



Potencial antibacteriano de extratos eliciados dos fungos endofíticos *Sordaria tamaensis* (TB1) e TB3 ambos associados à espécie vegetal *Tocoyena bullata*

**Caroline Mourão Campos
Outubro 2022**

Caroline Mourão Campos

Potencial antibacteriano de extratos eliciados dos fungos endofíticos *Sordaria tamaensis* (TB1) e TB3 ambos associados à espécie vegetal *Tocoyena bullata*

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia do
Instituto de Ciências Farmacêuticas - Centro
Multidisciplinar UFRJ-Macaé como requisito
para obtenção do título de farmacêutico

Orientador(a) Profa Dra Denise Oliveira Guimarães
Co orientador(a) Juliana Givisiez Valente

Outubro de 2022

CIP - Catalogação na Publicação

C198

Campos, Caroline Mourão

Potencial antibacteriano de extratos eliciais dos fungos endofíticos *Sordaria tamaiensis* (TB1) e TB3 ambos associados à espécie vegetal *Tocoyena bullata* / Caroline Mourão Campos - Macaé, 2022.

93 f.

Orientador(a): Denise Oliveira Guimarães.

Coorientador(a): Juliana Givisiez Valente.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Farmacêuticas, Bacharel em Farmácia, 2022.

1. Resistência microbiana a medicamentos. 2. Produtos biológicos.
3. *Staphylococcus aureus*. 4. *Escherichia coli*. I. Guimarães, Denise Oliveira orient.
II. Valente, Juliana Givisiez, coorient. III. Título.

CDD 615.32

Potencial antibacteriano de extratos eliciados dos fungos endofíticos *Sordaria tamaensis* (TB1) e TB3 ambos associados à espécie vegetal *Tocoyena bullata*

Caroline Mourão Campos

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado como requisito para obtenção do grau de farmacêutico

Macaé, em 19 de outubro de 2022

Comissão avaliadora:

Prof^a Dra Denise Oliveira Guimarães (Presidenta da banca)

CM UFRJ-Macaé

<http://lattes.cnpq.br/3655111598408217>

Prof^a Dra Marina Cardoso Nemitz

CM UFRJ-Macaé

<http://lattes.cnpq.br/4337263185352442>

Doutoranda Stella Schuenck Antunes

CM UFRJ-Macaé

<http://lattes.cnpq.br/4732589982048083>

Dedico esse trabalho a toda a minha família, em especial às minhas avós Iza e Ieda e ao meu avô Cristovão que sempre foram meus maiores apoiadores e exemplo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais Livio e Beatriz, que me deram a vida e sempre me apoiaram em todas as minhas decisões nessa longa caminhada, obrigada por confiarem em mim.

A minha madrasta Viviane pelos bons conselhos, risadas e companheirismo, obrigada por fazer parte de mais esse ciclo.

Ao meu padrasto Rodrigo pelas inúmeras caronas em todos os turnos possíveis, obrigada pela parceria.

A minha avó Ieda, que sempre foi minha maior incentivadora para o mundo da leitura desde sempre e contribuiu de todas as formas possíveis na minha formação pessoal e profissional, sei que grande parte da mulher que me tornei foi por sua causa.

Aos meus avós Iza e Cristovão que são meu exemplo de amor e parceria e me apoiam muito em cada passo que eu dei até aqui, obrigada por me darem um lar, essa conquista é mais de vocês do que minha.

A Joana e Jacira que nessa caminhada foram exemplos de amor e força, sempre me acolhendo como neta.

Aos meus irmãos, Vitor, Lara e Bárbara que sempre foram meu refúgio quando eu precisei, obrigada por tornarem esse ciclo mais leve.

Aos meus primos e tios que contribuíram direta e indiretamente me ajudando em algum trabalho, formatação, caronas ou até mesmo em algum momento de distração, vocês fazem parte dessa conquista.

Ao meu avô Romulo Campos que gentilmente me cedeu as imagens da *Tocoyena bullata*, que ele registrou em suas expedições pela restinga.

A minha orientadora Denise, sem ela nada disso seria possível, obrigada pela paciência e dedicação, foi uma honra ser sua aluna durante esses 2 anos, onde me ensinou muito mesmo em tempos difíceis de pandemia, sempre mantendo a esperança de que tudo ia melhorar.

