com biomassa para a extração de metabólitos, onde cada fungo foi retirado das placas e transferido a um Erlenmeyer com solvente de extração. Para tanto, os micélios fúngicos com Ágar foram repartidos utilizando-se uma espátula esterilizada e transferidos para um Erlenmeyer e embebidos com 100 mL de acetato de etila PA, seguido de vedação com parafilme e protegidos com papel de alumínio para evitar a fotodegradação e foram armazenados em refrigeração em geladeira durante sete dias para posterior extração da fração de acetato de etila (Figura 5).

Figura 5: Visualização do processo de extração de metabólitos secundários produzidos por fungos da Caatinga. (A) Fungo crescido após 14 dias em meio de cultura Ágar Czapek, 2% de glicose; (B) Repartição e transferência dos micélios fúngicos para Erlenmeyer. (C) Acetato de etila (100 mL) sendo adicionado aos fungos. (D) Fungos repartidos, embebidos em acetato de etila e vedados com parafilme.



Fonte: a autora (2023).

4.4.3. Filtração, concentração e secagem dos extratos fúngicos

Passados os sete dias da extração dos metabólitos secundários em acetato de etila, eles foram submetidos à filtração com o auxílio de papel de filtro Whatman (200 μm), logo em seguida os Erlenmeyers com os metabólitos foram adequadamente vedados com parafilme e envolvidos com papel alumínio para impedir a fotodegradação dos pigmentos. Na sequência, as amostras foram submetidas à concentração dos extratos microbianos em evaporador rotativo acoplado à bomba de vácuo e temperatura de extração à temperatura ambiente. Dessa forma, os extratos já concentrados, foram transferidos para frascos pequenos esterilizados e acondicionados em freezer ($-20,0^{\circ}\text{C}$).

Figura 6: Visualização do esquema de filtração e concentração dos extratos fúngicos. (A) Passagem dos extratos juntamente com o acetato de etila, por filtragem, para outro Erlenmeyer. (B) Extratos pigmentados após filtragem.



Fonte: a autora (2023).

Os extratos fúngicos foram secos em dessecador acoplado à bomba de vácuo, os frascos foram pesados antes e após a secagem para obtenção da diferença de peso e, em seguida, os extratos foram ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO), padronizando-se a concentração final de 100 mg/mL, 50 mg/mL ou 25 mg/mL, de acordo com o rendimento. Os extratos foram filtrados em membranas de filtro de 0,22 μm e as amostras armazenadas em tubos eppendorf e mantidas em freezer ($-20,0^{\circ}\text{C}$), ao abrigo da luz.

4.5. Atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários fúngicos

4.5.1. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos fúngicos

O Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) foi realizado pelo método de disco difusão (DD) em meio de cultura padronizado Ágar Mueller-Hinton (MH) (NCCLS/CLSI, 2003), com o objetivo de avaliar a atividade dos extratos fúngicos contra *E. coli* (ATCC 11775), *P. aeruginosa* (isolado clínico) e *S. aureus* (ATCC 6538). As cepas

seguiram para padronização em espectrofotômetro (0,9 a 1,0 de absorbância a 620 nm de leitura), em solução salina 0,9%.

As placas de meio MH foram inoculadas com swab, em seguida, foram incluídos discos de papel de filtro esterilizados sobre o meio de cultura e foi impregnado na superfície do disco 10,0 µL dos extratos fúngicos produzidos anteriormente, na concentração de 1 mg/mL, com os discos equidistantemente distribuídos. O material foi incubado a 37,0 °C por 20 horas, em triplicata, e o halo de inibição foi avaliado.

Ressalta-se que o controle negativo utilizado foi o DMSO a 10% e os controles positivos foram discos de antimicrobianos padrões: penicilina 10U.I, ampicilina 10mcg, azitromicina 15mcg, piperacilina 110mcg, ceftazidima 30mcg, amicacina 30mcg, cloranfenicol 30mcg, gentamicina 10mcg e cefepime 30mcg.

4.5.2. Atividade antifúngica contra *Candida albicans* (ATCC 10231)

O ensaio de sensibilidade a antifúngicos foi realizado pelo método de disco difusão (DD) em meio de cultura padronizado Ágar Sabouraud Dextrose, com o objetivo de avaliar a atividade dos extratos fúngicos contra *C. albicans* (ATCC 10231). O bioensaio aconteceu de forma semelhante ao que foi descrito no item anterior, a diferença ocorreu somente no uso da substância utilizada como controle positivo, que foi o antifúngico de ação conhecida, a nistatina (100.000 UI).

4.6. Ensaio qualitativo em meio líquido e avaliação da concentração inibitória mínima

Inicialmente avaliou-se o cultivo em meio líquido de forma qualitativa, com análise da atividade antimicrobiana em 2 concentrações (1000 e 500 µg/mL). Os extratos fúngicos com atividade antibacteriana e/ou antifúngica no ensaio qualitativo foram avaliados quanto à concentração inibitória mínima (CIM). Para tanto, as culturas de micro-organismos recém cultivadas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina 0,9%, padronizadas por meio da leitura da suspensão a 600 nm, de modo que a densidade óptica atingiu a absorbância entre 0,9 a 1,0. Foram avaliadas diferentes concentrações dos extratos fúngicos a fim de determinar a menor concentração onde não há crescimento microbiano. Ressalta-se, que as CIM registradas são as menores concentrações dos extratos onde não há crescimento visível de micro-organismos (Yang et al., 2020).

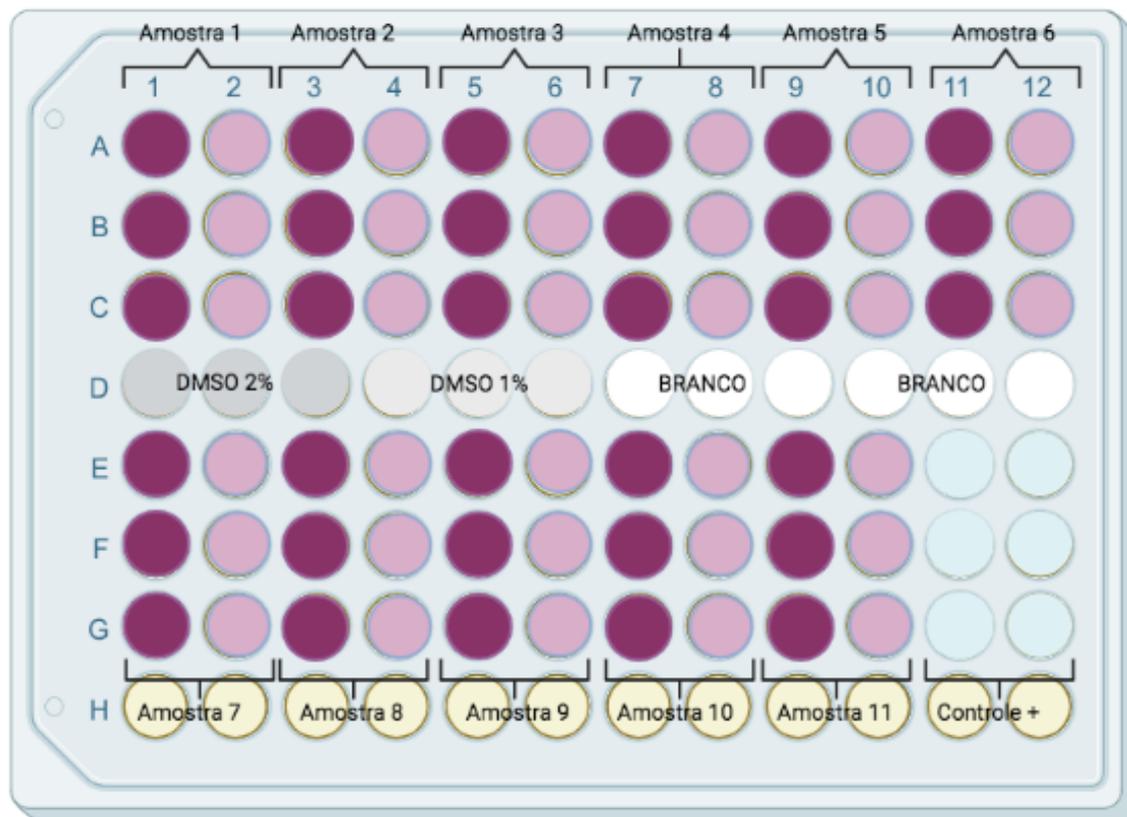
Aplicando o método de microdiluição, desenvolvido por Eloff (1998) e normatizado pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês CLSI *Clinical and Laboratory*

Standards Institute), o mais utilizado internacionalmente (Amparo et al., 2018), foi realizada uma avaliação preliminar onde todos os extratos produzidos foram adicionados em concentrações de 1000 µg/mL e 500 µg/mL, com o intuito de realizar uma triagem da possível atividade antimicrobiana e antifúngica direcionando as análises para ensaios em concentrações menores.

O preparo das soluções foi realizado em eppendorfs enumerados em 1 e 2 para facilitar o entendimento, no eppendorf 1 uma alíquota de 990µL de meio de cultura líquido (MH para cepas bacterianas e Sabouraud para levedura) foi adicionado à 10µL de cada extrato fúngico e foi homogeneizado em vórtex. Em seguida foi preparado o eppendorf 2, com 400µL de meio de cultura adequado para cada cepa utilizada, adicionado à 400µL da solução retirada do eppendorf 1, em seguida a solução foi homogeneizada em vórtex. Desta forma, o tubo 1 ficou com concentração de 1000 µg/mL enquanto o tubo 2, com 500 µg/mL, ainda sendo dois eppendorfs para cada extrato fúngico separadamente, foram preparados 68 tubos, além dos eppendorfs contendo DMSO nas concentrações de 2% e 1%, que foram utilizados como diluentes dos extratos fúngicos e, portanto, foi preciso avaliar se sua composição poderia exercer atividade antimicrobiana, o que influenciaria a ação dos extratos fúngicos.

Utilizando uma pipeta, nos três primeiros poços (A, B e C) da primeira coluna, foi então adicionado um volume de 100 µL proveniente do eppendorf 1, enquanto nos três primeiros poços da segunda coluna foram adicionados 100 µL oriundos do eppendorf 2 e assim sucessivamente (Figura 7).

Figura 7: Esquema de ensaio de triagem em meio líquido, utilizando microplaca de 96 poços em concentrações de 1000 µg/mL (cor púrpura) e 500 µg/mL (cor lilás). Enquanto a cor cinza escura representa o DMSO 2%, a cor cinza representa o DMSO 1%, a cor branca representa o branco e a cor azul clara representa o controle positivo. Os poços em amarelo, da linha H, representam poços vazios.



Fonte: do autor

Foram adicionados 100 μL de DMSO 2% e 1%, ambos em triplicata, em seguida, 10 μL de micro-organismos em cada poço, exceto nos orifícios denominados "branco", que continham apenas 100 μL de meio de cultura específico. Destaca-se que cada cepa foi testada em placas individualizadas e como controle positivo para cepas bacterianas foi utilizado o antibiótico gentamicina, enquanto para levedura foi empregado o antifúngico anfotericina B. Na sequência, as microplacas foram incubadas a 35,0 $^{\circ}\text{C}$ por 22 horas em agitação. Logo após esse período, foram adicionados 20 μL da solução de TTC (cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio) a 0,125% em cada poço, e as microplacas foram novamente incubadas por mais duas horas, então foram realizadas as leituras visuais e em espectrofotômetro a 540 nm.

Foi repetida a técnica de microdiluição em poços, com diferentes concentrações de cada extrato fúngico selecionado. Nessa etapa foi preparado um eppendorf para cada extrato, contendo 980 μL de meio de cultura adequado e 20 μL do extrato, obtendo uma concentração de 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sendo 200 μL dessa solução acondicionada em cada poço da linha "A" da microplaca, conforme esquema exposto na figura 8. A partir da linha "B" até a linha "H" foram adicionados 100 μL de meio de cultura, em seguida, com o auxílio de uma pipeta

multicanal, foram realizadas as diluições seriadas retirando-se uma alíquota de 100 μL do conteúdo de cada poço e transferindo para os poços subsequentes da linha, obtendo as seguintes concentrações decrescentes: 2000 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 31,25 $\mu\text{g/mL}$ e 15,62 $\mu\text{g/mL}$. Na sequência, foram adicionados 10 μL do inóculo em cada poço, exceto nos denominados "branco" que continham 100 μL de meio de cultura, enquanto os controles negativos apresentavam 100 μL de meio e 10 μL inóculo, os controles positivos possuíam Gentamicina ou Anfotericina B e, por último, havia os poços com os controles do diluente utilizado no preparo dos extratos fúngicos, o DMSO em concentrações de 1% e 2%.

Figura 8: Esquema do ensaio de avaliação da concentração inibitória mínima dos extratos fúngicos em microplaca de 96 poços, nas concentrações de 2000 $\mu\text{g/mL}$ a 15,62 $\mu\text{g/mL}$.



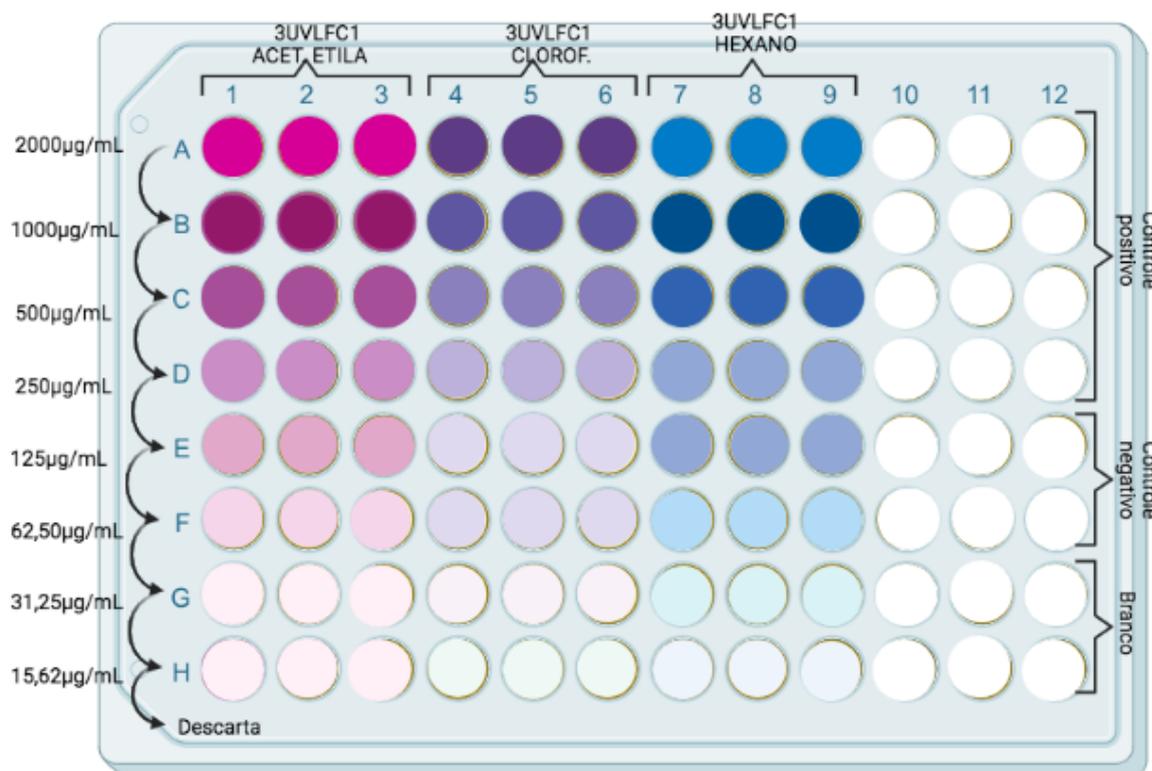
Fonte: do autor

As microplacas foram incubadas a 35,0 $^{\circ}\text{C}$ por 22 horas, seguido da adição de 20 μL da solução de TTC (cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio) a 0,125% em cada poço, e as microplacas foram novamente incubadas por mais duas horas e realizada leitura visual e em espectrofotômetro a 540 nm.

Na etapa subsequente os extratos foram fracionados, em processo de particionamento, em frações de acetato de etila, clorofórmica e hexânica e suas concentrações variaram de acordo com o rendimento de cada partição. Então, foi realizado o ensaio para determinar a CIM do extrato 3UVLFC1 em suas frações. As concentrações avaliadas foram: 2000 $\mu\text{g/mL}$,

1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL e 15,62 µg/mL. Todas as frações foram testadas em triplicata (Figura 9).

Figura 9: Esquema de ensaio de microdiluição em microplaca de 96 poços, do extrato 3UVLFC1 em frações de acetato de etila, clorofôrmica e hexânica, em concentrações de 2000 µg/mL a 15,62 µg/mL.



Fonte: do autor

4.7. Atividade antioxidante dos metabólitos secundários fúngicos

4.7.1. Atividade antioxidante pelo método DPPH

Ao aplicar o método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), foi utilizada uma microplaca de 96 poços, na qual foram adicionados 280 µL da solução de DPPH, sendo 3,2 mg de DPPH dissolvidos em 100 mL de metanol em 93 poços, enquanto nos três poços restantes foi adicionado o branco apenas com DMSO e metanol. Ademais, foi preparado o controle que consistiu em: 280 µL da solução de DPPH e 20 µL de DMSO 10%. Em seguida, 20 µL de cada amostra com diferentes diluições foram aplicadas nos poços (Pires et al., 2017).

Soluções de Ácido ascórbico (500 µg/mL), BHT - hidroxitolueno butilado (1000 µg/mL), ácido gálico (1000 µg/mL) foram utilizadas para o preparo das curvas padrão, a reação foi incubada durante 30 minutos a 37,0°C e a absorbância foi lida a 517 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A atividade antioxidante pelo método de DPPH foi avaliada através da % de descoloração do reagente DPPH, o qual possui coloração roxa e descolore à medida que é reduzido por algum agente antioxidante, como descrito na equação 1. Foi ainda calculado o EC₅₀, o qual representa a concentração de extrato fúngico efetiva que induz metade (50%) do efeito máximo da atividade antioxidante.

Eq. 1.
$$At\ DPPH\ \% = \left(\frac{Abs\ controle\ DPPH - Abs\ amostra}{x\ Abs\ controle\ DPPH} \right) \times 100$$

4.7.2. Atividade antioxidante pelo método FRAP

Foi utilizado também o método *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), o qual utiliza o reagente 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) como substrato e que se respalda na redução de ferro férrico (Fe³⁺) a ferro ferroso (Fe²⁺) na presença de antioxidante. A solução de FRAP é composta por 50 mL de tampão de acetato de sódio, 5 mL da solução TPTZ e 5 mL da solução cloreto férrico. Em microplaca de 96 poços a solução FRAP foi inoculada em todos os poços, em seguida foi adicionado o branco (15µL de água estéril, 20 µL de DMSO 10% e 265 µL de solução FRAP). Nos poços seguintes foram adicionadas as amostras. Foram utilizadas três placas, a primeira com a concentração de 2000 e a segunda com 500 µg/mL e a terceira para a curva padrão, com o ácido ascórbico (500 µg/mL), BHT (1000 µg/mL) e o ácido gálico (1000 µg/mL). A reação foi incubada durante 30 minutos a 37,0 °C e a absorbância foi lida a 595 nm em leitor de microplacas. A expressão dos resultados foi realizada conforme Urrea-Victoria et al. (2016).

4.8. Fracionamento dos extratos fúngicos e análise de infravermelho das frações

As análises foram realizadas no Laboratório de Química da Central Analítica do Núcleo de Ciências Exatas, local em que as amostras foram fracionadas em solventes de acetato de etila, clorofórmio e hexano, viabilizando novos ensaios para determinar a(s) possível(is) fração(ões) com maior bioatividade. Seguindo uma ordem de polaridade, do menos polar para o mais polar dos solventes, inicialmente, em um recipiente contendo o extrato seco foram adicionados uma parte do hexano (2-2,5 mL) e levado para um banho ultrassônico, no qual permaneceu sob sonicação por 30 segundos. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado, com papel de filtro, e o procedimento de extração foi repetido mais duas vezes. O mesmo método foi executado com os demais solventes, procedendo com a extração com clorofórmio no mesmo recipiente contendo o extrato residual obtido da extração com hexano, adicionando o solvente e filtrando o sobrenadante após ser condicionado no banho ultrassônico. Por fim, seguiu-se com a extração usando acetato de etila. As frações foram transferidas para um dessecador, no qual os solventes foram removidos sob pressão reduzida.