Aos alunos do grupo de microrganismos em especial a Juliana que foi responsável por parte das amostras utilizadas no trabalho, por sempre me orientarem e ajudarem em tudo que eu precisei.

A Mara que dividiu tudo comigo durante esses anos de graduação, inclusive a orientadora e as amostras para testar, obrigada pela parceria de sempre.

A Bianca que sempre foi minha fiel escudeira e me aguentou durante todos esses anos em todas as situações, obrigada por tudo.

As minhas amigas Sara e Kariny que desde os 13 anos caminham junto comigo e sempre estiveram presentes quando eu precisei, obrigada por nunca desistirem de mim.

A PIBIC pela bolsa concedida ao trabalho.

E por fim a todas as pessoas que estão envolvidas direta ou indiretamente na minha formação, sou grata a cada um, essa conquista é nossa.

*“Talvez queira o impossível
Daquilo que não é visível
Do que está nas entranhas.”*

(Iêda Moraes)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais mecanismos de resistência bacteriana.....	21
Figura 2 - A) Porcentagem resistência bacteriana de origem na comunidade por países e territórios nas Américas B) Porcentagem resistência bacteriana de origem hospitalar por países e territórios nas Américas.....	23
Figura 3 - Gráfico representando o número de isolamentos de bactérias resistentes no Brasil levando em consideração os patógenos <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> e o ano.....	24
Figura 4 - Mortes mundiais atribuídas e associadas a uma bactéria resistente causadas por uma síndrome infecciosa no ano de 2019.....	25
Figura 5 - Porcentagem de cepas de <i>S. aureus</i> resistentes à meticilina isolados na Europa em 2019.....	26
Figura 6 - Porcentagem de cepas de <i>E. coli</i> resistentes a aminopenicilinas isoladas na Europa em 2019.....	26
Figura 7 - Principais microrganismos isolados em infecções na corrente sanguínea em UTI adulto no RJ no ano 2019.....	28
Figura 8 - Principais microrganismos isolados em infecções do trato urinário em pacientes adultos em UTI no RJ no ano de 2019.....	29
Figura 9 - Gráfico de barras representando os fármacos aprovados para o tratamento de câncer e sua origem.....	31
Figura 10 - Estruturas químicas correspondentes a sinvastatina, amoxicilina, lovastatina, pravastatina, cefaclor, ceftriaxona, atorvastatina.....	32
Figura 11 - Gráfico de fármacos antibacterianos aprovados de 2015 a 2019..	33
Figura 12 - Vista aérea de uma das lagoas que o PARNA Jurubatiba abriga..	36
Figura 13 - <i>Tocoyena bullata</i> , popular: marmelo da praia, marmelada da praia, araçarana, louro do brejo, jenipapo bravo.....	37
Figura 14 - Estratégias para ampliação da obtenção de metabólitos secundários.....	43
Figura 15 - Estrutura química da pestalona.....	44
Figura 16 - Fluxograma partição Líquido-Líquido.....	49

Figura 17 - A) Cultura do fungo <i>Sordaria tamaensis</i> imagem cedida pela doutoranda Juliana Givisiez B) Cultura do fungo TB3 imagem cedida pela mestranda Mara Beltran.....	50
Figura 18 - Redução resazurina a resofurina.....	51
Figura 19 - Fluxograma do ensaio de microdiluição em caldo para cálculo da concentração mínima inibitória.....	52
Figura 20 - Cromatograma de íons totais da fração hexânica do extrato eliciado com sinvastatina do fungo TB1.....	59
Figura 21 - Cromatograma do branco do arroz obtido através de análise CG-EM.....	59
Figura 22 - Espectro de massa do tempo de retenção presente na substância majoritária obtido através de análise CG-EM.....	60
Figura 23 - Espectro de massas obtido pela base de dados do software utilizado na análise do extrato 3 B JG obtido através de análise CG-EM.....	60
Figura 24 - Estrutura ácido cis vacênico.....	60
Figura 25 - Cromatograma de íons totais 1ATB3 obtido através de análise CG-EM.....	61
Figura 26 - Espectro de massas do tempo de retenção do pico majoritário obtido após a análise do extrato 1ATB3 em CG-EM	61
Figura 27 - Espectro de massas oriundo da base de dados do software utilizado para análise do extrato 1ATB3 obtido através de análise CG-EM.....	62
Figura 28 - Estrutura heneicosano.....	62
Figura 29 - Gráfico representando a porcentagem de substâncias novas descobertas e a porcentagem de aumento da concentração de substâncias conhecidas.....	74
Figura 30 - Gráfico representando a porcentagem de substâncias que tiveram sua concentração aumentada através da eliciação.....	74
Figura 31 - Gráfico representando os eliciadores mais utilizados quando havia aumento de concentração de substâncias já conhecidas.....	75

Figura 32 - Gráfico representando os eliciadores mais utilizados quando há 76
produção de novas moléculas.....

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Porcentagem de resistência no Brasil a <i>S. aureus</i> no ano de 2016.....	24
Quadro 2 - Exemplos de substâncias produzidas por fungos endofíticos e sua atividade.....	40
Quadro 3 - Códigos representando os extratos brutos e frações para o fungo <i>Sordaria tamaensis</i>	54
Quadro 4 - Códigos utilizados para os extratos brutos e frações do fungo TB3.....	55
Quadro 5 - Resultados obtidos na busca das bases de dados.....	64

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
AS	ácido salicílico
ATCC	<i>American Type of Culture Collection</i>
CECIH-RJ	Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CIM	concentração inibitória mínima
CIP	ciprofloxacino
CLI	clindamicina
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CPT	camptotecina
DMSO	dimetilsulfóxido
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
FDA	Food and Drug Administration
FOX	cefoxitina
GEN	gentamicina
Ha	Hectares
HCPT	hidroxicamptotecina
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU	Infecção do trato urinário
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	oxacilina
PARNA Jurubatiba	Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba
SAHA	Ácido suberoilânilida hidroxâmico
SXT	sulfametoxazol trimetoprim

TB1	código do fungo <i>Sordaria tamaensis</i> associado a planta <i>Tocoyena bullata</i>
TB3	código de fungo associado a planta <i>Tocoyena bullata</i> , ainda não identificado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Resistência bacteriana.....	18
1.2 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS).....	27
1.3 Importância dos produtos naturais à saúde humana.....	29
1.4 Restinga de Jurubatiba.....	34
1.5 Microrganismos como produtores de substâncias bioativas.....	37
1.6 Fungos endofíticos.....	38
1.7 Estratégias de ampliação da produção de substâncias de interesse.....	41
2. JUSTIFICATIVA.....	45
3. OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivos gerais.....	46
3.2 Objetivos específicos.....	46
4. MATERIAL E MÉTODO.....	47
4.1 MATERIAL.....	47
4.1.1 Materiais plásticos.....	47
4.1.2 Vidrarias.....	47
4.1.3 Reagentes.....	47
4.1.4 Equipamentos.....	47
4.1.5 Materiais biológicos.....	47
4.2 MÉTODOS.....	48
4.2.1 Obtenção das amostras do fungo TB1 (<i>Sordaria tamaensis</i>).....	48
4.2.2 Amostra eliciada com <i>M. bovis</i> e <i>M. marinus</i>	48
4.2.3 Amostra eliciada com sinvastatina.....	48
4.2.4 Partição Líquido-líquido.....	48
4.2.5 Amostras do fungo TB3.....	49
4.2.6 Metodologia ensaio de concentração mínima inibitória (CIM).....	50
4.2.7 Ensaios com os extratos brutos e frações de TB1 (<i>Sordaria tamaensis</i>) e TB3.....	52
4.2.8 Ensaios com o fungo TB3.....	54
4.2.9 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).....	55
4.2.10 Revisão bibliográfica.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1 Ensaios com os extratos brutos do TB1.....	56
5.2 Ensaios com as frações.....	56
5.3 Ensaios com o fungo TB3.....	58
5.4 Análise dos cromatogramas.....	58
5.4.1 Cromatogramas <i>Sordaria tamaensis</i>	58
5.4.2 Cromatogramas TB3.....	60
5.5 Revisão bibliográfica.....	63

6. CONCLUSÃO.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
8. ANEXOS.....	84
8.1 Anexo 1.....	84
8.2 Anexo 2.....	85
8.3 Anexo 3.....	86