As informações moleculares dos extratos foram obtidas através de análise por espectroscopia de infravermelho (Cary 660). Tais informações correspondem às propriedades estruturais dos metabólitos componentes dos extratos preparados dos microrganismos, como ligações e funcionalidades químicas (grupos químicos) presentes em suas moléculas. Esta avaliação consistiu na análise de espectros de infravermelho cuja aquisição se deu pela técnica de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), a fim de identificar os tipos de ligações dos compostos presentes nas frações analisadas

As ligações químicas e grupos funcionais são identificados no espectro por meio do padrão espectral característico de cada grupo, definido pela frequência da radiação infravermelha que é absorvida e por meio da feição ou perfil dos picos gerados no espectro. Uma vez que a energia da radiação absorvida é quantizada, ou seja, possui valores fixos e definidos para cada grupo absorvente, é possível prever com apreciável precisão a presença de um grupo químico ou ligação em uma molécula a partir do seu espectro de infravermelho, o que torna esta técnica uma ferramenta analítica útil para analisar aspectos químicos de compostos e misturas. No presente caso, ela foi aplicada para determinar a natureza química dos metabólitos presentes nos extratos em termos dos grupos funcionais identificados.

4.9. Avaliação da citotoxicidade dos extratos fúngicos

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade dos extratos fúngicos que apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus* (ATCC 6538) foi realizado o bioensaio de seletividade para células mononucleares de sangue periférico (PBMC). A partir da amostra de sangue periférico humano de um doador voluntário (pesquisa aprovada em Comitê de Ética em Pesquisa sob CAAE: 67813823.8.0000.5013), as células mononucleares (linfócitos) foram isoladas por meio do método padrão de centrifugação por gradiente de densidade com Histopaque[®]. Após a separação, as células foram lavadas por duas vezes, com solução salina tamponada (PBS) e contadas em Câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas, 50 µL, em microplaca de 96 poços (10⁵ células/poço), tratadas com os extratos fúngicos, 50 µL, em concentrações que variaram de 2000 a 15,6 µg/mL e a microplaca foi incubada em estufa bacteriológica a 37,0 °C. Após 48 horas, foram adicionados 20 µL, em cada poço, do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-tetrazólio (MTT), a microplaca foi incubada por 4 horas a 37 °C. Em seguida, foi adicionado DMSO, 200 µL, em todos os poços, incubada por 20 minutos e a absorbância foi lida em espectrofotômetro de microplacas a 550 nm.

Todas as amostras foram plaqueadas em triplicatas e para o controle foram preparados poços com o meio de cultura Roswell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de L-glutamina, 1% (v/v) de piruvato e 1% (v/v) de aminoácido, substituindo os extratos fúngicos e DMSO 10 e 20%, para comparação e verificação de inatividade desse solvente.

PRODUTO

1. **Perfil antimicrobiano e antioxidante de metabólitos de fungos filamentosos isolados de líquens da Caatinga** (submetido, segundo as normas da Anais da Academia Brasileira de Ciências. Qualis A2 e Fator de Impacto 1.811 em 2021).

5.1 PRODUTO 1

Perfil antimicrobiano e antioxidante de extratos de fungos filamentosos isolados de líquens da Caatinga

Vannêssa Rodrigues Teles Maia^{1,2} (<https://orcid.org/0009-0009-7521-5253>), Emanuely Beatriz Tenório Sampaio¹ (<https://orcid.org/0000-0002-2174-5197>), Mayanne Karla da Silva¹ (<https://orcid.org/0000-0002-0292-3648>), Magna Suzana Alexandre Moreira³ (<https://orcid.org/0000-0002-9979-1994>), Cledna Kaline dos Santos Duarte¹ (<https://orcid.org/0000-0002-4455-9047>), Maria Nicolle Pereira da Silva¹ (<https://orcid.org/0000-0003-3573-9369>), Marcela Eugenia da Silva Cárceres⁴ (<https://orcid.org/0000-0002-5612-1309>), Janice Gomes Cavalcanti⁴, (<https://orcid.org/0000-0003-1931-7174>), Aline Cavalcanti de Queiroz¹ (<https://orcid.org/0000-0002-6362-2726>), Adeildo Júnior de Oliveira⁵ (<https://orcid.org/0000-0002-8312-6471>), Alysso Wagner Fernandes Duarte^{1,2} (<https://orcid.org/0000-0001-9626-7524>)

¹ Complexo de Ciências Médicas e Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas, *Campus* Arapiraca. Avenida Manoel Severino Barbosa Bom Sucesso, Arapiraca, AL, Brazil, CEP 57309-005.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas – PPGCM

³ Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil; CEP:57072-900

⁴ Departamento de Biociências – Universidade Federal de Sergipe. *Campus* Itabaiana; Av. Ver. Olímpio Grande - Sítio Porto, Itabaiana, SE, Brazil, CEP 49500-000.

⁵ Central Analítica – NCEx. Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Avenida Manoel Severino Barbosa Bom Sucesso, Arapiraca, AL, CEP:57309-005.

Running title: Antioxidant and antimicrobial activity by Caatinga fungi

Academy Section AABC: Biological sciences

*Corresponding author: Tel.: +55 82 99672-1116. alysso.duarte@arapiraca.ufal.br

RESUMO

O objetivo da pesquisa foi avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante de metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos isolados de líquens do bioma Caatinga. Os isolados foram cultivados em meio sólido Ágar Czapeck e realizada a extração de metabólitos secundários intra e extracelulares com acetato de etila. A determinação da atividade antimicrobiana foi pelo método de difusão em disco e microdiluição em caldo Sabouraud e o potencial de inibição antioxidante foi avaliado utilizando os métodos empregando o radical DPPH e o poder de redução do ferro (FRAP). De 35 fungos avaliados, quatro (11%) apresentaram atividade antimicrobiana e seis (17%) com perfil antioxidante. O extrato de *Penicillium* sp. 2UVC8, seguido do *Fusarium* sp. 3UVLFC1, demonstraram as melhores atividades contra *Staphylococcus aureus*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 125 µg/mL e 250 µg/mL, respectivamente. As frações do extrato de *Fusarium* sp. 3UVLFC1 de acetato de etila, clorofórmica e hexânica, exibiram potencial promissor contra *S. aureus*. Na avaliação da atividade antifúngica, o extrato de *Fusarium* sp. 4UVLFC2 exibiu CIM = 31,2 µg/mL, frente à *C. albicans*. Contudo, para as cepas de bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* nenhum extrato exibiu efeito inibitório. Na determinação antioxidante, o extrato de *Fusarium* sp. 4LCEM2 obteve resultado promissor, com $CE_{50} = 180 \mu\text{g/mL}$. Destarte, os resultados evidenciaram atividade antimicrobiana promissora para *S. aureus*, como também potencial antioxidante. Tais resultados exaltam a riqueza da biodiversidade da Caatinga e a prospecção de seus micro-organismos, que são fontes de metabólitos com alto potencial biotecnológico.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Prospecção. Semiárido.

INTRODUÇÃO

Com o aumento da resistência antimicrobiana nos últimos anos, muitos micro-organismos estão envolvidos com um crescente número de infecções com desfecho fatal, principalmente em casos de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), aqui destacam-se *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (WHO, 2017; GOMEZ et al, 2022). Outrossim, há bactérias como a *Escherichia coli* e fungos como *Candida albicans*, que são potentes agentes patogênicos para o homem e para os animais (KAPER, 2004). Ademais todos esses micro-organismos são comensais, habitam a microbiota humana, mas quando há desequilíbrio da imunidade tornam-se patógenos perigosos aos indivíduos (VILA et al., 2020).

A Organização das Nações Unidas (ONU) publicou em 2017 uma lista apresentando 12 famílias de bactérias ameaçadoras à saúde humana, assim essa organização intergovernamental alertou que a pesquisa e o desenvolvimento de novas fontes de compostos com atividade antimicrobiana são urgentes (WHO, 2017). Comprovadamente, a resistência

antimicrobiana (RAM) tornou-se um problema mundial de saúde pública e atinge diversas áreas, como a saúde, agricultura e meio ambiente (CDC, 2022). Essa problemática acontece quando bactérias e fungos sofrem pressões seletivas e modificam-se com o passar do tempo e, com isso, não respondem mais a antimicrobianos aos quais anteriormente eram susceptíveis (WHO, 2021). Fato bastante preocupante, pois possibilitou o crescimento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, levando a um aumento também no número de mortes no mundo, com uma previsão assustadora de dez milhões de mortes no ano de 2050 (PATERSON, 2020). Problema agravado pela grande diminuição na descoberta de novas drogas (LEWIS, 2020).

Há várias causas para a RAM, dentre elas destacam-se: modificação genética dos organismos, uso irracional de fármacos antimicrobianos na medicina, veterinária, avicultura e agricultura, automedicação (ZHAO et al, 2022), como também indivíduos que não seguem as recomendações médicas adequadas e, assim, não cumprem todo o tratamento (LEWIS, 2020; RAHMAN, 2020). Nessa conjuntura, a utilização de fontes naturais para a busca de novos antimicrobianos é de suma importância. A aplicação de substâncias naturais com o objetivo de combater doenças vem sendo aplicada desde a antiguidade, contudo produtos naturais advindos de fungos da Caatinga ainda é uma fonte pouco explorada, diante da diversidade e riqueza dos fungos desse bioma (RAHMAN, 2020; SILVA et al, 2020).

Por outro lado, metabólitos fúngicos têm sido reportados com atividade antioxidante, a qual é caracterizada pela capacidade de reduzir radicais livres e impedir que eles danifiquem moléculas importantes do organismo humano, como o DNA (ROMÃO et al, 2022). Os radicais livres são moléculas instáveis produzidas por reações comuns do organismo, conhecidas como espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (UJAM et al., 2021).

As EROs desempenham papéis fisiológicos como regulação do crescimento celular, fagocitose, ação no sistema imune, sinalização intracelular, produção de energia e também atuação na formação de substâncias biológicas (HADIDI et al., 2022). Contudo, quando a geração de EROs torna-se maior do que a capacidade antioxidante celular, acontece uma condição designada estresse oxidativo, sendo bastante prejudicial às células do organismo (MUNTEANU, 2021), uma vez que causam danos oxidativos em biomoléculas importantes como ácidos nucleicos e lipídeos, participação em processos celulares como a apoptose, provocando processos patológicos e degenerativos no organismo (UJAM et al., 2021).

E nessa perspectiva, antioxidantes provenientes de fontes naturais possuem diversas vantagens, a iniciar pela sua forma de produção, sendo mais sustentável ao meio ambiente,

além disso como os micro-organismos apresentam características diferentes e metabolismos específicos, o desenvolvimento de resistência aos seus fármacos são mais difíceis de acontecer, como também há maior probabilidade de ação sinérgica dos produtos naturais, aumentando assim os efeitos antimicrobianos (ZHAO et al, 2022) e antioxidantes (GARÁDI et al, 2021).

Assim, fungos que habitam ambientes pouco explorados e com aspectos limitantes como a Caatinga, podem apresentar capacidade metabólica adaptativa diferenciada e serem interessantes na busca por novas biomoléculas. O bioma Caatinga é caracterizado por seu clima semiárido, altas temperaturas e baixa pluviosidade, contudo é um local de grande riqueza biológica e pouco explorado cientificamente, mas que já rendeu estudos com resultados promissores sobre organismos produtores de compostos naturais com atividades antimicrobianas a partir de extratos de plantas (DANTAS-MEDEIROS, 2020), óleos essenciais vegetais (PEREIRA; TEIXEIRA; MEDEIROS, 2021), e metabólitos microbianos (MOURA et al., 2021). Porém, estudos de perfil antioxidante e antimicrobiano de extratos fúngicos de organismos isolados desse ambiente ainda é pouco reportado na literatura. Visando essa riqueza natural proveniente da Caatinga, o objetivo deste estudo foi prospectar atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos de fungos filamentosos isolados de líquens.

MATERIAIS E MÉTODOS

Origem dos fungos filamentosos

Em 2019 foram coletadas amostras de líquens da Caatinga, sendo retirados de uma região preservada, a Reserva da Tocaia e outra de impacto antrópico, a Serra do Gugi, ambas do município de Santana do Ipanema, região do semiárido alagoano. As amostras foram utilizadas no isolamento de fungos filamentosos em meios de cultura: extrato de malte, ágar malte levedura e ágar Sabouraud, todos suplementados com antibiótico cloranfenicol.

Os isolados de fungos filamentosos pertencem ao Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - LABMIP da Universidade Federal de Alagoas - UFAL, local onde estavam criopreservados em glicerol 20%, armazenados em ultrafreezer a -80 °C. Desta forma, foram reativados em placas de Petri (60x15mm) com meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose e incubados em estufa bacteriológica a 30°C, por 7 dias para análise da pureza e transferência dos isolados para os ensaios de produção de metabólitos secundários.

Em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos, a atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA foi cadastrada (A286015) no SisGen.

Produção e extração dos metabólitos secundários

Os fungos foram cultivados em meio de cultura Ágar Czapek acrescido com 2% de glicose em placas de Petri (90x15mm), conforme Oliveira, (2013), com modificação. Cada placa de Petri foi padronizada com volume de 20 mL do meio de cultura, possibilitando as mesmas condições de crescimento e uniformização na produção dos extratos. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30,0°C por 14 dias, visando a indução da produção de metabólitos por aumento do tempo de incubação. Em seguida, a biomassa total (fungo acrescido do meio) foi transferida e acondicionada em Erlenmeyer e embebida em acetato de etila PA (C₄H₈O₂) e incubada em geladeira (8°C), durante sete dias para extração dos metabólitos intracelulares e extracelulares e a biomassa de 6 placas de Petri foi embebida em 100 mL de acetato de etila PA.

Após essa etapa, foi realizada a filtração do sobrenadante com papel de filtro Whatman e os extratos de acetato de etila foram concentrados em evaporador rotativo, em temperatura ambiente, para a remoção da fração do solvente. Em seguida, as amostras foram levadas ao dessecador, visando a secagem dos extratos. Logo após, as amostras foram ressuspensas em dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, padronizando-se a concentração final de 100 mg/mL ou 25 mg/mL a depender do rendimento, seguido de filtração em membrana de filtração de 0,22 µm e, assim, os extratos foram submetidos às análises.

Atividade antimicrobiana dos metabólitos secundários fúngicos

Micro-organismos

Foram utilizadas cepas padrão de bactérias *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e cepas padrão da levedura *Candida albicans* (ATCC 10231). Sendo os inóculos padronizados em espectrofotômetro (0,9 a 1,0 de absorbância a 620 nm de leitura).

As cepas padrão foram gentilmente cedidas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, divisão de microbiologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Inicialmente foi realizado um screening com os 35 extratos para avaliação qualitativa do perfil antimicrobiano, por meio do método de Disco Difusão (DD). Os extratos foram submetidos a ensaios em meio caldo Mueller Hinton, para as bactérias, e caldo Sabouraud para *C. albicans* e 2 concentrações foram avaliadas (1.000 e 500 µg/mL). Aqueles extratos que tiveram ação antimicrobiana foram submetidos ao ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração de antibiótico, na qual não há crescimento visível de micro-organismos (YANG et al., 2020). Assim, foi aplicado o método de microdiluição em caldo, desenvolvido por Eloff (1998) e normatizado pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês CLSI *Clinical and Laboratory Standards Institute*), o mais utilizado internacionalmente (AMPARO et al, 2018).

Para a realização desta etapa foi preparado um tubo eppendorf para cada extrato fúngico, contendo 980 µL de meio de cultura adequado e 20 µL do extrato, obtendo-se uma concentração de 2000 µg/mL, sendo 200 µL dessa solução acondicionada em cada poço da linha "A" da microplaca.

A partir da linha "B" até a linha "H" foram adicionados 100 µL de meio de cultura, em seguida, com o auxílio de uma pipeta multicanal, foram realizadas as diluições seriadas retirando-se uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada poço e transferindo para os poços das linhas subsequentes, obtendo as seguintes concentrações decrescentes: 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL e 15,625 µg/mL. Na sequência, foram adicionados 10 µL do inóculo em cada poço, exceto nos denominados "branco" que continham 100 µL de meio de cultura, enquanto os controles negativos apresentavam 100 µL de meio de cultura e 20 µL inóculo, os controles positivos possuíam Gentamicina para o ensaio com bactéria ou Anfotericina B para o ensaio com levedura e, por último, havia os poços com os controles do diluente utilizado no preparo dos extratos fúngicos, o DMSO em concentrações de 1% e 2%.

As microplacas foram incubadas a 35,0 °C por 22 horas, seguido da adição de 20 µL da solução de TTC (cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio) a 1 % em cada poço, e as microplacas foram novamente incubadas por duas horas. Após, foram realizadas as leituras visual e espectrofotômetro a 540 nm.

Os extratos fúngicos com melhores perfis de atividade antimicrobiana foram submetidos ao processo de fracionamento, viabilizando a continuidade dos experimentos, foi a amostra 3UVLFC1, em frações de acetato de etila (25 mg/mL), clorofórmica (25 mg/mL) e hexânica (100 mg/mL). Desse modo foi executado o bioensaio da CIM com o intuito de observar a atividade antimicrobiana em cada fração separadamente, seguindo a mesma metodologia descrita.

Ensaio de seletividade para células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

A partir de uma amostra de sangue periférico humano (pesquisa aprovada em Comitê de Ética em Pesquisa sob CAAE: 67813823.8.0000.5013), as células foram isoladas por meio do método padrão de centrifugação por gradiente de densidade com Histopaque[®]. Após a separação, as células foram lavadas por duas vezes, com solução salina tamponada (PBS) e contadas em Câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas, 50 µL, em microplaca de 96 poços (10⁵ células/poço), tratadas com os extratos fúngicos, 50 µL, em concentrações que variaram de 2000 a 15,6 µg/mL e a microplaca foi incubada em estufa bacteriológica a 37 °C. Após 48 horas, foram adicionados 20 µL, em cada poço, do sal brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-tetrazólio (MTT), a microplaca foi incubada por 4 horas a 37 °C. Em seguida, foi adicionado DMSO, 200 µL, em todos os poços, incubada por 20 minutos e a absorbância foi lida em espectrofotômetro de microplacas a 550 nm.

Todas as amostras foram plaqueadas em triplicatas e para o controle foram preparados poços com o meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) substituindo os extratos fúngicos e DMSO 10 e 20%, para comparação e verificação de inatividade desse solvente.

Atividade Antioxidante

Inicialmente foi realizado um screening com os 35 extratos para avaliação qualitativa do perfil antioxidante. Os extratos foram submetidos a ensaios por meio dos métodos DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e 2 concentrações foram avaliadas (2.000 e 500 µg/mL). Aqueles extratos que tiveram ação antioxidante foram submetidos a novos ensaios em concentrações menores.

Método FRAP

O ensaio antioxidante de determinação do poder redutor do íon ferro foi realizado de acordo com a metodologia de Urrea-Victoria et al (2016) com adaptações. Para iniciar, foram

preparados oito tubos eppendorf para cada um dos extratos fúngicos selecionados, com a finalidade de obter soluções com as seguintes concentrações: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,61 µg/mL e 7,8 µg/mL. Para a inoculação das microplacas de 96 poços foram adicionados, em cada poço, os seguintes volumes de substâncias: 15 µL de água destilada mais 265 µL de solução FRAP e 20 µL de amostra teste, totalizando 300 µL de volume em cada poço. Ressalta-se que os poços utilizados para o branco continham 20 µL de DMSO 10% em substituição ao volume de amostra. Destaca-se, ainda, que todas as amostras e suas diluições foram feitas em triplicata. Utilizou-se como padrões o ácido gálico (1000 µg/mL) e ácido ascórbico (1000 µg/mL).