RESUMO

Atualmente, a preocupação acerca de resistência bacteriana a antibióticos cresceu, visto que essa resistência ameaça a eficácia no tratamento de uma quantidade cada vez maior de infecções. A partir disso, o foco na exploração de produtos naturais na busca de novos antibacterianos é de extrema importância, visto que são potenciais tratamentos para cepas multirresistentes. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antibacteriano de extratos do fungo endofítico *Sordaria tamaensis* (TB1) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e do fungo TB3, ainda não identificado, frente a cepas sensíveis de *Staphylococcus aureus* por meio do ensaio de concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo. Os extratos a serem testados foram: o controle contendo somente o fungo puro crescido em arroz, o extrato obtido a partir da cultura do fungo acrescido de sinvastatina no meio arroz, o extrato eliciado com *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium marinum* autoclavadas, além disso as frações obtidas em acetato de etila, hexano, butanol e aquosa a cada um dos eliciados, para o fungo TB1, para o fungo TB3, a eliciação foi realizada somente com *M. bovis*. O meio sólido de arroz foi utilizado para a fermentação das culturas do fungo por um período de 21 dias, 30 °C. O ensaio de microdiluição em caldo, realizado nas concentrações de 512, 256, 128, 64 e 32 µg/mL para cada uma das 20 amostras testadas. Nenhuma amostra conseguiu inibir o crescimento da *E. coli*, enquanto para *S. aureus* a fração hexânica da cultura realizada com sinvastatina para o fungo TB1 obteve sucesso na maior concentração testada de 512 µg/mL. Já para os ensaios realizados com o fungo TB3, a fração hexânica conseguiu inibir o crescimento da cepa nas concentrações de 512, 256, 128 e 64 µg/mL. Após análise em CG-EM das frações ativas foi obtido que ácidos graxos foram responsáveis pela inibição do crescimento bacteriano.

Palavras-chave: Eliciação; microdiluição em caldo; produtos naturais microbianos; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*

ABSTRACT

There is a continuous worry towards bacterial resistance to antibiotics, since this resistance threatens the efficiency of the treatment of an increasing number of infections. The focus on the exploration of natural products in the search for new antibacterials is extremely important, since they are potential treatments for multidrug-resistant strains. The present work aims to evaluate the antibacterial potential of extracts of the endophytic fungus *Sordaria tamaensis* (TB1) against strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and of the fungus TB3, not yet identified, against susceptible strains of *Staphylococcus aureus* by carrying out the assay of minimum inhibitory concentration by the broth microdilution method. The extracts to be tested were: the control containing only the pure fungus grown in rice, the extract obtained from the fungus culture plus simvastatin in the rice medium, the extract elicited with autoclaved *Mycobacterium bovis* or *M. marinum*, in addition to the fractions obtained in ethyl acetate, hexane, butanol and aqueous to each one of the elicited, for the fungus TB1, for the fungus TB3, the elicitation was performed only with *M. bovis*. The solid rice medium was used to ferment the fungus cultures for a period of 21 days at 30 °C. The broth microdilution assay, performed at concentrations of 512, 256, 128, 64 and 32 µg/mL for each of the 20 samples tested. No sample was able to inhibit the growth of *E. coli*, while in *S. aureus* the hexane fraction of the culture performed with simvastatin for the TB1 fungus was successful at the highest tested concentration of 512 µg/mL. As for the tests carried out with the TB3 fungus, the hexane fraction was able to inhibit the growth of the strain at concentrations of 512, 256, 128 and 64 µg/mL. After GC-MS analysis of the active fractions, it was found that fatty acids were responsible for inhibiting bacterial growth.

Keywords: Elicitation; Broth Microdilution; Microbial natural products; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*

1. INTRODUÇÃO

1.1 Resistência bacteriana

Problemas com infecções denominadas hospitalares datam de 325 d.C, quando os enfermos eram abrigados em um mesmo local e acabavam se contaminando em conjunto. A partir do século XIX foram implantados parâmetros para melhorar a assepsia e diminuir as infecções (TEIXEIRA et al, 2019). No século XVII os microrganismos foram identificados por van Leeuwenhoek, depois da invenção do microscópio, no entanto a ideia de que bactérias seriam causadoras das infecções só foi cogitada no século XIX, após os experimentos de Pasteur, que observou que nem todas as cepas de bactérias causavam doenças (GUIMARÃES et al, 2010).