Método DPPH

Em relação ao ensaio de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), foi utilizada uma microplaca de 96 poços, na qual foi adicionado 280 µL da solução de DPPH (3,2 mg de DPPH; 100 mL de metanol) em 93 poços, enquanto nos três poços restantes foi preparado o branco com DMSO 10% e metanol (Pires et al., 2017). Ademais, foi preparado o controle que consistiu em: 280 µL da solução de DPPH e 20 µL de DMSO 10%. Em seguida, 20 µL de cada amostra em diferentes diluições foram adicionadas aos poços, com exceção aos poços referentes ao branco e controle. Soluções de ácido ascórbico, BHT - hidroxitolueno butilado e ácido gálico foram utilizadas para o preparo das curvas padrão, a seguir a reação foi incubada durante 30 minutos a 37°C e a absorbância foi lida a 517 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Os resultados das atividades antimicrobiana e antioxidante foram analisados por meio da média das absorbâncias obtidas através da leitura espectrofotométrica e desvio padrão. Enquanto a análise estatística descritiva e de ajuste sigmoide da capacidade antioxidante em relação ao logaritmo das concentrações dos extratos (CHEN et al, 2013) para obtenção do cálculo da concentração efetiva 50% (CE₅₀), foi obtida utilizando o *software* Prism GraphPad 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Fracionamento dos extratos com perfil antioxidante

Os extratos fúngicos foram fracionados em solventes de acetato de etila, clorofórmio e hexano, viabilizando novos ensaios para determinar a(s) possível(is) fração(ões) com maior bioatividade. Seguindo uma ordem de polaridade, do menos polar para o mais polar dos solventes, inicialmente, em um recipiente contendo o extrato seco foram adicionados uma parte do hexano (2-2,5 mL) e levado para um banho ultrassônico, no qual permaneceu sob

sonicação por 30 segundos. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado, com papel de filtro, e o procedimento de extração foi repetido mais duas vezes. O mesmo método foi executado com os demais solventes, procedendo com a extração com clorofórmio no mesmo recipiente contendo o extrato residual obtido da extração com hexano, adicionando o solvente e filtrando o sobrenadante após ser condicionado no banho ultrassônico. Por fim, seguiu-se com a extração usando acetato de etila. As frações foram transferidas para um dessecador, no qual os solventes foram removidos sob pressão reduzida.

Identificação dos isolados de interesse

As culturas das amostras que apresentaram atividade biológica foram observadas em suas características macromorfológicas: aspecto da borda, coloração da colônia e textura da superfície. Ademais, os fungos filamentosos foram submetidos à técnica de microcultivo, o que permitiu a visualização microscópica das estruturas reprodutivas.

Com uma alça de inoculação foi possível remover uma alíquota de cada colônia e transferir para as extremidades de um quadrado (1x1 cm) de meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose, depositado sobre uma lâmina e, logo em seguida, foi posicionada uma lamínula sobre o meio de cultura. Todo esse conjunto situava-se dentro de uma placa de Petri e sobre um papel filtro previamente umedecido com solução salina, a fim de fornecer um ambiente úmido adequado ao crescimento fúngico. Em seguida, foram incubados a 25°C e visualizados no sétimo dia de crescimento.

Análise da composição química dos extratos fúngicos por Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Com o objetivo de obter os espectros dos extratos fúngicos, foram realizadas medidas em Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), modelo Cary 660 (Agilent, California), acoplado ao acessório de reflectância total atenuada (ATR), equipado com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). Os extratos foram depositados sobre o cristal do acessório do ATR, prensadas e, assim, foi realizada a aquisição dos espectros com 48 varreduras por amostra, utilizando a faixa de 650 a 4000 cm^{-1} , aplicando resolução de 4 cm^{-1} . O registro dos espectros foi realizado com o *Software Resolutions Pro*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção e rendimentos dos extratos e identificação dos fungos

A produção dos metabólitos secundários fúngicos resultou em 35 extratos de diferentes fungos filamentosos da Caatinga, com rendimento variando de 45 mg a 236,22 mg (**Tabela 1**). O aspecto visual dos extratos fúngicos variou de amarelo (51,6%) a transparente (3,2%), conforme representado na **figura 1**.

Nos ensaios foram utilizados os fungos provenientes das amostras de líquens: LC1; LC2; LC3; LC4; LC5; LC6; LC7; LC8 e LC10, a maioria deles foi identificada em relação à espécie, com exceção ao LC1, sendo todos caracterizados por serem cosmopolitas de regiões tropicais (LIU, 2019). As espécies dos líquens são: *Xanthoparmelia plittii* (LC2, LC3 e LC7); *Peltula clavata* (LC4); *Dirinaria appplanata* (LC5) presente em regiões tropicais; *Ramboldia* sp. (LC6); *Peltula euploca* (LC8) e *Ramalina peruviana* (LC10).

Tabela 1. Rendimento de produção e caracterização dos extratos de fungos isolados de líquens da Caatinga: líquen de isolamento, identificação fúngica, código do isolado, coloração e rendimento de produção de extrato.

Liquen Espécie (código)	Identificação do fungo (microscopia)	Código do isolado	Coloração do extrato	Rendimento (mg)
**N.I. (LC1)	<i>Fusarium</i> sp.	3UVLFC1	amarelo claro	152,00
	-*	1UVC1	amarelo claro	113,00
	-*	5UVLFC1	bege	51,00
	-*	4UVLFC1	espectro bege	55,00
	<i>Penicillium</i> sp.	2LCEM1	amarelo claro	77,00
	<i>Penicillium</i> sp.	2LCL1	marrom claro	236,00
	<i>Cladosporium</i> sp.	3LCL1	amarelo claro	92,00
<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale (LC2)	-*	ALC2	amarelo claro	83,00
	-*	2UVLFC2	lilás claro	57,00
	-*	4UVLFC2	marrom escuro	132,00
	<i>Aspergillus</i> sp.	7UVLFC2	amarelo escuro	77,10
	-*	1UVLFC2	laranja	79,00
	<i>Fusarium</i> sp.	4LCEM2	amarelo escuro	236,22
	-*	3UVLF2	laranja	86,00
	-*	5UVFLC2	amarelo claro	84,00
	-*	JLC2	bege	87,00
<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale LC3	-*	1UVCLFC3	marrom escuro	70,00
	<i>Penicillium</i> sp.	3UVLFC3	amarelo	145,00
	-*	2UVLFC3	transparente	71,00
	<i>Fusarium</i> sp.	ALC3	laranja	140,00
	<i>Penicillium</i> sp.	4UVLFC3	bege rosê	85,00
<i>Peltula clavata</i> (Kremp.) Wetmore (LC4)	-*	1UVLFC4	amarelo escuro	109,00
	-*	5UVLFC4	vermelho	64,00

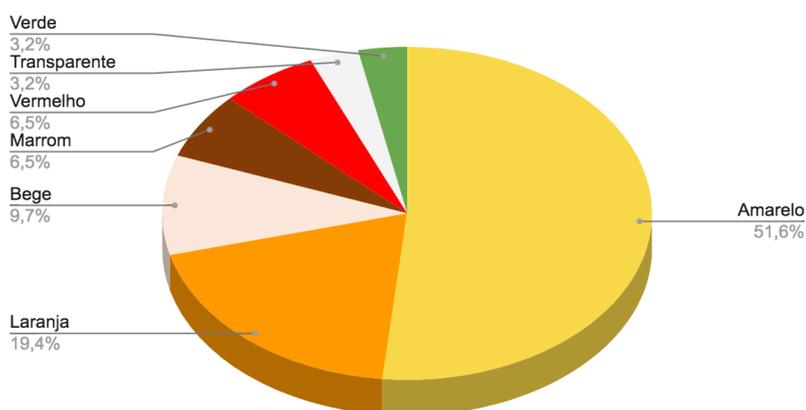
	-*	2UVLFC4	vermelho claro	46,00
<i>Dirinaria applanata</i> (Fée) D.D. Awasthi (LC5)	-*	GLC5	verde musgo	78,00
	-*	1UVLFC5	amarelo	45,00
	<i>Penicillium</i> sp.	11LCL5	amarelo	113,00
<i>Ramboldia</i> sp. (LC6)	-*	PLC6	amarelo	89,00
<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale (LC7)	<i>Alternaria</i> sp.	3UVLFC7	laranja	108,00
	<i>Alternaria</i> sp.	4UVLFC7	marrom escuro	205,00
	-*	1UVLFC7	laranja escuro	55,00
	-*	5UVLFC7	amarelo claro	95,00
<i>Peltula euploca</i> (Ach.) Poelt (LC8)	<i>Penicillium</i> sp.	2UVC8	laranja claro	207,00
<i>Ramalina peruviana</i> Ach. (LC10)	-*	1UVLFC10	amarelo muito claro	91,00
	<i>Penicillium</i> sp.	3UVLFC10	espectro amarelo	69,00

(*) - : gênero não identificado; (**)N.I: não identificado.

Fonte: a autora (2023).

Figura 1. Coloração dos extratos de fungos isolados da Caatinga dos extratos fúngicos produzidos em meio de cultura Ágar Czapek e extraídos em acetato de etila. A) Quantitativo. B) Aspecto visual.

A)



B)



Fonte: do autor.

A **tabela 1** evidencia que houve predominância dos gêneros *Penicillium* e *Fusarium*, pois, dentre os fungos identificados, foram encontrados 7 *Penicillium*, 5 *Fusarium*, 2

Alternaria, 1 *Cladosporium* e 1 *Aspergillus*. Enquanto Clementino et al (2015), identificaram a prevalência do gênero *Aspergillus*, ao coletarem fungos filamentosos da Caatinga, na microrregião do Cariri paraibano. Ao passo que Oliveira et al (2013), relataram que *Aspergillus* e *Penicillium* foram os gêneros mais numerosos, em sua coleta na Caatinga, no estado de Pernambuco.

A fermentação dos fungos para a produção dos metabólitos foi realizada em meio Czapek, a escolha pelo meio de cultura sólido baseia-se na tentativa de mimetizar as características ambientais dos fungos isolados, como também de diminuir a suscetibilidade de contaminação bacteriana e prover maior possibilidade de concentração final de biomassa (SOCCOL et al, 2017; SANTOS et al, 2018; MOLELEKOA et al, 2021). Outrossim, VASSILEVA et al. (2021) apontam que os fungos requerem uma atividade de água baixa, por isso a fermentação em estado sólido é mais adequada ao seu cultivo, o contrário ocorre com bactérias, que seu requisito de atividade de água é maior e crescem mais em meio de cultura líquido.

Além da escolha do tipo de fermentação, o tempo foi outro critério avaliado para a produção dos extratos fúngicos, pois é um fator que influencia a produção de biomassa. Em situações de estresse, os fungos ativam seu sistema de defesa e iniciam a produção de compostos bioativos como forma de adaptação e sobrevivência (HAMEED et al, 2017; ZOU et al., 2020; JIANG et al., 2021). De acordo com EMRI et al. (2015) a maior produção de metabólitos secundários associa-se a um fenômeno de proteção denominado “Resposta ao stress ambiental” e está ligado a um grupo de genes que foi encontrado em diferentes espécies de fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium graminearu* e *Claviceps purpurea*.

Ademais, o solvente utilizado para a extração dos metabólitos intra e extracelulares foi o acetato de etila (C₄H₈O₂), pois sua polaridade viabiliza a captação de uma maior quantidade de compostos orgânicos, reportado em estudos anteriores, incluindo flavonoides, alcaloides, fenóis, terpenos e glicosídeos (CHAKRABORTY et al., 2021; SHARMA et al., 2016; SATARI et al., 2018).

Identificação macroscópica e microscópica de fungos filamentosos

A identificação dos fungos filamentosos da Caatinga foi baseada na combinação das características macro e micromorfológicas das culturas analisadas, considerando os caracteres taxonômicos de Alexopoulos et al. (1996), assim os nove isolados que apresentaram atividade biológica foram observados macroscopicamente e foi registrada uma variação na coloração

incluindo branco, marrom, branco com lilás, branco com marrom e cinza. Outrossim, foi notório que, durante a produção dos extratos fúngicos, após o procedimento de concentração das amostras houve intensificação da coloração das mesmas devido à remoção do solvente.

No que se refere à textura dos micro-organismos, 22,2% foram classificados como algodonosos, 33,3% como pulverulento e 44,4% como aveludado. Em relação à topografia, 33,3% possuíam bordas circulares, enquanto 66,6% tinham bordas irregulares.

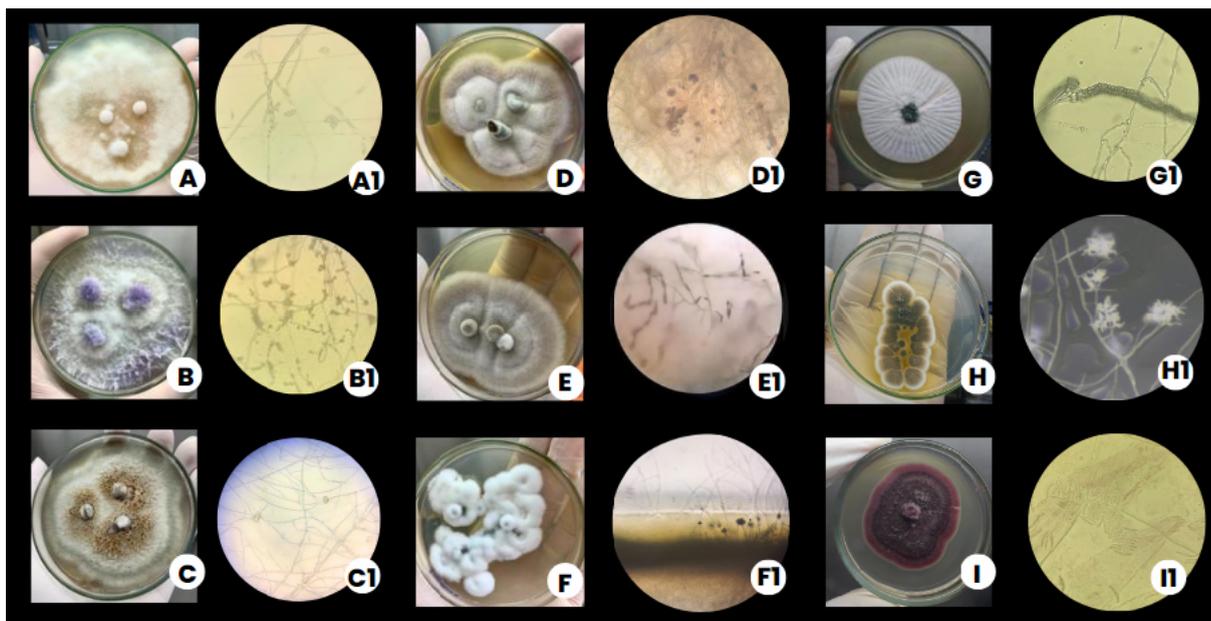


Figura 2: Fotografia exibindo aspectos morfológicos macroscópicos e fotomicrografias (objetiva de 40x) dos fungos filamentosos isolados da Caatinga em meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose, após 7 dias a 30 °C. A/A1) 3UVLFC1, B/B1) 2UVC8, C/C1) 4UVLFC2, D/D1) 3UVLFC7, E/E1) 4UVLFC7, F/F1) 7UVLFC2, G/G1) 2LCL1, H/H1) 11LCL5 e I/I1) 4LCEM2.

Fonte: a autora (2023).

Atividade antimicrobiana dos extratos fúngicos

A partir do *screening* com os 35 extratos fúngicos em 2 concentrações (2000 e 500 µg/mL) em DD (Figura 3) e em microdiluição em caldo (1000 e 500 µg/mL), realizou-se a seleção das amostras que foram para o ensaio de microdiluição em caldo em concentrações decrescentes (2000 µg/mL até 15,62 µg/mL), então foi possível constatar que os extratos fúngicos dos isolados *Penicillium* sp. 2UVC8, *Fusarium* sp. 3UVLFC1 e *Penicillium* sp. 11LCL5 demonstraram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 6538), enquanto o extrato fúngico 4UVLFC2 (N.I), exibiu atividade contra *C. albicans* (ATCC 10231), evidenciando a potencialidade dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos filamentosos da Caatinga (Tabela 2).

O extrato de *Fusarium* sp. 3UVLFC1 apresentou potencial inibitório frente à *S. aureus*, pois seu halo de inibição foi de 22 mm enquanto o halo exibido pelo controle positivo cloranfenicol foi 24 mm, evidenciando uma proximidade de ação do extrato fúngico testado em comparação ao antimicrobiano de ação já comprovada. Já em relação ao potencial antifúngico, a nistatina foi utilizada como controle positivo com halo de inibição de 12,6 mm assim, destacaram-se os extratos 4UVLFC2 (N.I), que exibiu halo de 10 mm, bem próximo ao controle e o extrato de *Fusarium* sp. 4LCEM2, que expressou halo de 14 mm superando o halo de inibição apresentado pela nistatina.

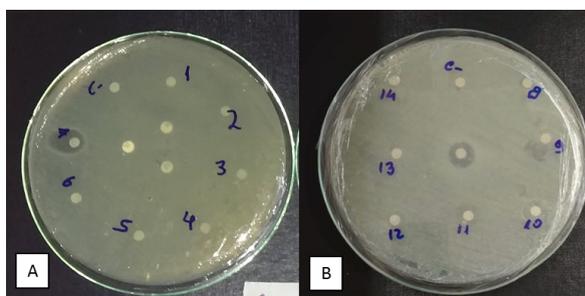
Tabela 2. Halo de inibição (mm) por método de difusão em disco dos extratos de fungos da Caatinga em Ágar Czapek a 37,0°C durante 15 dias e extraídos com acetato de etila.

Líquen	Fungos (códigos)	Halo de inibição (mm)			
		<i>E. coli</i> ATCC 11775	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>P. aeruginosa</i> (isolado clínico)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
N.I.**	2LCL1	0,0	0,0	0,0	7,0
	3UVLCL1	0,0	22,0	0,0	0,0
<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale (LC2)	4LCEM2	0,0	0,0	0,0	14,0
	4UVLFC2	0,0	0,0	0,0	10,0
Controle positivo	Ampicilina (AMP) 10mcg	0,0	-*	-*	*-
	Gentamicina (GEN) 10mcg	18,0	-*	*-	-*
	Cefepime (CPM) 30mcg	9,0	-*	-*	-*
	Azitromicina (AZI) 15mcg	-*	0,0	-*	-*
	Penicilina (PEN) 10U.I	-*	0,0	-*	-*
	Cloranfenicol (CLO) 30mcg	-*	24,0	-*	-*
	Piperacilina (PPT) 110mcg	-*	-*	25,4	-*
	Ceftazidima (CAZ) 30mcg	-*	-*	22,4	-*
	Amicacina (AMI) 30mcg	-*	-*	24	-*
	Nistatina (NI) 100.000 U.I	-*	-*	-*	12,6

(*) - : gênero não identificado; (**)N.I: não identificado.

Fonte: a autora (2023).

Figura 3: *Screening* dos Extratos fúngicos da Caatinga, que demonstraram ação contra *S. aureus* (ATCC 6538) e *C. albicans* (ATCC 10231) em concentrações de 2000 e 500 µg/mL. (A) Placa de *S. aureus* (ATCC 6538) com halo de inibição na amostra de *Fusarium* sp. 3UVLFC1. (B) Placa de *C. albicans* (ATCC 10231) com halo de inibição nas amostras de *Penicillium* sp. 2LCL1, *Fusarium* sp. 4LCEM2 e 4UVLFC2 (N.I).



Fonte: a autora (2023).

Na avaliação qualitativa por meio do método de microdiluição em caldo, é possível observar que dos 35 extratos fúngicos produzidos, 28,5% deles apresentou atividade antimicrobiana em altas concentrações, destacando-se a amostra 4UVLFC2 (N.I) por demonstrar atividade biológica tanto contra bactéria, quanto contra fungo. Os resultados diferiram de acordo com os métodos de Difusão em Disco (DD) e Microdiluição em Caldo. Foi possível registrar (Tabela 3) que extratos que exibiram atividade no ensaio de microdiluição, não apresentaram inibição antimicrobiana no método de DD, corroborando com BONA et al. (2014), então é lícito sugerir que a difusão foi incompleta. Tal fato pode acontecer em compostos que possuem menor polaridade, pois isso torna a difusão mais lenta no meio de cultura sólido (MORENO et al, 2006; BONA et al., 2014), o que não quer dizer, necessariamente, que o composto não possui atividade.

Tabela 3: Comparação dos resultados obtidos na avaliação qualitativa por meio dos métodos de Disco Difusão e Microdiluição em Caldo, ambos realizados em concentrações de 1000 µg/mL e 500 µg/mL.

Extratos fúngicos que exibiram atividade antimicrobiana em concentrações de 1000 e 500 µg/mL		
Micro-organismo	Disco Difusão	Microdiluição em Caldo
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>Fusarium</i> sp. 3UVLCL1	<i>Fusarium</i> sp. 3UVLFC1
		<i>Penicillium</i> sp. 2LCL1
		4UVLFC2 (N.I)
		2UVLFC3 (N.I)
		<i>Penicillium</i> sp. 4UVLFC3
		<i>Penicillium</i> sp. 2UVC8
<i>E. coli</i> ATCC 11775	-	<i>Penicillium</i> sp. 11LCL5
		1UVLFC3 (N.I)

<i>P. aeruginosa</i> (isolado clínico)	-	5UVLFC2 (N.I) <i>Fusarium</i> sp. ALC3
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	4UVLFC2 (N.I) <i>Penicillium</i> sp. 2LCL1 <i>Fusarium</i> sp. 4LCEM2	4UVLFC2 (N.I)

Fonte: a autora (2023).

A tabela 4, expõe os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana, com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos fúngicos *Fusarium* sp. 3UVLFC1, 4UVLFC2 (N.I), *Penicillium* sp. 11LCL5 e *Penicillium* sp. 2UVC8. A CIM para atividade antibacteriana frente à *S. aureus* (ATCC 6538) variou de 125,0 a 500,0 µg/mL, para os extratos em que até a máxima concentração empregada (2000,0 µg/mL) não foi obtida inibição do crescimento para estabelecimento da CIM, eles não foram expostos na tabela. Observou-se que 11,42% (n=4) dos extratos fúngicos apresentam atividade antimicrobiana. Outrossim, o isolado *Penicillium* sp. 2UVC8 exibiu a melhor atividade biológica (125 µg/mL) quando comparado aos demais que demonstraram atividade inibitória contra *S. aureus* (ATCC 6538), sendo assim o mais efetivo, seguido dos extratos *Fusarium* sp. 3UVLFC1 (250 µg/mL) e *Penicillium* sp. 11LCL5 (500 µg/mL). No tocante à atividade antifúngica, o isolado 4UVLFC2 (N.I) apresentou resultado promissor, pois foi efetivo em concentração de 31,2 µg/mL contra *C. albicans* (ATCC 10231).

Tabela 4: Concentração Inibitória Mínima através do método de microdiluição em caldo Mueller Hinton dos extratos fúngicos (2000 µg/mL a 15,62 µg/mL).

Líquén	Fungos (códigos)	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			
		<i>E. coli</i> ATCC 11775	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>P. aeruginosa</i> (isolado clínico)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
N.I.**	<i>Fusarium</i> sp. 3UVLFC1	-*	250,0	-*	-*
<i>Xanthoparmelia plittii</i> (Gyeln.) Hale (LC2)	(N.I) 4UVLFC2	-*	-*	-*	31,2
<i>Dirinaria applanata</i> (Fée) D.D. Awasthi (LC5)	<i>Penicillium</i> sp. 11LCL5	-*	500,0	-*	-*
<i>Peltula euploca</i> (Ach.) Poelt (LC8)	<i>Penicillium</i> sp. 2UVC8	-*	125,0	-*	-*

(*) - : gênero não identificado; (**)N.I: não identificado.

Fonte: a autora (2023).

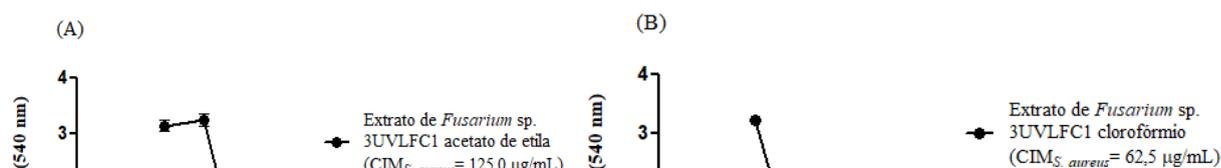
Alguns estudos evidenciam que espécies fúngicas de *Penicillium* originaram antibióticos importantes como as penicilinas (CHANDRA & KUMAR, 2017; XIAN et al., 2020), tendo destaque a Penicilina G, que é um metabólito secundário da espécie *Penicillium chrysogenum*, renomeado para *P. rubens*, e única penicilina natural clinicamente utilizada (FIERRO et al., 2022; SANTIAGO et al., 2022). Tais pesquisas demonstram atividade antimicrobiana desse gênero, corroborando com os resultados encontrados neste estudo.

O gênero *Fusarium* spp. produz uma abrangente variedade de metabólitos secundários com atividades farmacológicas, sendo uma das atividades notáveis a antimicrobiana (LI et al., 2019; PERINCHERRY et al., 2021; SINGH et al., 2021; AHMED et al., 2022). No grupo dos compostos produzidos por *Fusarium* sp. estão: alcalóides, terpenos, esteróis, policetídeos, peptídeos e outros (LI et al., 2019; AHMED et al., 2022). Assim como este estudo demonstrou atividade antimicrobiana por esse gênero, há outras pesquisas indicando essa propriedade, conforme reportaram SINGH et al. (2021), que registraram atividade desse gênero contra *S. aureus*.

Observou-se que o extrato de *Penicillium* sp. 2UVC8 demonstrou potencial antibacteriano diante das cepas de *S. aureus* (ATCC 6538), com CIM= 125 µg/mL. Por outro lado, esse mesmo extrato não exibiu inibição frente às cepas de *E. coli* (ATCC 11775), *P. aeruginosa* (isolado clínico) e *C. albicans* (ATCC 10231). Ainda, os demais extratos fúngicos avaliados também não exibiram ação antibacteriana frente às cepas Gram negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*).

Os resultados da microdiluição em caldo frente à *S. aureus* (ATCC 6538), após o fracionamento do extrato fúngico de *Fusarium* sp. 3UVLFC1 demonstram que suas frações de acetato de etila e hexânica apresentaram potencial antibacteriano moderado (CIM= 125,0 µg/mL), enquanto a fração clorofórmica exibiu potencial promissor (CIM= 62,5 µg/mL). O cálculo da CIM por meio do log das concentrações aplicadas é observado na figura 4. Os fungos filamentosos apresentam um rico repertório no que concerne às propriedades físico-químicas e biológicas, justificando o crescente interesse das indústrias biotecnológicas (URQUHART et al. 2019; HYDE et al. 2019; BABY & THOMAS 2021), seus compostos, extratos e frações têm sido pesquisados por evidenciarem propriedades significativas, dentre elas a antimicrobiana (YAZICI et al. 2022; ABOUAMAMA et al., 2023).

Figura 4: Atividade antimicrobiana das frações de acetato de etila (A), clorofórmica (B) e hexânica (C) do extrato fúngico de *Fusarium* sp. 3UVLFC1, no ensaio de CIM em microdiluição em caldo frente à *S. aureus* (ATCC 6538).



Fonte: a autora (2023).

A pesquisa por compostos naturais com atividade antimicrobiana é de suma relevância devido ao aumento da resistência bacteriana ao longo do tempo, que está associada a diferentes ambientes e pode atingir indivíduos com comorbidades, imunocomprometidos e saudáveis (Lewis 2020; Liu et al. 2021b; Loftus et al. 2022). Desse modo, os resultados encontrados para *S. aureus* recebem destaque, uma vez que essa bactéria tem alto índice de resistência a vários antibióticos, como os betalactâmicos e metilicilina, reduzindo as possibilidades terapêuticas (Liu et al. 2021b; Ahmad-Mansour et al 2021; Cheung et al. 2021).

Atividade citotóxica em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC)

A fim de verificar se os extratos fúngicos de *Penicillium* sp. 2UVC8, *Fusarium* sp. 3UVLFC1 e *Penicillium* sp. 11LCL5 teriam efeito citotóxico em linfócitos após 48 horas de cultura, foi realizado o ensaio de viabilidade celular com o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Vistica et al. 1991). Nenhum extrato avaliado reduziu a viabilidade celular nas concentrações de 2000,0 a 15,62 µg/mL, de forma que os extratos não foram citotóxicos às células mononucleares periféricas humanas (Tabela 5).

Tabela 5: Atividade citotóxica dos extratos fúngicos em PBMC.

Tratamento	*CI₅₀ (µg/mL)	*ECM (%)
<i>Fusarium</i> sp. 3UVLFC1	>2000	Não citotóxico
<i>Penicillium</i> sp. 2UVC8	>2000	Não citotóxico
<i>Penicillium</i> sp. 11LCL5	>2000	Não citotóxico

*CI₅₀: concentração inibitória média; *ECM: efeito citotóxico máximo.

Fonte: a autora (2023).

A avaliação da citotoxicidade é bastante relevante, pois alguns fungos filamentosos podem produzir micotoxinas, metabólitos que prejudicam o organismo humano pelos efeitos tóxicos (Morales et al. 2018; Silva et al, 202; Gasser et al, 2023). Sabe-se que o sistema imune possui células específicas capazes de proteger o organismo de diferentes tipos de contaminação e, enquanto os macrófagos compõem a imunidade inata, os linfócitos são

células que também fazem parte desse arsenal e desencadeiam a imunidade adaptativa (Kumar et al, 2020).

Santos et al. (2023, dados não publicados) utilizaram uma alíquota dos extratos fúngicos de *Fusarium* sp. 4LCEM2, 4UVLFC2 (N.I) e *Penicillium* sp. 2LCL1 para realizar ensaio de citotoxicidade em macrófagos da cepa J774.A1 e de viabilidade de promastigotas de duas formas de *Leishmania*, *L (L). amazonensis* e *L (L). chagasi*. Em seus resultados os autores relatam que os três extratos exibiram toxicidade com CI_{50} abaixo de 50 $\mu\text{g/mL}$, por outro lado os extratos foram bem-sucedidos em eliminar as duas formas promastigotas e ainda, os extratos fúngicos de *Penicillium* sp. 2LCL1 e 4LCEM2 (N.I) apresentaram maior seletividade para *L (L). amazonensis*, quando comparados aos macrófagos, uma vez que obtiveram índice de seletividade maior que 10. Com isso, tais extratos demonstram viabilidade ao desenvolvimento de novos fármacos.

Há pesquisas que testam a citotoxicidade de extratos fúngicos em células tumorais, uma delas selecionou extratos de fungos filamentosos de diferentes gêneros, dentre eles: *Penicillium* e *Aspergillus* e analisou o efeito desses extratos no crescimento de células tumorais. Os autores revelaram que os extratos de *Aspergillus* apresentaram IC_{50} de 95,21 $\mu\text{g/mL}$ contra células de câncer de mama humano e os extratos de *Penicillium* demonstraram a menor porcentagem de toxicidade contra PBMCs, com IC_{50} de 409,8 $\mu\text{g/mL}$. Dentre os demais resultados apresentados, eles concluem que os extratos de fungos filamentosos demonstraram inibição significativa das células tumorais testadas e baixa inibição para as PBMCs (Ramírez-Villalobos et al. 2021).

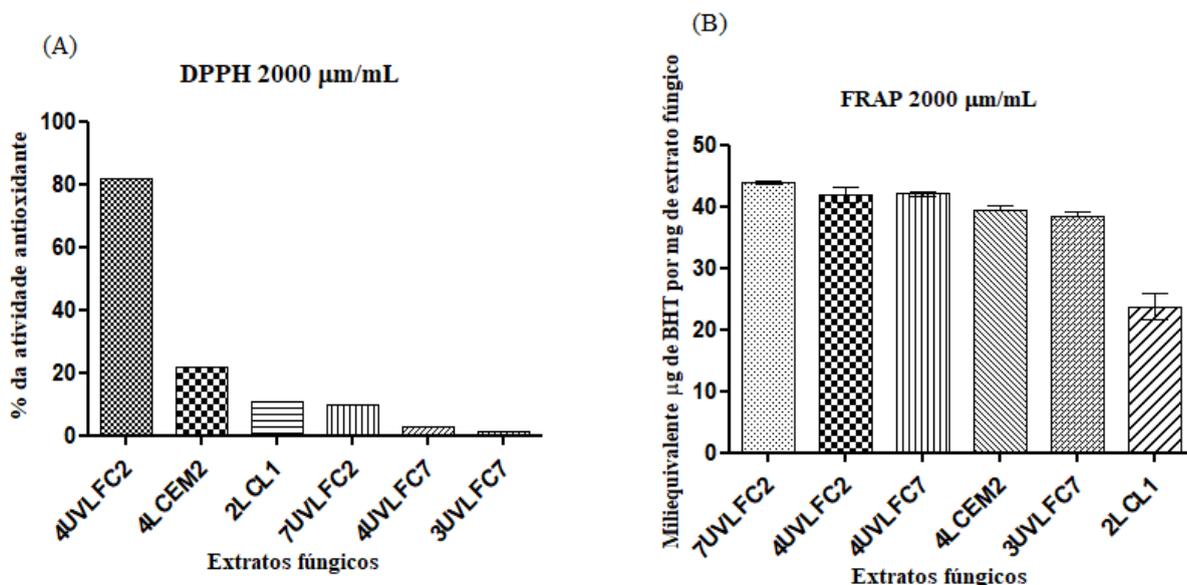
Perfil antioxidante dos extratos fúngicos

Os 35 extratos fúngicos foram avaliados através dos métodos do radical livre DPPH e FRAP em concentrações de 2000 e 500 $\mu\text{g/mL}$, a partir disso constatou-se que 17% (n= 6) desses extratos apresentaram atividade antioxidante em ambos os métodos, são eles: 4UVLFC2 (N.I), *Fusarium* sp. 4LCEM2, *Penicillium* sp. 2LCL1, *Aspergillus* sp. 7UVLFC2, *Alternaria* sp. 4UVLFC7 e *Alternaria* sp. 3UVLFC7 (Figura 5). Para expor o potencial antioxidante dos extratos foi demonstrada a atividade de eliminação do radical DPPH por porcentagem, já pelo método FRAP a atividade antioxidante foi expressa por miliequivalentes de BHT, ácido gálico e também pelo aumento da absorbância (595 nm).

Diferentes pesquisadores afirmam que os fungos filamentosos são importantes produtores de compostos potencialmente antioxidantes e isso ocorre pela

presença de compostos fenólicos, taninos não hidrolisáveis e flavonoides (HAMEED et al, 2017; SUGIHARTO, 2019; CHAKRABORTY et al., 2021).

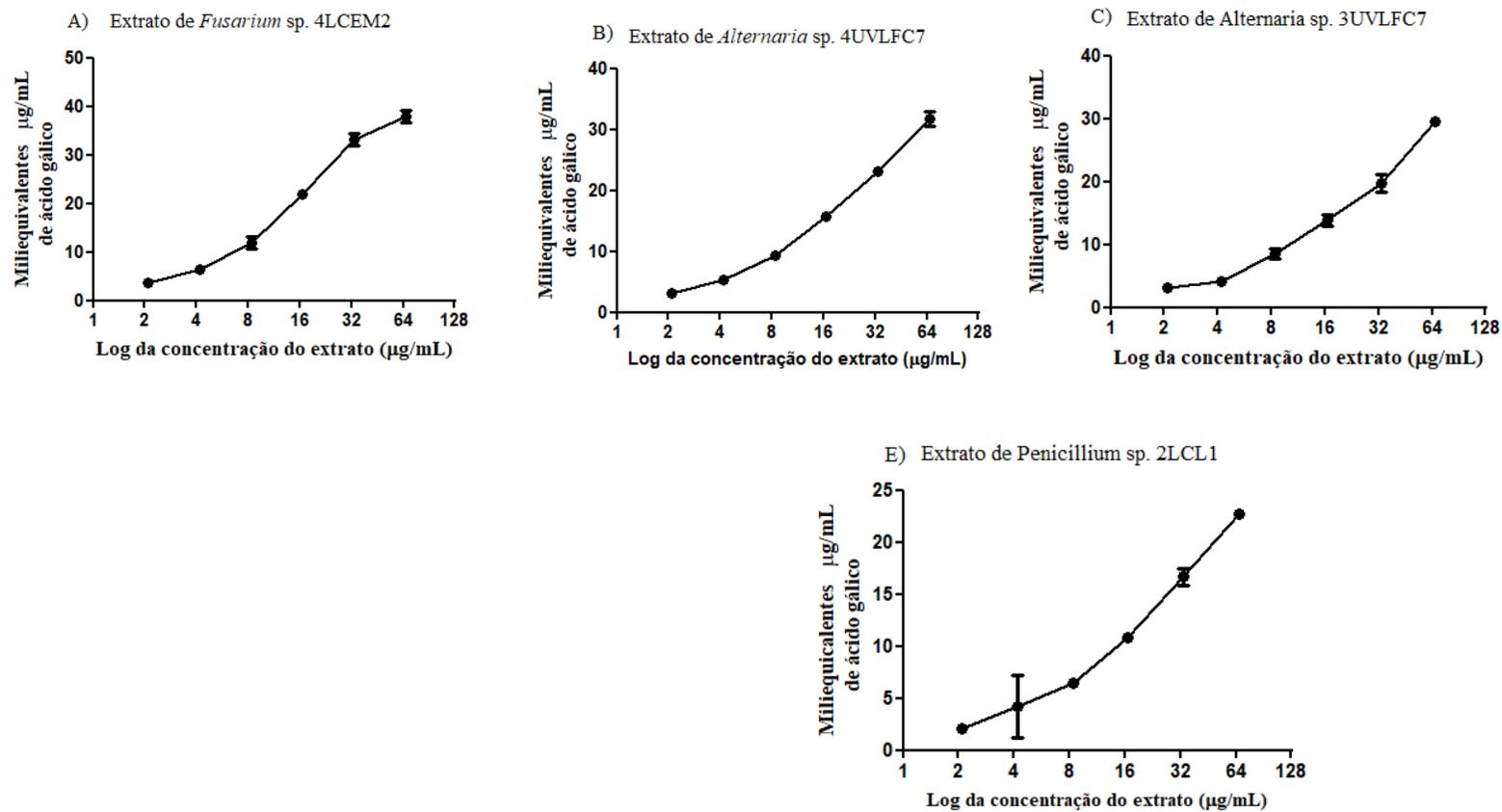
Figura 5: Atividade antioxidante através dos métodos DPPH (A) e FRAP (B), ambos em concentração de 2000 µg/mL.



Fonte: a autora (2023).

O DPPH é um radical livre de coloração violeta em metanol ou etanol e perante moléculas de antioxidantes ele passa a ser reduzido para a forma DPPH-H, com isso sua cor se altera para amarelo, uma vez que a substância redutora atua doando átomo de hidrogênio. A capacidade de redução do radical livre pela amostra analisada é monitorada pela alteração da absorbância por meio do espectrofotômetro. Assim, quanto menor a absorbância, maior será o potencial antioxidante da amostra avaliada (Pires et al. 2017; Munteanu & Apetrei 2021). O extrato fúngico 4UVLFC2 (N.I) foi particionado em frações de acetato de etila, clorofórmica e hexânica, para análise comparativa do potencial antioxidante de cada uma delas através do método de redução do radical DPPH. Os resultados revelaram que a fração hexânica não teve capacidade de redução, enquanto as demais frações foram eficazes e apresentaram potencial antioxidante por esse método, com concentração efetiva (EC50%) da fração clorofórmica (EC₅₀=125,8) sendo mais efetiva quando comparada à fração de acetato de etila (EC₅₀=213,1).

Figura 6: Atividade antioxidante dos extratos fúngicos de *Fusarium* sp. 4LCEM2 (A), *Alternaria* sp. 4UVLFC7 (B), *Alternaria* sp. 3UVLFC7 (C), *Aspergillus* sp. 7UVLFC2 (D) e *Penicillium* sp. 2LCL1 (E) no ensaio FRAP em diferentes concentrações.



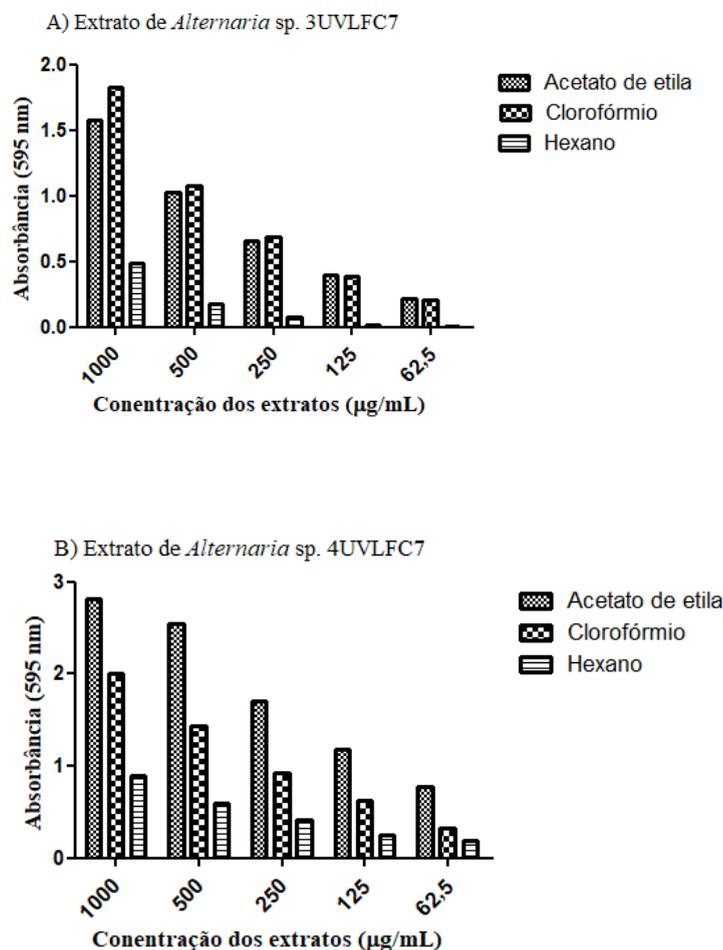
Fonte: a autora (2023).