Somente em 1928 ocorreu a descoberta do primeiro antibiótico, a penicilina, acidentalmente por Alexander Fleming no laboratório do hospital St Mary's em Londres, enquanto trabalhava com uma cultura de *Staphylococcus* percebeu a presença de uma contaminação por um fungo e constatou que ocorreu a morte da bactéria, depois disso o pesquisador isolou o fungo e descobriu que pertencia ao gênero *Penicillium* e além disso, percebeu a eficiência em inibir o crescimento de diversas bactérias comuns ao ser humano (GOODMAN E GILMAN, 2010).

No ano de 1947 os antibióticos foram descritos por Waksman como substâncias que são obtidas de microrganismos e que podem levar a morte ou interromper o crescimento de outros microrganismos. Segundo a ANVISA, antibióticos são substâncias que previnem o crescimento bacteriano e também podem levar à morte de bactérias. Com isso foi observado que os antibióticos podem apresentar dois tipos de atividades: bactericidas, quando conseguem matar a bactéria e bacteriostáticos, quando impedem a continuação do crescimento da bactéria (ANVISA, 2011; VERMA et al, 2022).

A descoberta da penicilina revolucionou o tratamento de doenças infecciosas, uma vez que na época havia uma grande necessidade de tratamento para os feridos da segunda guerra mundial e a descoberta dessa substância diminuiu consideravelmente o número de mortes deste tipo. Porém o grande sucesso da terapia empregada com a penicilina, levou a uma falsa impressão que essa

medicação seria suficiente para erradicar todas as doenças infecciosas (CALIXTO et al, 2012; SANTOS, 2004).

Já no ano de 1945, o próprio Fleming alertou para a resistência bacteriana devido a utilização excessiva de antibióticos e a dependência deles para o tratamento de infecções. Por conta do seu uso excessivo e indiscriminado, a penicilina passou a ser usada para dores e febre, o que levou a aparição de cepas *S. aureus* resistentes à penicilina, que passaram a produzir a enzima beta lactamase, ocasionando uma grande epidemia hospitalar desses microrganismos, que estava presente principalmente em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e na pediatria (CABRAL et al, 2018; SANTOS, 2004; LIMA et al, 2017).

A resistência bacteriana ocorre por conta do uso indiscriminado de antibióticos e sua ampla disseminação no ambiente, o que faz com que as bactérias criem mecanismos para escapar dessas substâncias e evitar sua morte. Como são organismos que apresentam facilidade em trocar material genético mesmo entre diferentes espécies, acabam tendo alta capacidade de adaptação frente a adversidades (GUIMARÃES et al, 2010).

No Brasil o uso indiscriminado de antibióticos se deve por alguns fatores, como por exemplo o alto número de farmácias e a dificuldade na fiscalização das mesmas, o que acaba por permitir que aconteçam vendas de medicamentos sem receita, além disso a dificuldade no diagnóstico de infecções virais ou bacterianas, onde no final ambas acabam sendo tratadas com antibióticos, sem saber se era realmente necessário. Além disso, a falta de interesse do governo na criação de campanhas para conscientização da população acerca da gravidade do problema que é o uso indiscriminado de antibióticos (LIMA et al, 2017).

Como existem diversos tipos de antibióticos, com variados mecanismos de ação, as bactérias também apresentam diferentes mecanismos de resistência, que em sua maioria ocorre devido a três principais motivos: 1-mudança na permeabilidade da membrana celular, o que acarreta o bloqueio da entrada do antibiótico ou sua expulsão da célula , 2- as bactérias podem adquirir a capacidade de inativar ou degradar o antibiótico ou 3- a aparição de uma mutação que irá mudar o alvo do antibiótico assim o novo alvo não sofrerá nenhuma ação da medicação. A figura 1 apresenta um fluxograma com os principais mecanismos de resistência bacteriana (LIMA et al, 2017).