Os ensaios aplicando o método FRAP seguiram em concentrações de 1000 µg/mL a 62,5 µg/mL, evidenciando o isolado de *Fusarium* sp. 4LCEM2, que exibiu o melhor resultado, seguido dos extratos fúngicos de *Alternaria* sp. 4UVLFC7 e *Alternaria* sp. 3UVLFC7. LIU et al. (2021) relataram que fungos endofíticos do gênero *Alternaria* spp. produzem piranonas, metabólitos secundários com atividade sequestradora do radical DPPH. Assim como as pesquisas de MIAO et al. (2017) e TIAN et al. (2017), que apontaram ação antioxidante significativa a partir de metabólitos secundários de *Alternaria* spp. caracterizados como piranonas e metabólitos nitrogenados. Ao avaliar, individualmente, o desempenho do extrato fúngico de *Fusarium* sp. 4LCEM2 no ensaio antioxidante FRAP, é nítido que há aumento da absorbância concomitante ao acréscimo da concentração, indicando a gradação da atividade antioxidante, o mesmo acontece com as amostras de *Alternaria* sp. 4UVLFC7 e *Alternaria* sp. 3UVLFC7 (**Figura 6**).

Os extratos fúngicos de *Alternaria* sp. 3UVLFC7 e *Alternaria* sp. 4UVLFC7 passaram por processo de particionamento e suas frações de acetato de etila, clorofórmica e hexânica foram avaliadas quanto ao potencial de redução de íons ferro, FRAP, como pode ser visto pela exposição dos dados na **Figura 7**.

Os dados apontam que as frações de acetato de etila e clorofórmica de ambos os extratos demonstraram as melhores atividades, enquanto a mesma confrontação indica que as frações hexânicas não inibiram os radicais livres no ensaio realizado.

Figura 7: Gráficos expressando a atividade antioxidante pelo método FRAP das frações de acetato de etila, clorofórmio e hexano dos extratos de *Alternaria* sp. 3UVLFC7 (A) e 4UVLFC7 (B).



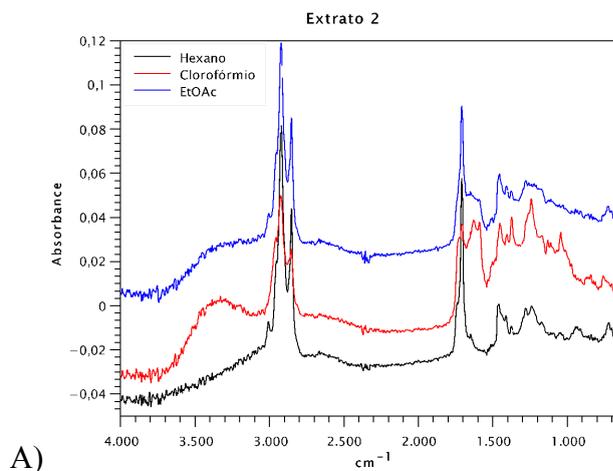
Fonte: a autora (2023).

Análise espectral FTIR

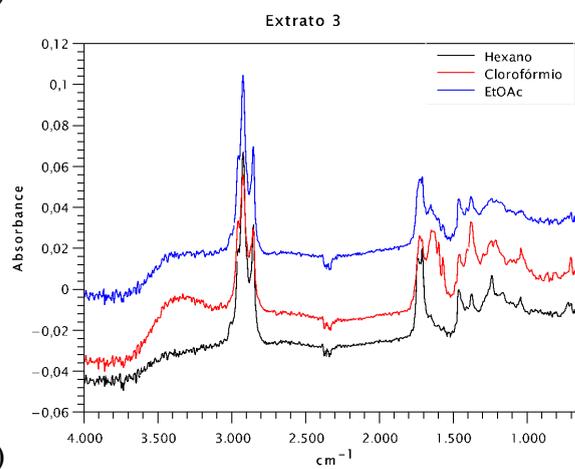
Nas **figuras 8 e 9** seguem apresentados os espectros de infravermelho (FTIR) obtidos das análises dos extratos fúngicos fracionados com os solventes hexano, clorofórmio (CHCl_3) e acetato de etila (EtOAc). O padrão espectral de cada fração foi determinado pela composição metabólica dos extratos, que reflete a natureza química dos compostos constituintes.

Figura 8. Espectros de infravermelho (FTIR) dos extratos de fungos com atividade antimicrobiana e fracionados em diferentes solventes: acetato de etila (linha azul),

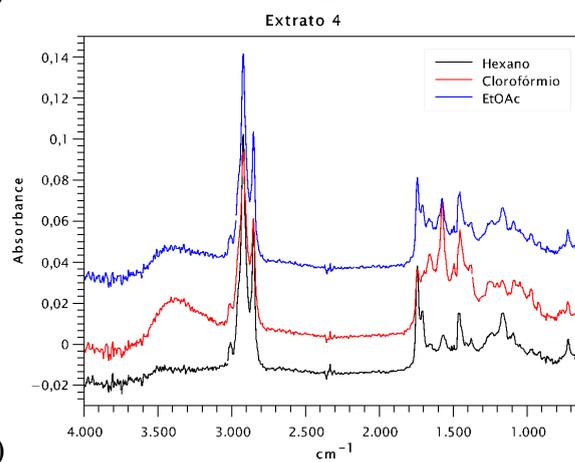
clorofórmio (linha vermelha) e hexano (linha preta). A) Extrato 2: 11LCL5; B) Extrato 3: 2UVC8; C) Extrato 4: 3UVLFC1.



A)



B)

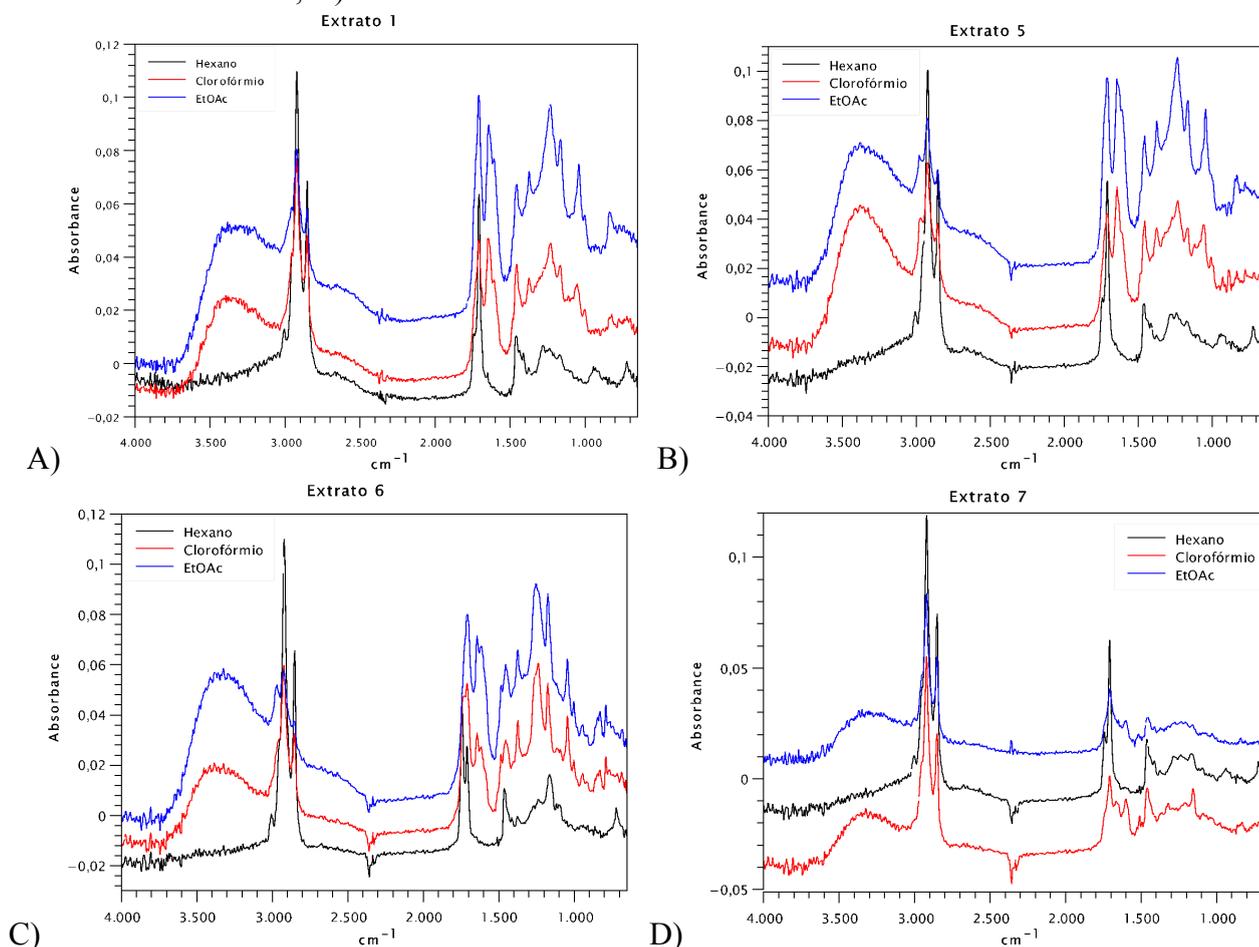


C)

*Os espectros foram gerados empregando a faixa espectral de 650 a 4000 cm⁻¹.

Fonte: do autor.

Figura 9. Espectros de infravermelho (FTIR) dos extratos de fungos com atividade antioxidante e fracionados em diferentes solventes: acetato de etila (linha azul), clorofórmio (linha vermelha) e hexano (linha preta). A) Extrato 1: 3UVLFC7; B) extrato 5: 4UVLFC7; C) extrato 6: 4UVLFC2; D) extrato 7: 7UVLFC2.



*Os espectros foram gerados empregando a faixa espectral de 650 a 4000 cm^{-1} .

Fonte: do autor.

Entre as amostras analisadas, algumas mostraram nítidas diferenças em seus perfis espectrais, já outras apresentaram relativa semelhança entre si. Diferenças e semelhanças espectrais podem sugerir aproximação ou distanciamento em termos de composição das frações. Separando os espectros em dois blocos baseando-se no perfil espectral, um grupo com os extratos produzidos por 3UVLFC7, 4UVLFC7 e 4UVLFC2 (Figura 9) apresentaram certa semelhança, com muitos picos indicando absorção de grupos comuns entre eles e esses extratos possuem atividade antioxidante comum. Bandas largas de hidroxilas, sugestivas de ácidos carboxílicos, aparecem com considerável proeminência nestes extratos (CHCl_3 e EtOAc), acompanhadas de fortes absorções de carbonilas em 1708-1712 cm^{-1} . Além disso,

estão presentes outras absorções indicativas de compostos carbonílicos, como ésteres (1738-1745 cm^{-1}).

Conforme também apresenta a **Tabela 6**, vários sinais que se relacionam com a ligação C-O aparecem com elevada intensidade e confirmam a participação dessas classes de compostos nos mencionados extratos, além de também sugerir a presença de C-O de álcoois e éteres. Este aspecto pode indicar maior participação de compostos ácidos e outros carbonilados nestes extratos com relação aos demais. Sinais característicos de grupos amida e compostos insaturados (dupla ligação), como alcenos e compostos aromáticos, também estão presentes nos espectros. É importante ressaltar que, embora haja semelhança espectral entre eles, suas composições podem apresentar significativas diferenças, uma vez que dentro de uma mesma classe de compostos orgânicos é comum existir compostos com propriedades físico-químicas acentuadamente diferentes, além da ausência de sinais espectrais de metabólitos que podem estar presentes em baixa concentração e também daqueles que foram sobrepostos por picos de maior intensidade.

Tabela 6: Dados espectrais obtidos das análises dos extratos por espectroscopia de infravermelho (FTIR).

DADOS ESPECTRAIS				
Extrato	Hexano	CHCl_3	EtOAc	Ligação / Grupo Funcional
1 (3UVLFC7)	3007	-	-	=C-H
	2954	2956	2956	CH_3
	2921, 2853	2923, 2853	2923, 2853	CH_2
	1743	-	-	C=O (Est)
	1708	1710	1710	C=O (-COOH)
	1650	1649, 1643	1643	C=O (amida)
	-	1607	1607	C-N (amida, amina)
	1506	1506, 1485	1506, 1485	C=C (aromático, alceno)
	1463	1457	1457	CH_2
	1378	1375	1373	CH_3
	1412	-	-	C-H (O- CH_3), C=C (aromático)
	1283, 1165	1236, 1210, 1165, 1004	1236, 1210, 1165, 1043, 1004	C-O (-COOH, -COOR, C-O-C, C-OH)
	946, 933	841, 832, 823	841, 832	=C-H (aromático, alceno)
	723	-	-	CH_2
2 (11LCL5)	2956	2958	2956	CH_3
	2922, 2853	2924, 2853	2922, 2853	CH_2

	1742	1736	1742	C=O (-COOR)
	1709	1724, 1709	1709	C=O (-COOH)
	-	1632	-	C=O (amida)
	-	1590	1590	C=C (aromático, alceno)
	1463	1454	1454	CH ₂
	1413	1407	1407	C-H (O-CH ₃), C=C (aromático)
	1377	1374	1377	CH ₃
	1280, 1242	1280, 1242, 1044	1280	C-O (-COOH, -COOR, C-O-C, C-OH)
	-	841, 760	-	=C-H (aromático, alceno)
	726, 720	-	726	CH ₂
3 (2UVC8)	2955	2956	2955	CH ₃
	2923, 2853	2923, 2853	2923, 2853	CH ₂
	1741	-	-	C=O (-COOR)
	1725, 1711	1727, 1711	1725, 1711	C=O (-COOH)
	-	1651, 1641	1651, 1641	C=O (amida)
	-	1599	1602	C-N (amida, amina)
	-	1571	1573	C=C (aromático, alceno)
	1463, 1456	1456	1463	CH ₂
	1410	1406	1410	C-H (O-CH ₃), C=C (aromático)
	1375	1380	1380	CH ₃
	1042	1241, 1210, 1042	1241, 1210	C-O (-COOH, -COOR, C-O-C, C-OH)
	-	912, 859	912	=C-H (aromático, alceno)
	722	-	-	CH ₂
	704	704	704	=C-H, C=C
	4 (3UVLFC1)	3008	3011	3008
2955		2955	2955	CH ₃
2922, 2852		2922, 2852	2922, 2852	CH ₂
1744		1744	1744	C=O (-COOR)
1711		-	1711	C=O (-COOH)
-		1659	-	C=O (amida)
1495, 1464		1575, 1495, 1464	1575, 1495, 1464, 1456	C=C (aromático, alceno)
1456		1454	-	CH ₂
1376		1376	1376	CH ₃
1260, 1209, 1162, 1094, 1044		1260, 1241, 1211, 1171, 1094, 1044	1260, 1209, 1171, 1162, 1094, 1044	C-O (-COOH, -COOR, C-O-C, C-OH)
-	976, 923	976	=C-H (aromático, alceno)	

5 (4UVLFC7)	722	-	-	CH ₂	
	705	705	705	=C-H, C=C	
	3008	-	-	=C-H	
	2952, 2870	2980, 2969, 2870	2980, 2870	CH ₃	
	2923, 2852	2925, 2854	2925, 2854	CH ₂	
	1744	-	-	C=O (-COOR)	
	1708	1712	1712	C=O (-COOH)	
	-	1643	1643	C=O (amida)	
	-	1609	1609	C-N (amida, amina)	
	-	1485	-	C=C (aromático, alceno)	
	1456	1456	1456	CH ₂	
	1416	1416	1416	C-H (O-CH ₃), C=C (aromático)	
	1377	1374	1374	CH ₃	
	-	1234, 1164, 1117, 1059, 1007	1234, 1164, 1044, 1007	C-O (-COOH, -COOR, C-O-C, C-OH)	
	-	991, 885, 845, 830, 776	991, 885, 845, 831, 776	=C-H (aromático, alceno)	
	725	-	-	CH ₂	
	660	659	659	=C-H, C=C	
	3008	-	-	=C-H	
	6 (4UVLFC2)	2953, 2870	2978, 2870	2978, 2970, 2870	CH ₃
		2922, 2852	2922, 2854	2923, 2858, 2854	CH ₂
1745		1738	-	C=O (-COOR)	
1712		1712	1712	C=O (-COOH)	
-		1645	1645	C=O (amida)	
-		1623	1623	C-N (amida, amina)	
1465		1485, 1465	1485, 1465	C=C (aromático, alceno)	
1455		1455, 1445	1455, 1445	CH ₂	
1375		1375	1375	CH ₃	
1162		1238, 1227, 1174, 1045, 1003	1253, 1238, 1227, 1174, 1045, 1003	C-O (-COOH, -COOR, C-O-C, C-OH)	
-		863, 845, 829, 791	863, 845, 829, 791	=C-H (aromático, alceno)	
722		-	-	CH ₂	
660		686, 660	686, 660	=C-H, C=C	
3008		-	-	=C-H	

(7UUVLFC2)	2954	2954	2954	CH ₃
	2922, 2853	2922, 2853	2922, 2853	CH ₂
	1744	1744	1744	C=O (-COOR)
	1709	1709	1709	C=O (-COOH)
	-	1667	1667	C=O (amida)
	-	1600	1600	C-N (amida, amina)
	1511, 1465	1511, 1465	1464	C=C (aromático, alceno)
	1455	1455	1455	CH ₂
	1416	-	-	C-H (O-CH ₃), C=C (aromático)
	-	1158	-	C-O (-COOH, -COOR, C-O-C, C-OH)
	724	-	-	CH ₂

Fonte: do autor.

Em outro grupo, pôde-se destacar semelhanças nos perfis espectrais dos extratos 2, 3, 4 e 7. Com espectros menos complexos que os dos demais extratos, com menos sinais e absorções mais fracas, podem sugerir que as correspondentes frações sejam mais simples em termos de composição. Absorções características de ácidos carboxílicos, como banda larga de OH de ácido, absorções de C=O em 1709-1724 cm⁻¹ e de C-O em 1044-1280 cm⁻¹, também estão presentes nesses extratos, embora sejam menos intensas. Outros grupamentos químicos com sinais característicos aparecendo nos espectros seguem mostrados na Tabela 6, podendo também ser observado as diferenças de sinais espectrais entre esses extratos.

Picos gerados a partir de absorções de estiramento da ligação C-H de grupos metilas e metilenos (CH₃ e CH₂, respectivamente) aparecem com valores definidos de números de onda em todos os espectros (2954-2956 cm⁻¹, CH₃; 2921-2925 cm⁻¹, 2852-2854 cm⁻¹, CH₂; Tabela 6). Outras absorções desses grupos, as de dobramento, também aparecem com valores definidos em todos os extratos (1454-1463 cm⁻¹, CH₂; 1373-1380 cm⁻¹, CH₃; Tabela 6).

No tocante às frações obtidas com os solventes hexano, CHCl₃ e EtOAc, para todos os extratos, os espectros obtidos com a mistura extraída com hexano foram mais simples, com menor número de picos de média e alta intensidade. Alguns sinais comuns às frações com os três solventes, como o estiramento de C=O de ácidos e ésteres, aparecem com menor intensidade relativa nas frações com hexano, além da banda de OH de ácidos, que não aparecem nestas frações. Este aspecto é resultante de baixas concentrações dos metabólitos presentes nestas frações, o que aponta para maior solubilidade da maior parte dos metabólitos

nos solventes CHCl_3 e EtOAc. Além disso, este fato também sugere haver menor número de componentes nas frações preparadas com hexano.

O pico que aparece em $722\text{-}726\text{ cm}^{-1}$ é proveniente de grupos metileno (CH_2), produzido por vibração de dobramento característico de cadeias carbônicas com número de $\text{CH}_2 \geq 4$. Este aspecto indica a presença de espécies químicas dotadas de pequenas e/ou grandes frações hidrocarbônicas nos extratos, incluindo como alguns dos prováveis candidatos, ácidos graxos e seus derivados.

Há poucos estudos que associam a espectroscopia FTIR à caracterização e identificação de extratos fúngicos. Lecellier et al. (2014) avaliaram o desempenho dessa técnica para identificar fungos filamentosos com base em uma construção de banco de dados das informações moleculares de cada amostra utilizada. Os seus achados corroboraram com os resultados desta pesquisa, uma vez que indicaram informações bioquímicas semelhantes em frequências espectrais similares.

Conclusões

O bioma Caatinga oferece uma rica diversidade de micro-organismos, que pela necessidade de sobrevivência em um ambiente de condições ambientais extremas, desenvolvem mecanismos de adaptação e proteção por meio da síntese de compostos com benefícios para si próprios e para os humanos. Nessa conjuntura, destacam-se os metabólitos secundários secretados por fungos filamentosos, que apresentaram potencial biotecnológico com possíveis aplicações em indústrias farmacêuticas, nutracêuticas e cosmética.

Evidencia-se que, dos 35 extratos fúngicos produzidos, 11,42% (n=4) exibiu atividade antimicrobiana. Sendo o extrato fúngico de *Penicillium* sp. 2UVC8 o responsável pela melhor ação inibitória contra *S. aureus* (ATCC 6538), apresentando uma CIM = 125 $\mu\text{g/mL}$.

Outrossim, a descoberta de compostos antioxidantes tem grande relevância como fonte de novas terapêuticas, uma vez que podem ter aplicação promissora em medicamentos nutracêuticos e biocosméticos. Esse trabalho demonstrou a eficiência do extrato fúngico de *Fusarium* sp. 4LCEM2, através da aplicação do método FRAP.

O presente estudo ressalta a relevância do bioma Caatinga como fonte de compostos naturais com efetividade biotecnológica, assim é relevante destacar a importância da sua preservação. Como também vale lembrar que os compostos naturais apresentam menor possibilidade de causar toxicidade quando comprado aos compostos sintéticos.

REFERÊNCIAS

ABOUAMAMA S, ANIS B, ABIR S, MAROUA H & SIRINE B. 2023. Amylolytic and antibacterial activity of filamentous fungi isolated from the rhizosphere of different plants grown in the Tamanghasset region. *Heliyon* 9(3).

AHMAD-MANSOUR N, LOUBET P, POUGET C, DUNYACH-REMY C, SOTTO A, LAVIGNE J-P & MOLLE V. 2021. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. *Toxins* 13(10).

AHMED AM, MAHMOUD BK, MILLÁN-AGUIÑAGA N, ABDELMOHSEN UR & FOUAD MA. 2022. The endophytic *Fusarium* strains: a treasure trove of natural products. *RSC Advances* 13(2): 1339-1369.

AMPARO T, BRAGA VCC, SEIBERT JB, SOUZA GHB & TEIXEIRA LFM. 2018. Methods for in vitro evaluation of the antimicrobial activity of medicinal plants: the need for standardization. *Infarma - Pharm Sci* 30:50-59. DOI: 10.14450/2318-9312.v30.e1.a2018.pp50-59

AMORIM ICS, MARINHO GO, MACHADO TMFS, ROA JPB, REIS AB, NELSON DL, PASIN TM & BENASSI VM. 2020. Isolation of Filamentous Fungi from the Caatinga Region and Production of Amylolytic Enzymes of Great Industrial Interest. *J Biosc Med* 8: 152-164. DOI: 10.4236/jbm.2020.811014

BABY J & THOMAS T. 2021. A review on different approaches to isolate antibiotic compounds from fungi. *Ital J Mycol* 50: 99-116. DOI: 10.6092/ISSN.2531-7342/12700

BARBOSA FR, GUSMÃO LFP & BARBOSA FF. 2008. *Thozetella* species (Anamorphic fungi - Hyphomycetes) in the semi-arid region of Bahia State, Brazil. *Acta bot bras* 22:29-36.

CDC. COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2022. DOI:<https://dx.doi.org/10.15620/cdc:117915>
<https://www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html>

CHAKRABORTY A, MAJUMDAR S & BHOWAL J. 2021. Phytochemical screening and antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of different filamentous fungi. *Arch Microbiol* 203(10): 6091-6108. DOI: 10.1007/s00203-021-02572-4

CHANDRA N & KUMAR S. 2017. Antibiotics Producing Soil Microorganisms. In: *Antibiotics And Antibiotics Resistance Genes In Soils*. *Soil Biology* 51(11):1-18. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-66260-2>

CHEN Z, BERTIN R & FROLDI G. 2013. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH* assay using several statistical programs. *Food Chem* 138(1):414-420. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.001
CHEUNG GYC, BAE JS & OTTO M. 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* 12(1): 547-569, 2021. DOI [10.1080/21505594.2021.1878688](https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688)

CLEMENTINO LC, BARBOSA CC, SILVA FD, & QUEIROZ JCF. 2015. Bioprospecção de antibióticos produzidos por fungos da Caatinga. Evidência 15(1): 37-56.
Doi:[10.18593/eba.v15i1.6276](https://doi.org/10.18593/eba.v15i1.6276)

BONA EAMD, PINTO FGS, FRUET TK, JORGE TCM & MOURA AC. 2014. Comparing of methods for evaluating antimicrobial activity and determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of aqueous and ethanolic plant extracts. Arquivos do Inst Biol 81(3): 218-225. doi:10.1590/1808-1657001192012

DE FARIA MJM, BRAGA CASB, DE PAULA JR, ANDRÉ MCDPB, VAZ BG, CARVALHO TC, ROMÃO W, COSTA HB, CONCEIÇÃO EC. 2017. Antimicrobial activity of *Copaifera* spp. against bacteria isolated from milk of cows with mastitis. Cienc Anim Bras 18: 1-14. DOI: 10.1590/1089-6891v18e-39068

DUARTE AWF ET AL. 2018. Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. Polar Biology 41: 2511-2521. DOI:10.1007/s00300-018-2387-1

ELOFF JN. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Medica 64:711-713. DOI. 10.1055/s-2006-957563

EMRI T, SZARVAS V, OROSZ E, ANTAL K, PARK H, HAN K-H, HU J-H & PÓCSI I. 2015. Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. BMC Genomics 16(1). DOI: 10.1186/s12864-015-1705-z

FIERRO F, VACA I, CATILLO NI, GARCIA-RICO RO & CHAVEZ R. 2022. *Penicillium chrysogenum*, a Vintage Model with a Cutting-Edge Profile in Biotechnology. Microorganisms 10: 573-591.
DOI: 10.3390/microorganisms10030573

GARÁDI Z, DÉKÁNY M, MÓRICZ AM, GAÁL A, PAPP V, NÉNI S & VÁNYOLÓS A. 2021. Antimicrobial, Antioxidant and Antiproliferative Secondary Metabolites from *Inonotus nidus-pici*. Molecules 26(18). DOI: 10.3390/MOLECULES26185453

GASSER K, SULYOK M, SPANGL B, KRŠKA R, STERNKELLNER S & HAGE-AHMED K. 2023. *Fusarium proliferatum* secondary metabolite profile in vitro depends on the origin of the isolates and is clearly reduced in stored garlic, Postharvest Biol Technol, 200. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2023.112312

GOMEZ A ET AL. 2022. Synthesis and evaluation of novel furanones as biofilm inhibitors in opportunistic human pathogens. Eur J Medicinal Chemistry 242. DOI: 10.1016/J.EJMECH.2022.114678

HAMEED A, HUSSAIN AS, YANG J, IJAZ UM, LIU Q, SULERIA HAR & SONG Y. 2017. Antioxidants potential of the filamentous fungi (*Mucor circinelloides*). Nutrients 9(10). DOI: 10.3390/nu9101101

HYDE K ET AL. 2019. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity* 97: 1-136.
DOI: 10.1007/s13225-019-00430-9

JIANG C, GE J, HE B & ZENG B. 2021. Glycosphingolipids in Filamentous Fungi: Biological Roles and Potential Applications in Cosmetics and Health Foods. *Front Microb* 12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.690211.

KUMAR AG, BUPESH G, SANKARGANESH P, VASANTH S, NANDAGOPAL S & JOSEPH B. 2020. Inhibitory studies of HepG2 and human immune cells using *Solanum nigrum*, *J Biomed inform* 16(7). DOI: 10.6026/97320630016525

LEWIS K. 2020. The Science of Antibiotic Discovery. *Cell* 181: 29-45. DOI: 10.1016/J.CELL.2020.02.056

LI M, YU R, BAI X, WANG H & ZHANG H. 2019. *Fusarium*: a treasure trove of bioactive secondary metabolites†. *Nat Prod Rep* 37(12): 1568-1588. DOI: 10.1039/d0np00038h

LI F ET AL. 2020. Modified fusicoccane-type diterpenoids from *Alternaria brassicicola*. *J. Nat. Prod.* 83:1931-1938. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.0c00165

LIU D, KONDRATYUK SY, LÖKOS L, HALDA JP, JEONG M, PARK J, WOO J & HUR J. 2019. Two New Corticolous Buellioid Species from South Korea. *Mycobiology* 47: 143-153.
DOI: [10.1080/12298093.2019.1607657](https://doi.org/10.1080/12298093.2019.1607657)

LIU G, NIU S. AND LIU L. 2021a. Alterchromanone A, one new chromanone derivative from the mangrove endophytic fungus *Alternaria longipes*. *J. Antibiot.* 74: 152-155. DOI: 10.1038/s41429-020-00364-4

LIU W-T, CHEN E-Z, YANG L, PENG C, WANG Q, XU Z, CHEN D-Q. 2021b. Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review. *Microb Pathog* 156.

LOFTUS MJ ET AL. 2022. Epidemiology, antimicrobial resistance and outcomes of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a tertiary hospital in Fiji: A prospective cohort study. *The Lancet Reg Health - West Pac* 22: 1-10.

LV N ET AL. 2021. Discovery of novel *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a inhibitors by multistep virtual screening and biological evaluation. *Bioorganic Med Chem Lett* 41:2-9. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.128001

MIAO Z, MA, YM, KONG, Y., YAN, MR AND WANG, J. 2017. Study on alkaloid metabolites of a strain of *Alternaria* fungi. *Jiangsu Agric. science* 45: 314-316. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2017.22.081

MOLELEKOA TBJ, REGNIER T, DA SILVA LS, AUGUSTYN W. 2021. Production of

Pigments by Filamentous Fungi Cultured on Agro-Industrial by-Products Using Submerged and Solid-State Fermentation Methods. *Fermentation* 7(4):295.
<https://doi.org/10.3390/fermentation7040295>

MORALES M, GALLEGO MT, IRAOLA V, MOYA R, SANTANA S & CARNÉS J. 2018. Preclinical safety and immunological efficacy of *Alternaria alternata* polymerized extracts, *Immun Inflamm Dis* 6(2):234-244. DOI: 10.1002/iid3.212

MORENO S, SCHEYER T, ROMANO CS & VOJNOV AA. 2006 Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic Res* 40:223-231. DOI: 10.1080/10715760500473834

MUNTEANU I & APETREI C. 2021. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci* v. 22. PMID: 33806141

OLIVEIRA LG ET AL. 2013. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. *Journal of Arid Environments* 95:49-54. DOI: 10.1016/j.jaridenv.2013.03.007

PERINCHERRY L, URBANIAK M, PAWŁOWICZ I, KOTOWSKA K, WA'SKIEWICZ A & ST, EPIE 'N L. 2021. Dynamics of Fusarium Mycotoxins and Lytic Enzymes during Pea Plants' Infection. *Int J Mol Sci* 22(18). DOI: 10.3390/ijms22189888.

PIRES J, TORRES PB, DANTOS DYAC & CHOW F. 2017. Microplate assay of antioxidant potential using the DPPH free radical scavenging method for algae extracts. Inst of Biosci, University of São Paulo.
DOI: [10.13140/RG.2.2.27450.08640](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27450.08640)

RAHMAN M, SATYAJIT D. 2020. Antimicrobial natural products. *Annu Med Chem*, v. 55, p. 77-113, 2020. DOI: 10.1016/bs.armc.2020.06.001

RAI N, KESHRI PK, VERMA A, KAMBLE SC, SINGH SK & GAUTAM V. 2022. Bioprospecting of fungal endophytes from *Oroxylum indicum* (L.) Kurz with antioxidant and cytotoxic activity. *PloS one* 17(3).
DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0264673

ROMÃO T, MENEZES-FILHO ACP, HAKAKAVA R, CASTRO CFS & MORAIS PB. 2022. Molecular and morphological diversity, qualitative chemical profile and antioxidant activity of filamentous fungi of the digestive tract of *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae). *Braz J Biol* 84. DOI: 10.1590/1519- 6984.259983

RAMÍREZ-VILLALOBOS JM ET AL. 2021. In vitro tumor cell growth inhibition induced by *Lophocereus marginatus* (DC.) S. Arias and Terrazas endophytic fungi extracts, *Int J Environ Res Public Health* 18(18). DOI: 10.3390/ijerph18189917

SÁ PGS, GUIMARÃES AL, OLIVEIRA AP, FILHO JAS, FONTANA AP, DAMASCENO PKF, BRANCO CRC, BRANCO A & ALMEIDA JRGS. 2012. Total phenols, total flavonoids and antioxidant activity of *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 33(4): 561-566.

SANTOS PS, SOLIDADE LS, SOUZA JGB, LIMA GS, BRAGA JR ACR, DE ASSIS FGV & LEAL PL. 2018. Solid-state fermentation on agro-industrial residues for enzyme production: a systematic review. *J Eng Exact Sci* 4(2). DOI:10.18540/jcecvl4iss2pp0181-0188

SANTIAGO PAL, SANTIAGO SRSS, AQUINO PF, NUNOMURA SM & NUNOMURA RCS. 2022. Evaluation of the antimicrobial potential of extracts of fungi *Penicillium* spp. *Res Soc Dev* 11(3). DOI: 10.33448/rsd-v11i3.26457

SATARI HÁ, ZARGAR MI, SHAH WA, BANSAL R & BHAT MF. 2018. Isolation, molecular identification, phytochemical screening and *in vitro* anti-oxidant activity of endophytic fungi from *Achilea millefolium* Linn. *J Pharmacogn Phytochem* 7(4).

SHARMA, D., PRAMANIK, A., & AGRAWAL, P. K. 2016. Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D.Don. *3 Biotech* 6(2). doi:10.1007/s13205-016-0518-3

SILVA IEB, JARDIM LAS, RIBEIRO SEM & LIMA RLFA. 2020. Fungolândia: an educational board game about the diversity and importance of fungi in the Caatinga. *Brazilian Journal of Environmental Education* 15: 52-99. DOI: 10.34024/revbea.2020.v15.11449

SILVA M ET AL. 2022. Antarctic organisms as a source of antimicrobial compounds: a patent review. *An Acad Bras Cien* 94:1-21. DOI: 10.1590/0001-376520220210840

SINGH A, KUMAR J, SHARMA V ET AL. 2021. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of an endophytic *Fusarium proliferatum* (ACQR8), isolated from a folk medicinal plant *Cissus quadrangularis* L. *S Afr J Bot* 140: 87-94. DOI: 10.1016/j.sajb.2021.03.004

SUGIHARTO S. 2019. A review of filamentous fungi in broiler production. *Annals of Agricultural Sciences* 64(1): 1-8. DOI: 10.1016/j.aoad.2019.05.005.

TIAN J, FU L, ZHANG Z, DONG X, XU D, MAO Z ET AL. 2017. Dibenzo- α -pyrones from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01: isolation, structure elucidation, and their antibacterial and antioxidant activities. *Nat. Prod. Res.* 31: 387-396. doi: 10.1080/14786419.2016.1205052

TIAN LL, REN H, XI JM, FANG J, ZHANG JZ & WU QX. 2021. Diverse anti-inflammation and anti-cancer polyketides isolated from the endophytic fungi *Alternaria* sp. MG1. *Fitoterapia* 153, 105000. doi: 10.1016/j.fitote.2021.105000

UJAM N, AJAGHAKU DL, OKOYE FBC & ESIMONE CO. 2021. Antioxidant and immunosuppressive activities of extracts of endophytic fungi isolated from *Psidium guajava* and *Newbouldia laevis*. *Phytomedicine Plus* 1. DOI: 10.1016/J.PHYPLU.2021.100028

URQUHART A, HU J, CHOOI Y, IDNURM A. 2019. The fungal gene cluster for biosynthesis of the antibacterial agent viriditoxin. *Fungal Biol and Biotechnology* 6: 9. DOI: 10.1186/S40694-019-0072-Y

URREA-VICTORIA ET AL. 2016. Iron Reducing Power (FRAP) microplate antioxidant assay for algae extracts. Inst of Biosci, University of São Paulo. DOI: 10.13140/RG.2.2.24094.64322

VASSILEVA M, MALUSÀ E, SAS-PASZT L, TRZCINSKI P, GALVEZ A, FLOR-PEREGRIN E, SHILEV S, CANFORA L, MOCALI S, VASSILEV N. 2021. Fermentation Strategies to Improve Soil Bio-Inoculant Production and Quality. *Microorganisms* 9(6):1254. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061254>

VILA A, SULTAN AS, MONTELONGO-JAUREGUI D, JABRA-RIZK MA. 2020. Oral candidiasis: A disease of opportunity. *J Fungi* 6: 1-28. DOI: 10.3390/jof6010015

VISTICA VT, SKEHAN P, SCUDIERO D, MONKS A, PITTMAN A, BOYD MR. 1991. The trazolium-based assays for cell viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res* 51(10):2515-20

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. Geneva: WHO, 2017. Available from:

<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

XIAN P, CHEN H, FENG Z, ZHAO W & YANG X, 2020. Capsulatone: a new 4-hydroxy- α -pyrone derivative from an endophytic fungus *Penicillium capsulatum* and its antimicrobial activity. *J Asian Nat Prod Research* 23: 1100-1106. DOI: 10.1080/10286020.2020.1847092

YANG G, CHENG C, XU G, TANG L, CHUA K-L & YANG Y-Y. 2020. Synthesis and antibiofilm evaluation of 3-hydroxy-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one derivatives against opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Bioorg Med Chem* 28. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115606

YAZICI A, ÖRTÜCÜ S, TASKIN M. 2021. Screening and characterization of a novel Antibiofilm polypeptide derived from filamentous Fungi. *J Proteomics* 233. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.104075

ZHAO W ET AL. 2021. High pathogenicity island is associated with enhanced autophagy in pathogenic *Escherichia coli* HPI - infected macrophages. *Res Vet Sci*, 135: 113-120. DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.01.006

ZOU Y-W, WU Q-S, KUCA K. 2020. Unraveling the role of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating the oxidative burst of plants under drought stress. *Plant Biology*, 23(1): 50-57. DOI: 10.1111/plb.13161

How to cite

MAIA VRT, SILVA JKS, SAMPAIO EBT, SILVA MK, MOREIRA MAS, DUARTE
CKS, SILVA MNP, CÁRCERES MES, CAVALCANTI JG, QUEIROZ AC,
OLIVEIRA AJ & DUARTE AWF. 2023. Antimicrobial and antioxidant profile of
extracts of filamentous fungi isolated from Caatinga lichens. An Acad Bras Cienc...

Manuscript received on __, 2023;
accepted for publication on November __.

Correspondence to: Alysson Wagner Fernandes Duarte E-mail:
alysson.duarte@arapiraca.ufal.br

6 CONCLUSÕES

Com o passar do tempo as doenças infecciosas têm se estabelecido como algo comum.
A literatura reporta o crescente número de casos, assim como a gravidade dessas. No presente,

o uso de fármacos sintéticos é bastante indicado na terapêutica medicamentosa, mas, os efeitos adversos são bastante prejudiciais ao organismo humano, sobretudo se houver a necessidade de uso prolongado e de dosagem alta.

Fungos filamentosos que habitam locais extremos, como a Caatinga, possuem capacidade de ativar mecanismos bioquímicos e genéticos para a produção de metabólitos secundários, os quais funcionam como forma de adaptação e proteção. Ademais, esses compostos têm uma enorme variabilidade estrutural, o que viabiliza seu amplo espectro de atividades e funções.

Os bioensaios realizados e apresentados nesta dissertação com o intuito de investigar a potencialidade biotecnológica dos fungos filamentosos do bioma Caatinga, evidenciaram a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e antioxidante dos extratos fúngicos.

Os resultados propiciam o aprofundamento dos estudos farmacológicos do potencial ativo biológico dos extratos fúngicos, uma vez que inúmeros medicamentos antimicrobianos vêm perdendo a eficácia diante da resistência microbiana. Como também, dos ativos antioxidantes, pois possuem uma ampla aplicabilidade biotecnológica. Assim, é notória a relevância dos compostos bioativos oriundos dos fungos filamentosos da Caatinga e seus futuros benefícios ao organismo humano.

7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

É importante destacar, que mesmo diante de dificuldades, a equipe de pesquisa sempre buscou alternativas, soluções colaborativas e parcerias possíveis para o desenvolvimento das metodologias, o que viabilizou o desenvolvimento não só desta pesquisa, mas de diversas outras.

Outrossim, a obtenção de dados secundários relevantes para a pesquisa foi desafiadora, pois os fungos filamentosos do bioma Caatinga ainda são pouco estudados. Por outro lado, esse também é um item que faz parte das perspectivas, pois trata-se de uma fonte imensa de recursos a serem pesquisados e seus resultados já começam a fazer parte de um novo banco de dados.

Em pesquisas futuras recomenda-se a identificação molecular dos fungos filamentosos isolados para esta dissertação e o aprofundamento da caracterização de seus compostos bioativos. Bem como a avaliação da sua atividade diante de biofilmes de bactérias e fungos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL - RAZEK, A. S.; EL - GHONEMY, D. H.; SHAABAN, M. Production and purification of bioactive compounds with potent antimicrobial activity from a novel terrestrial fungus *Aspergillus* sp. DHE 4. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 28, 2020. DOI: 10.1016/j.bcab.2020.101726
- ABOUAMAMA S, ANIS B, ABIR S, MAROUA H & SIRINE B. Amylolytic and antibacterial activity of filamentous fungi isolated from the rhizosphere of different plants grown in the Tamanghasset region. **Heliyon**, v. 9, n. 3, 2023.
- AHMAD-MANSOUR N, LOUBET P, POUGET C, DUNYACH-REMY C, SOTTO A, LAVIGNE J-P & MOLLE V. *Staphylococcus aureus* Toxins: An Update on Their Pathogenic Properties and Potential Treatments. **Toxins**, v. 13, n. 10, 2021.
- AHMED AM, MAHMOUD BK, MILLÁN-AGUIÑAGA N, ABDELMOHSEN UR & FOUAD MA. The endophytic *Fusarium* strains: a treasure trove of natural products. **RSC Advances**, v. 13, n. 2, p. 1339-1369, 2022. DOI: 10.1039/d2ra04126j
- AKBARI, F.; KJELLERUP, B.V. Elimination of bloodstream infections associated with *Candida albicans* biofilm in intravascular catheters. **Pathogens**, v. 4, p. 457-469, 2015. DOI 10.3390/pathogens4030457.
- ALEXOPOULOS CJ, MIMS CW, BLACKWELL M. **Introductory Mycology**, 4th ed. John Wiley, New York. 1996.
- ALKHULAIIFI, M.; AWAAD, A.; AL-MUDHAYYIF *et al.* Evaluation of antimicrobial activity of secondary metabolites of fungi isolated from Sultanate Oman soil. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, p. 401-405, 2019. DOI 10.1016/J.JSPS.2018.12.009
- AMBUTSI, M.; OKOYH, P. Comparative genomic analysis of gene clusters of *Pseudomonas aeruginosa* that define specific biofilm formation in deciphering target regions for novel treatment Options. *Scientific African*, v. 13, 2021. DOI 10.1016/J.SCIAF.2021.E00910
- AMORIM ICS ET AL. Isolation of Filamentous Fungi from the Caatinga Region and Production of Amylolytic Enzymes of Great Industrial Interest. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 8, p. 152-164, 2020. DOI: 10.4236/jbm.2020.811014
- AMPARO, T. et al. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 30, p. 50-59, 2018. DOI: 10.14450/2318-9312.v30.e1.a2018.pp50-59
- ANDRADE, E.; GUERREIRO, M.; PALÁCIO H. et al. Ecohydrology in a Brazilian tropical dry forest: thinned vegetation impact on hydrological functions and ecosystem services. **Journal of Hydrology: Regional Studies**, v. 27, 2020. DOI 10.1016/j.ejrh.2019.100649
- ANDREATTI FILHO, L. R. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, v. 10, p. 112-117, 2007. ISBN 9788572416528

ANVISA - Agência de Vigilância Sanitária. Confirma os dados mundiais sobre resistência microbiana [Internet], 2021. Disponível em :

<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2021/confira-dados-mundiais-sobre-resistencia-microbiana>

AZAM, M.; KHAN, A. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, v. 24, p. 350-359, 2019. DOI 10.1016/j.drudis.2018.07.003

BABY J & THOMAS T. A review on different approaches to isolate antibiotic compounds from fungi. **Italian Journal of Mycology**, v. 50, p. 99-116, 2021.

BALLAV, S.; DASTAGER, S. G.; KERKAR, S. Biotechnological significance of Actinobacterial research in India. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, n. 4, p. 31-39, 2012. Disponível em:

<https://updatepublishing.com/journal/index.php/rrst/article/view/886>. Acesso em: 1 aug. 2022.

BARBOSA FR ET AL. Fungos anamórficos (Hyphomycetes) no Semi-árido do Estado da Bahia, Brasil. **Acta bot. bras.** v. 22, p. 29-36, 2008.

BARBOSA, F.; PINTO, E.; KIJJOA, A.; PINTO, M; SOUSA, E. Targeting antimicrobial drug resistance with marine natural products. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 56, 2020. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2020.106005

BARBOSA-SILVA, A. M.; SILVA, A. C. da; PEREIRA, E. C. G. BURIL, M. de L. L.; SILVA, N. H. da; CÁCERES, M. E. da S.; APTROOT, A.; BEZERRA-GUSMÃO, M. A. Richness of lichens consumed by *Constrictotermes cyphergaster* in the Semiarid Region of Brazil. **Sociobiology** v. 66, n. 1, p. 154-160, 2019. DOI

<https://doi.org/10.13102/sociobiology.v66i1.3665>

BATTISTELLA, A. C. **Atividades biológicas de *Pterocaulon angustifolium*, *Praxelis sanctopaulsensis* e *Disynaphia filifolia* e avaliação da ação conservante em emulsões.** 2020. 95 p. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Toledo, 2020. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/24450>. Acesso em: 30 jul. 2021.

BERDY, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. **The Journal of Antibiotics**, v. 65, p. 385-395, 2012. DOI: 10.1038/ja.2012.27

BHATTI, A. A.; HAQ, S.; BHAT, R. A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 458-467, 2017.

BOLOGA C.; URSU, O.; OPREA T.; III, C. E. M.; TEGOS, G. P. Emerging trends in the discovery of natural product antibacterials. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, p. 678-687. DOI: 10.1016/j.coph.2013.07.002

BONA EAMD, PINTO FGS, FRUET TK, JORGE TCM & MOURA AC. 2014. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, 81(3): 218-225. doi:10.1590/1808-1657001192012

BONTEN, M.; JOHSON, J. R.; VAN DEN BIGGELAAR, A. H. J. et al. Epidemiology of *Escherichia coli* bacteremia: a systematic literature review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, p. 1211-1219, 2021. DOI 10.1093/CID/CIAA2010

BOPARAI, J. K.; SHARMA, P. K. Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recente applications. **Protein & Peptide Letters**, v. 27, p. 4-16, 2019. DOI 10.2174/0929866526666190822165812

BOTELHO J., GROSSO F., PEIXE L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology and evolution. **Drug Resist Updat**, v. 44, p. 26-47, 2019. DOI 10.1016/j.drup.2019.07.002.

BOULEBD, H. Comparative study of the radical scavenging behavior of ascorbic acid, BHT, BHA and Trolox: Experimental and theoretical study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1201, 2020. DOI: 10.1016/j.molstruc.2019.127210

brasileiro: índice de desenvolvimento humano (IDH) das áreas propensas à desertificação. Universidade Estadual de Feira de Santana - Brasil, 2005.

BUÉE, M. et al. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal na unexpectedly high fungal diversity. **New Phytologist**, v. 184, p. 449-456, 2009. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x

CARUSO, T., CHAN, Y., LACAP, D. C., LAU, M. C., MCKAY, C. P.; POINTING, S. B. Stochastic and deterministic processes interact in the assembly of desert microbial communities on a global scale. **ISME J**, v. 5,p. 1406–1413, 2011. DOI:10.1038/ismej.2011.21

CARY, S. C., MCDONALD, I. R., BARRETT, J. E.; COWAN, D. A. On the rocks: the microbiology of Antarctic dry valley soils. **Nat Rev Microbiol**, v. 8,p. 129–138, 2010.

CASTRO, I., MENDO, S., CAETANO, T. Antibiotics from Haloarchaea: What Can We Learn from Comparative Genomics? **Marine Biotechnology**, v. 22, p. 308-316, 2020. DOI: 10.1007/s10126-020-09952-9

CAVALCANTE, M. Z. B.; DULTRA, D. F.da S.; SILVA, H. L. da C. et al. Potencial ornamental de espécies do Bioma Caatinga. **Comunicata Scientiae**, v. 8, p. 43-58, 2017. DOI: 10.14295/CS.v8i1.2649

CDC - Centers for Disease Control and Prevention;National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases;Division of Healthcare Quality Promotion. **COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2022. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/117915>. Acesso em: 1 ago. 2022.

CDC. COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2022. DOI:<https://dx.doi.org/10.15620/cdc:117915>
<https://www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html>

CHAKRABORTY A, MAJUMDAR S & BHOWAL J. 2021. Phytochemical screening and antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of different filamentous fungi. *Archives of Microbiology*, 203(10): 6091-6108. DOI: 10.1007/s00203-021-02572-4

CHANDRA N & KUMAR S. 2017. Antibiotics Producing Soil Microorganisms. In: Antibiotics And Antibiotics Resistance Genes In Soils. *Soil Biology* 51(11):1–18. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-66260-2>

CHANDRA, H.; KUMARI, P.; PRASAD, R. et al. Antioxidant and antimicrobial activity displayed by a fungal endophyte *Alternaria alternata* isolated from *Picrorhiza kurroa* from Garhwal Himalayas, India. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 33, 2021. DOI: 10.1016/j.bcab.2021.101955

CHANDRA, P.; SHARMA, R.; ARORA, D. Antioxidant compounds from microbial sources: A review. **Food Research International**, v. 129, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108849

CHEGINI, Z., KHOSHBAYAN, A., TAATI MOGHADAM, M. et al. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 19, n. 45, 2020. DOI 10.1186/s12941-020-00389-5

CHEN, Zheng et al. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH* assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, v. 138, n.1, p. 414-420, 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.001

CHEUNG GYC, BAE JS & OTTO M. 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1): 547-569, 2021. DOI 10.1080/21505594.2021.1878688

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S. & OTTO M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*, **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547-569, 2021. DOI 10.1080/21505594.2021.1878688

CHINSEMBU, K. C. Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. **Acta Tropica**, v. 154, p. 6-18, 2016.

COELHO, G. D.; SOUZA, J. P. de; LIMA, P. de A.; LINS, S. A. de A. Potencial de fungos da caatinga para produção de enzimas amilolíticas. **Revista Saúde & Ciência Online**, v. 7, p. 286-297, 2018. DOI: 10.35572/RSC.V7I2.641

CONAFER - Confederação Nacional de Agricultores Familiares e Empreendedores Familiares Rurais. Caatinga: o bioma mais rural do Brasil. Disponível em: <https://conifer.org.br/caatinga-o-bioma-mais-rural-do-brasil>. Acesso em: 9 agosto, 2022. contra *Candida* spp. **Recife: O Autor**, 2015.

COUTTOLENC et al. On the primary and secondary antioxidant activity from hydroxy-methylcoumarins: experimental and theoretical studies. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 33, p. 1-10, 2020. DOI: 10.1002/poc.4025

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010. DOI 10.1038/nrmicro2265. Erratum in: *Nat Rev Microbiol*, v. 11, n. 2, p. 141, 2013. PMID 19966814.

DADAR, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; SHAHALI, Y.; DHAMA K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. **Microb Pathog**, v. 117, p. 128-138, 2018. DOI 10.1016/j.micpath.2018.02.028

DANTAS-MEDEIROS, R. et al. Mass spectrometry characterization of Commiphora leptophloeos leaf extract and preclinical evaluation of toxicity and anti-inflammatory potential effect. **Journal of Ethnopharmacology journal**, v. 264, 2020. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113229

DASHTBAN, M. et al. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignina. *Int J Biochem Mol Bio*, v. 1, 36-50, 2010.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 74, p. 417–433, 2010. <https://doi.org/10.1128/membr.00016-10>

DE FARIA MJM, BRAGA CASB, DE PAULA JR, ANDRÉ MCDPB, VAZ BG, CARVALHO TC, ROMÃO W, DA COSTA HB, DA CONCEIÇÃO EC. 2017. Antimicrobial activity of *Copaifera* spp. against bacteria isolated from milk of cows with mastitis. **Cienc Anim Bras** 18: 1-14. DOI: 10.1590/1089-6891v18e-39068

DELEO FR, OTTO M, KREISWIRTH BN, et al. Community- associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Lancet**, v. 375, p. 1557–1568, 2010.

DENISSEN, J.; REYNEKE, B.; WASO-REYNEKE, M.; HAVENGA, B.; BARNARD, T.; KHAN, S.; KHAN, W. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. **Int J Hyg Environ Health**, v. 244, n. 114006, 2022. DOI 10.1016/j.ijheh.2022.114006

DING, A.; ZHENG, S.; HUANG, X.; XING, T.; WU, G.; SUN, H.; QI, S.; LUO, H. Current Perspective in the Discovery of Anti-aging Agents from Natural Products. **Natural products and bioprospecting**, v. 7, p. 335-404, 2017. DOI: 10.1007/S13659-017-0135-9

DUARTE AWF ET AL. 2018. Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. *Polar Biology* 41: 2511-2521. DOI:10.1007/s00300-018-2387-1

DUDA-CHODAK, A., TARKO, T. Possible Side Effects of Polyphenols and Their Interactions with Medicines. **Molecules**, v. 28, 2023. DOI: 10.3390/MOLECULES28062536

ELOFF JN. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica* 64:711-713. DOI. 10.1055/s-2006-957563

EMRI T, SZARVAS V, OROSZ E, ANTAL K, PARK H, HAN K-H, HU J-H & PÓCSI I. 2015. Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics*, 16(1). DOI: 10.1186/s12864-015-1705-z

FANESI, A. et al. Quantitative macromolecular patterns in phytoplankton communities resolved at the taxonomical level by single-cell Synchrotron FTIR-spectroscopy. **BMC plant biology**, v. 19, 2019. DOI: 10.1186/S12870-019-1736-8

FIERRO F, VACA I, CATILLO NI, GARCIA-RICO RO & CHAVEZ R. 2022. *Penicillium chrysogenum*, a Vintage Model with a Cutting-Edge Profile in Biotechnology. *Microorganisms*, 10: 573-591. DOI: 10.3390/microorganisms10030573

FREITAS, N. B. Dinâmica territorial e populacional no semi-árido brasileiro: índice de desenvolvimento humano (IDH) das áreas propensas à desertificação. **Universidade Estadual de Feira de Santana - Brasil**, 2005.

GARÁDI Z et al. 2021. Antimicrobial, Antioxidant and Antiproliferative Secondary Metabolites from *Inonotus nidus-pici*. *Molecules* (Basel, Switzerland) 26.

GARDA, A.; LION, M. B.; LIMA, S. M. de Q. et al. Os animais vertebrados do Bioma Caatinga. **Ciência e Cultura**, v. 70, p. 29-34, 2018.

GEDDES, A. 80th Anniversary of the discovery of penicillin. An appreciation of Sir Alexander Fleming. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. 373, 2008.

GHONMODE, W. N et al. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against *E. faecalis*—An in vitro study. **J Inter Oral Health**, v. 5, p. 61, 2013. PMID: [24453446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24453446/)

GOMEZ A et al. Synthesis and evaluation of novel furanones as biofilm inhibitors in opportunistic human pathogens. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 242, 2022.

GÓMEZ, A.; LYONS, T.; MAMAT, U. et al. Synthesis and evaluation of novel furanones as biofilm inhibitors in opportunistic human pathogens. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 242, 2022. DOI: 10.1016/J.EJMECH.2022.114678

GRUDMANN, D.; NÜBEL, U.; BRÖKER, B. M. Staphylococcus aureus toxins - Their functions and genetics. *Infection*. **Genetics and Evolution**, v. 21, p. 583-592, 2014.

HAAS LF. 1999. Papyrus of Ebers and Smith. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 67(5):578–578. doi:10.1136/jnnp.67.5.578

HADIDI, M.; ORELLANA-PALACIOS, J. C.; AGHABABAEI, F. et al. Plant by-product antioxidants: Control of protein-lipid oxidation in meat and meat products. **LWT**, v. 169, 2022. DOI: 10.1016/J.LWT.2022.114003

HAMEED A, HUSSAIN AS, YANG J, IJAZ UM, LIU Q, SULERIA HAR & SONG Y. 2017. Antioxidants potential of the filamentous fungi (*Mucor circinelloides*). *Nutrients*, 9(10). DOI: 10.3390/nu9101101

HARIONO, M.; JULIANUS, J.; DJUNARKO I. et al. The Future of Carica papaya Leaf Extract as an Herbal Medicine Product. **Molecules**, v. 26, p. 6922, 2021.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L.Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous Chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, p. 177-192, 2011. DOI: 10.1038/nrmicro2519

HIBBET et al. A Higher-level Phylogenetic Classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p. 509-547, 2007. DOI: 10.1016/j.mycres.2007.03.004

HUANG, M.; LU, J.; DING, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. **Natural products and bioprospecting**, v. 11, p. 5-13, 2021.

HUTCHINGS , M. I. , TRUMAN , A. W. , WILKINSON , B.. Antibiotics: past, present and future . **Curr. Opin. Microbiol.** v. 51, p. 72 – 80, 2019. [https:// doi. org/ 10. 1016/ j. mib. 2019. 10. 008.](https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008)

HYDE K et al. 2019. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity* 97: 1-136. DOI: 10.1007/s13225-019-00430-9

HYDE, K. et al, The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, v. 97, 2019. DOI: 10.1007/s13225-019-00430-9

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Biomass e sistema costeiro marinho do Brasil: compatível com a escala 1:250 000** / IBGE, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais. - Rio de Janeiro: IBGE, 2019. 168 p. (Relatórios metodológicos, ISSN 0101 - 2843; v. 45).

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapa de Biomass do Brasil - Primeira Aproximação, 2014. <https://brasilemsintese.ibge.gov.br/territorio.html>

JAKUBIEC-KRZESNIAK, K.; RAJNISZ-MATEUSIAK, A.; GUSPIEL, A.; ZIEMSKA, J.; SOLECKA, J. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. **Polish Journal of Microbiology**, v. 67, p. 259-272, 2018.

JAWALE, K. D., KAMAT, S. B., PATIL, J. A., NANJANNAWAR, G. S., CHOPADE, R. V. Grape seed extract: An innovation in remineralization. **Journal of Conservative Dentistry**, v. 21, p. 485–490, 2017. DOI: 10.4103/JCD.JCD

JIANG C, GE J, HE B & ZENG B. 2021. Glycosphingolipids in Filamentous Fungi: Biological Roles and Potential Applications in Cosmetics and Health Foods. *Frontiers in Microbiology*, 12. DOI: 10.3389/fmicb.2021.690211.

JURADO-MARTIN, I.; SAINZ-MEJIAS, M.; McCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. **International journal of molecular sciences**, v.22, p. 1-37, 2021. DOI: 10.3390/IJMS22063128

KAPER, J.; NATARO, J.; MOBLEY, H. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol**, v.2, p. 123-140, 2004. DOI: 10.1038/nrmicro818

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, p. 155-176, 2016.

KAUR, N. et al. Antibiofilm, antiproliferative, antioxidant and antimutagenic activities of an endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* from *Moringa oleifera*. **Molecular Biology Reports**, v. 47, p. 2901-2911, 2020. DOI: Molecular Biology Reports

KAVANAGH, K. Fungi : biology and applications. **Editorial Office. Hoboken, NJ**, 3 ed., p. 169-199, 2017.

KELLER, N. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nature reviews. Microbiology**, v. 17, 2019. DOI: 10.1038/S41579-018-0121-1

KLEVEN R. M.; MORRISON M. A., NADLE J., et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. **JAMA**, v. 298, p. 1763–71, 2007. DOI: 10.1001/JAMA.298.15.1763.

KONG, C.; NEOH H.; NATHAN S. Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. **Toxins**, v. 8, 2016. DOI: 10.3390/toxins8030072

LAUPLAND, K. B., LYYTIKÄINEN O., SØGAARD M., et al. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: a multinational population-based surveillance study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, p. 465-471, 2013. DOI: 10.1111/J.1469-0691.2012.03903.X

LEWIS, K. The Science of Antibiotic Discovery. **Cell**, v. 181, p. 29-45, 2020. DOI: 10.1016/J.CELL.2020.02.056

LI F, LIN S, ZHANG S, PAN L, CHAI C, SU JC, et al. 2020. Modified fusicoccane-type diterpenoids from *Alternaria brassicicola*. **J. Nat. Prod.** 83:1931–1938.

LI M, YU R, BAI X, WANG H & ZHANG H. 2019. Fusarium: a treasure trove of bioactive secondary metabolites†. **Natural Product Reports**, 37(12): 1568-1588. DOI: 10.1039/d0np00038h

LISBOA M. C., WILTSHIRE F. M. S., FRICKS A. T. et al. Oleochemistry potential from Brazil northeastern exotic plants. **Biochimie**, v. 178, p. 96-104, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.002>

LIU G. NIU S. E LIU L. 2021a. Alterchromanone A, one new chromanone derivative from the mangrove endophytic fungus *Alternaria longipes*. **J. Antibiot.** 74: 152–155.

LIU W-T, CHEN E-Z, YANG L, PENG C, WANG Q, XU Z, CHEN D-Q. 2021b. Emerging resistance mechanisms for 4 types of common anti-MRSA antibiotics in *Staphylococcus aureus*: A comprehensive review. **Microb Pathog**, 156.

LIU, D. et al. 2019. Two New Corticolous Buellioid Species from South Korea. **Mycobiology**, 47: 143–153.

LIU, Q. Why natural antioxidants are readily recognized by biological systems? 3D architecture plays a role! **Food Chemistry**, v. 380, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132143>

LOFTUS MJ ET AL. 2022. Epidemiology, antimicrobial resistance and outcomes of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in a tertiary hospital in Fiji: A prospective cohort study. **The Lancet Reg Health – West Pac** 22: 1-10.

LV N ET AL. 2021. Discovery of novel *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a inhibitors by multistep virtual screening and biological evaluation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters** 41:2-9. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.128001

MAGALHÃES, K.; GUARNIZ, W.; SÁ, K.M. et al. Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil: Ethnopharmacopeia (1980–1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 237, p. 314-353, 2019. DOI: 10.1016/j.jep.2019.03.032

MAGALHÃES, P.O.; LOPES, A.M.; MAZZOLA, P.G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T.C.V.; PESSOA, A.JR. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. **Journal Pharm. Pharmaceutic. Sci**, v. 10, p. 388-404, 2007. PMID: 17727802

MATTEI, A. S. et al. Sensibilidade de aislamientos de *Candida albicans* de hemocultivos a 3 fármacos: estudio retrospectivo en Rio Grande do Sul, Brasil, 1999 a 2009. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, p. 243-247, 2013. DOI: 10.1016/j.riam.2013.02.00

MELO, I. S. de. Biodiversidade e bioprospecção de micro-organismos da Caatinga. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-projetos/-/projeto/29362/biodiversidade-e-bioprospeccao-de-micro-organismos-da-caatinga>. Acesso em: 10 agosto, 2022.

MIAO Z. MA, YM, KONG, Y., YAN, MR E WANG, J. 2017. Study on alkaloid metabolites of a strain of *Alternaria* fungi. **Jiangsu Agric. ciência** 45: 314–316.

MOLELEKOA TBJ, REGNIER T, DA SILVA LS, AUGUSTYN W. 2021. Production of Pigments by Filamentous Fungi Cultured on Agro-Industrial by-Products Using Submerged and Solid-State Fermentation Methods. **Fermentation**, 7(4):295. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040295>

MORENO S, SCHEYER T, ROMANO CS & VOJNOV AA. 2006 Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free Radical Research**, Buenos Aires, 40:223-231. DOI: 10.1080/10715760500473834

MOTA, V. S., TURRINI, R. N. T., POVEDA, V. B. Atividade antimicrobiana do óleo de *Eucalyptus globulus*, xilitol e papaína: estudo piloto. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 49, p. 216–220, 2015. DOI: 10.1590/S0080-623420150000200005

MOURA, de P.; LIMA A. de T.; FERREIRA M.; et al. The relevance of actinobacteria as sources of antioxidant compounds: Evaluation of *Streptomyces* isolates from rhizosphere collected at Brazilian Caatinga. **Microbial and Natural Macromolecules**, cp. 16, p. 401-418, 2021. DOI: 10.1016/b978-0-12-820084-1.00017-x

MOURA, P. M.; ALTHOFF, T. D.; OLIVEIRA, R. A.; SOUTO, J. S.; et al. Carbon and nutrient fluxes through litterfall at four succession stages of Caatinga dry forest in Northeastern Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 105, p. 25-38, 2016.

MUNTEANU, I.; APETREI, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. **International journal of molecular sciences**, v. 22, 2021. PMID: 33806141

NAYAK, P.A.; NAYAK, U.A.; KHANDELWAL, V. The effect of xylitol on dental caries and oral flora. **Clinical, cosmetic and Investigational Dentistry**, v. 4, p. 89-94, 2014. DOI: 10.2147/CCIDE.S55761.

NCCLS/CLSI. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Difusão M2-A8. v. 23, n. 1, p. 58, 2003.

OLIVEIRA, L. G.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 95, p. 49-54, 2013. DOI: 0.1016/j.jaridenv.2013.03.007

OLIVEIRA, M. et al. Relevance of peroxiredoxins in pathogenic microorganisms. **Microbiology and Biotechnology**, v.105, p. 14-15, 2021. DOI: [10.1007/s00253-021-11360-5](https://doi.org/10.1007/s00253-021-11360-5)

ONOFRI, S. et al. Biodiversity of rock, beach and water fungi in Italy. *Plant Biosystems*, v. 145, 978-987, 2011. DOI: 10.1080/1126304.2011.633117

OTTAH, V. et al. Comparative analysis of alkaline-extracted hemicelluloses from Beech, African rose and Agba woods using FTIR and HPLC. **Heliyon**, v. 8, 2022. DOI: 10.1016/J.HELIYON.2022.E09714

PEIXOTO, A.L.; LUZ, J.R.P.; BRITO, M.A. Conhecendo a biodiversidade. **Brasília: Vozes**, 2016.

PEREIRA, F.; TEIXEIRA, A.; MEDEIROS DE F. Do essential oils from plants occurring in the Brazilian Caatinga biome present antifungal potential against dermatophytoses? A systematic review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 6559-6578, 2021. DOI: 10.1007/s00253-021-11530-5

PERINCHERRY L, URBANIAK M, PAWŁOWICZ I, KOTOWSKA K, WA'SKIEWICZ A & STĘPIEŃ N L. 2021. Dynamics of Fusarium Mycotoxins and Lytic Enzymes during Pea Plants' Infection. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(18). DOI: 10.3390/ijms22189888.

PIRES et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. **Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo**, p. 2-6, 2017. DOI: 10.13140/RG.2.2.27450.08640

PIRES J, TORRES PB, DANTOS DYAC & CHOW F. 2017. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**. DOI: [10.13140/RG.2.2.27450.08640](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27450.08640)

POLLACK, M. Pseudomonas aeruginosa. In: **MANDELL, G.L.; BERNNETT, J.E.; DOLIN, R. Principles and practice of infectious diseases**. 5 ed. New York: Churchill Livingstone, 2000.

PRESCOTT, J. F. The resistance tsunami, antimicrobial stewardship, and the golden age of microbiology. **Veterinary Microbiology**, v. 171, p. 273-278, 2014.

PULINGAM, T. et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 170, 2022. DOI: 10.1016/j.ejps.2021.106103

QUEIROZ, de L.; CARDOSO, D.; FERNANDES, M. et al. Diversity and evolution of flowering plants of the Caatinga Domain. Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America. **Capítulo 2**, p. 23-63, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-68339-3_2
RAFEEL, R., CARRINGTON, C. V. F., GOMEZ, A., HARKINS, D., TORRALBA, M., KUELBS, C. et al. Xylitol and sorbitol effects on the microbiome of saliva and plaque. **Journal of Oral Microbiology**, v. 11, 1 jan. 2019. DOI: 10.1080/20002297.2018.1536181

RAHMAN, M.; SATYAJIT, D. Antimicrobial natural products. **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 77-113, 2020. DOI: 10.1016/bs.armc.2020.06.001

RAI, Nilesh et al. Bioprospecting of fungal endophytes from *Oroxylum indicum* (L.) Kurz with antioxidant and cytotoxic activity. **PloS one**, v. 17, n. 3, 2022. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0264673

RANI, A. et al. Microorganisms: A Potential Source of Bioactive Molecules for Antioxidant Applications. **Molecules**, v. 26, 2021. DOI: 10.3390/MOLECULES26041142

RÉDUA, R. B., LORENZONI, B., FILHO, A. V., LAURENTE, R. L. Existe justificativa para o uso do xilitol na prevenção da cárie? Uma revisão de literatura. **Full Dentistry in Science**, v. 10, p. 128–134, 2019. DOI: 10.24077/2019;1040-128134

RIDAOU, K. et al. Comparative study of the antioxidant activity of the essential oils of five plants against the H₂O₂ induced stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 39, p. 1842-1852, 2021. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.10.040

ROCHA, S. L. S. **Deteção de fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* de granjas avícolas do RS através do Multiplex - PCR**. Dissertação de mestrado. Universidade do Rio Grande do Sul. 2008.

ROCHA, W. da; COSTA-SILVA T. A.; AGAMEZ-MONTALVO G. et al. Screening and optimizing fermentation production of l-asparaginase by *Aspergillus terreus* strain S-18 isolated from the Brazilian Caatinga Biome. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, p. 1426-1437, 2019.

ROMÃO, T. et al. Molecular and morphological diversity, qualitative chemical profile and antioxidant activity of filamentous fungi of the digestive tract of *Phylloicus* sp. (Trichoptera: Calamoceratidae). **Brazilian journal of biology**, v. 84, 2022. DOI: 10.1590/1519-6984.259983

SÁ PGS, GUIMARÃES AL, OLIVEIRA AP, FILHO JAS, FONTANA AP, DAMASCENO PKF, BRANCO CRC, BRANCO A & ALMEIDA JRGS. 2012. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, 33(4): 561-566.

SACCARO JUNIOR, N. L. A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, Brasília**, v. 14, p. 229-244, 2011.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C.. Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 429-438, 2017.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discovery Today*, v. 13, 3-4, 2008. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.10.010

SAMREEN et al. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. *Journal of global antimicrobial resistance*, v. 27, p. 101-111, 2021. DOI: 10.1016/J.JGAR.2021.08.001

SANTANA, R. C. F. de. Potencial biotecnológico de actinobactérias da coleção UFPEDA SANTIAGO PAL, SANTIAGO SRSS, AQUINO PF, NUNOMURA SM & NUNOMURA RCS. 2022. Avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos de fungos *Penicillium* spp. *Research, Society and Development*, 11(3). DOI: 10.33448/rsd-v11i3.26457

SANTOS M. O., RIBEIRO D. A., MACÊDO D. G. D. DE et al. Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the caatinga area, Northeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, p. 2767-2779, 2018.
<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201820170594>

SANTOS PS, SOLIDADE LS, SOUZA JGB, LIMA GS, BRAGA JR ACR, DE ASSIS FGV & LEAL PL. 2018. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para a produção de enzimas: uma revisão sistemática. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 4(2). DOI: 10.18540/jcecv14iss2pp0181-0188

SANTOS, A. L. S.; CARVALHO, I. M.; SILVA, B. A. et al. Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 46, n.2, p. 209-220, 2006. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2005.00023.x

SANTOS, F. de A. G. DOS et al. Anti-biofilm effect by the combined action of fluconazole and acetylsalicylic acid against species of *Candida parapsilosis* complex. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 84, 1 out. 2020b.

SANTOS, S. C. G. dos; BARONI, L. N.; NETA, M. R. de A. A.; LEAL-BALBINO, T. C.; ANDRADE-FIGUEIREDO, M. Epidemiologia molecular de *Staphylococcus aureus* no Brasil: elevada frequência de clones epidêmicos|pandêmicos, CA-MRSA e perspectivas futuras. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, p. 35734-35751, 2021.

SATARI HÁ, ZARGAR MI, SHAH WA, BANSAL R & BHAT MF. 2018. Isolation, molecular identification, phytochemical screening and *in vitro* anti-oxidant activity of endophytic fungi from *Achilea millefolium* Linn. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(4).

SAVIOLLI, J. Y. **Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga - STEC; *E. coli* aviária patogênica - APEC) de fragatas (*Fragata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo**. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, 2010.

SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Experimental Gerontology*, v. 35, n. 3, p. 307-316, 2000. DOI: 10.1016/s0531-5565(00)00098-x

SELBMANN, L. et al. Biodiversity, Evolution and adaptation of fungi in extreme environments. **Plant Biosystems**, v. 147, p. 237-246, 2013. DOI: 10.1080/11263504.2012.753134

SHARMA, D., PRAMANIK, A., & AGRAWAL, P. K. (2016). Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D. Don. 3 **Biotech**, 6(2). doi:10.1007/s13205-016-0518-3

SIDDEEG et al. Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 1633–1644, 2021. DOI: 10.1016/J.SJBS.2020.11.064

SILVA L.N., TRETIN T. DA S., ZIMMER K.R. et al. Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. **Pharmaceutical Biology**, v. 3, p. 464-468, 2015. DOI: 10.3109/13880209.2014.922587

SILVA, I.E.B. da; JARDIM, L.A. de S.; RIBEIRO, E.M. dos S.; LIMA, R.L.F. de A. Fungolândia: jogo educativo de tabuleiro sobre a diversidade e importância dos fungos da Caatinga. **Revista Brasileira de Educação Ambiental (RevBEA)**, v. 15, p. 52-99, 2020c. DOI: 10.34024/revbea.2020.v15.11449

SILVA, M. et al. Antarctic organisms as a source of antimicrobial compounds: a patent review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, p. 1-21, 2022. DOI: 10.1590/0001-3765202220210840

SILVA, R. R. Uso de geotecnologias para estimativas das emissões e remoções de gases de efeito estufa no Bioma Caatinga. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. **Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares**, Recife, 2019.

SIMITSOPOULOU, M. et al. Species-Specific and Drug-Specific Differences in Susceptibility of *Candida* Biofilms to Echinocandins: Characterization of Less Common Bloodstream Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.57, n.6, p.2562- 2570, 2013. DOI: 10.1128/AAC.02541-12

SINGH, A.; KUMAR, J.; SHARMA, V. et al. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of an endophytic *Fusarium proliferatum* (ACQR8), isolated from a folk medicinal plant *Cissus quadrangularis* L. **South African Journal of Botany**, v. 140, p. 87-94, 2021. DOI: 10.1016/j.sajb.2021.03.004

SOUZA, R.G.; MAIA, L.C.; SALES, M.F.; TRUFEM, S.F.B. Diversidade e potencial de infectividade de fungos micorrízicos arbusculares em área de caatinga, na Região de Xingó, Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, p. 49-60, 2003.

SUDENE – Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste. **Delimitação do Semiárido**, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/sudene/pt-br/centrais-de-conteudo/02-semiaridorelatorionv.pdf>. Acesso em: 9 agosto, 2022.

SUGIHARTO S. 2019. A review of filamentous fungi in broiler production. **Annals of Agricultural Sciences**, 64(1): 1-8. DOI: 10.1016/j.aogas.2019.05.005.

TACCONELLI, E.; CARRARA, E.; SAVOLDI, A.; HARBARTH, S.; MENDELSON, M.; MONNET, D.L.; PULCINI, C.; KAHLMETER, G.; KLUYTMANS, J.; CARMELI, Y.; et al.

Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 18, p. 318–327, 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3

TAVARES, D.G.; BARBOSA, B.V.L.; FERREIRA, R.L. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 148-154, 2018. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.07.031.

TEDERSOO, L. et al. 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. **The New Phytologist**, v. 188, 291-301, 2010. DOI: 10.1111/J.1469-8137.2010.03373.X

TENAILLON, O.; SKURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 207-217, 2010.

TIAN LL, REN H, XI JM, FANG J, ZHANG JZ & WU QX. 2021. Diverse anti-inflammation and anti-cancer polyketides isolated from the endophytic fungi *Alternaria* sp. MG1. **Fitoterapia** **153**, 105000. doi: 10.1016/j.fitote.2021.105000

TIAN, J., FU, L., ZHANG, Z., DONG, X., XU, D., MAO, Z., et al. 2017. Dibenzo- α -pyrones from the endophytic fungus *Alternaria* sp. Samif01: isolation, structure elucidation, and their antibacterial and antioxidant activities. **Nat. Prod. Res.** 31: 387–396.

UJAM, N. et al. Antioxidant and immunosuppressive activities of extracts of endophytic fungi isolated from *Psidium guajava* and *Newbouldia laevis*. **Phytomedicine Plus**, v. 1, 2021. DOI: 10.1016/J.PHYPLU.2021.100028

URQUHART A, HU J, CHOOI Y, IDNURM A. 2019. The fungal gene cluster for biosynthesis of the antibacterial agent viriditoxin. **Fungal Biol and Biotechnology** 6: 9.

URREA-VICTORIA et al. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, 2016. DOI: 10.13140/RG.2.2.24094.64322

VALIAKOS, E. et al. Ethnopharmacological approach to the herbal medicines of the “Antidotes” in Nikolaos Myrepsos’ *Dynameron*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, p. 68-82, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2015.01.005

VASSILEVA M, MALUSÀ E, SAS-PASZT L, TRZCINSKI P, GALVEZ A, FLOR-PEREGRIN E, SHILEV S, CANFORA L, MOCALI S, VASSILEV N. 2021. Fermentation Strategies to Improve Soil Bio-Inoculant Production and Quality. **Microorganisms**. 9(6):1254. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061254>

VILA, A.; SULTAN, A.S.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; JABRA-RIZK, M.A. Oral candidiasis: A disease of opportunity. **Journal of Fungi**, v. 6, p. 1-28, 2020. DOI: 10.3390/jof6010015

VISTICA VT, SKEHAN P, SCUDIERO D, MONKS A, PITTMAN A, BOYD MR. 1991. Tetr azolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Res.** 51(10):2515-20.

WAKSMAN, S.A., SCHATZ, A., REYNOLDS, D.M. Production of antibiotic substances by actinomycetes. **Ann NY Acad. Sci.**, v.1213, p. 112-124, 2010.

WANG, H.; HOU, X; SHEN, J., *et al.* Alternative sigma factor B reduces biofilm formation and stress response in milk-derived *Staphylococcus aureus*. **LWT**, v. 162, 2022. DOI: 10.1016/J.LWT.2022.113515

WANG, K. et al. Distribution, horizontal transfer and influencing factors of antibiotic resistance genes and antimicrobial mechanism of compost tea. **Journal of Hazardous Materials**, v. 438, 2022. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2022.129395L

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. Geneva: WHO, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. **Geneva: WHO**, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne Dis. Burd. Epidemiol. Ref. Gr. 268, 2018. Disponível em: https://reliefweb.int/report/world/estimates-global-burden-foodborne-diseases?gclid=CjwKC AjjwvNaYBhA3EiwACgndghA_Zxp-z9BHk3frSjBEwAllvqjF89-rPnlXmGnTChof6-9qb94BXRoCOcMQAvD_BwE

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial Resistance [Internet]. Geneva: WHO; 2021. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>

WU, C.D. Grape products and oral health. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 9, p. 3–8, 2009. DOI: 10.3945/jn.109.107854

XIAN P, CHEN H, FENG Z, ZHAO W & YANG X, 2020. Capsulatone: a new 4-hydroxy- α -pyrone derivative from an endophytic fungus *Penicillium capsulatum* and its antimicrobial activity. **Journal of Asian Natural Products Research**, 23: 1100-1106. DOI: 10.1080/10286020.2020.1847092

YANG, G.; CHENG, C.; XU, G. et al. Synthesis and antibiofilm evaluation of 3-hydroxy-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-one derivatives against opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 28, 2020. DOI: 10.1016/j.bmc.2020.115606

YAZICI A, ÖRTÜCÜ S, TASKIN M. 2021. Screening and characterization of a novel Antibiofilm polypeptide derived from filamentous Fungi. **Journal of Proteomics** 233.

ZHANG, Y. et al. Biotechnological production of zeaxanthin by microorganisms. Trends in **Food Science and Technology**, v. 71, 2018. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.11.006

ZHAO, W.; GAO, B.; LIU, C.; et al. High pathogenicity island is associated with enhanced autophagy in pathogenic *Escherichia coli* HPI - infected macrophages. **Research in Veterinary Science**, v. 135, p. 113-120, 2021. DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.01.006

ZOU Y-W, WU Q-S, KUCA K. 2020. Unraveling the role of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating the oxidative burst of plants under drought stress. **Plant Biology**, 23(1): 50-57. DOI: 10.1111/plb.13161