Basicamente existem dois mecanismos para ocorrer mudanças nas barreiras de permeabilidade da bactéria: o efluxo ativo onde as bactérias ejetam o antibiótico para fora da célula e a entrada diminuída, que gera uma queda na entrada de antibiótico na célula. (SUSSMANN et al, 2002)

No mecanismo de inativação do antibiótico ocorrerá a produção de enzimas que hidrolisam o antibiótico antes que cause algum efeito na bactéria e essas enzimas são classificadas de acordo com a sua forma de produção em: a) Por localização genética; b) Por exposição genética; c) Por produção primária; d) Por substrato principal. Já no mecanismo de alteração do alvo do antibiótico sítios específicos de resistência serão mudados (parede celular, subunidades ribossomais), o que acarreta na inativação do antibiótico. (SUSSMANN et al, 2002)

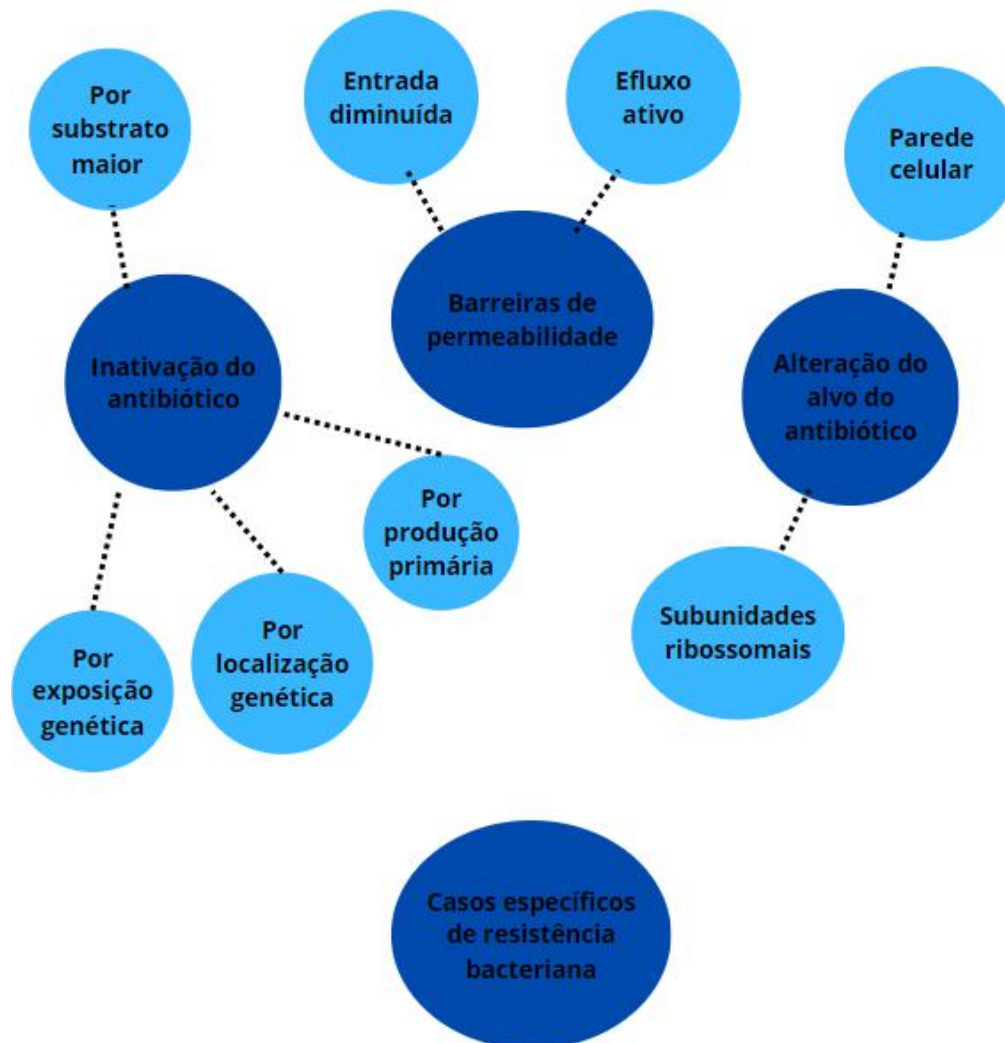


Figura 1 - Principais mecanismos de resistência bacteriana

Fonte: SUSSMANN et al, 2002

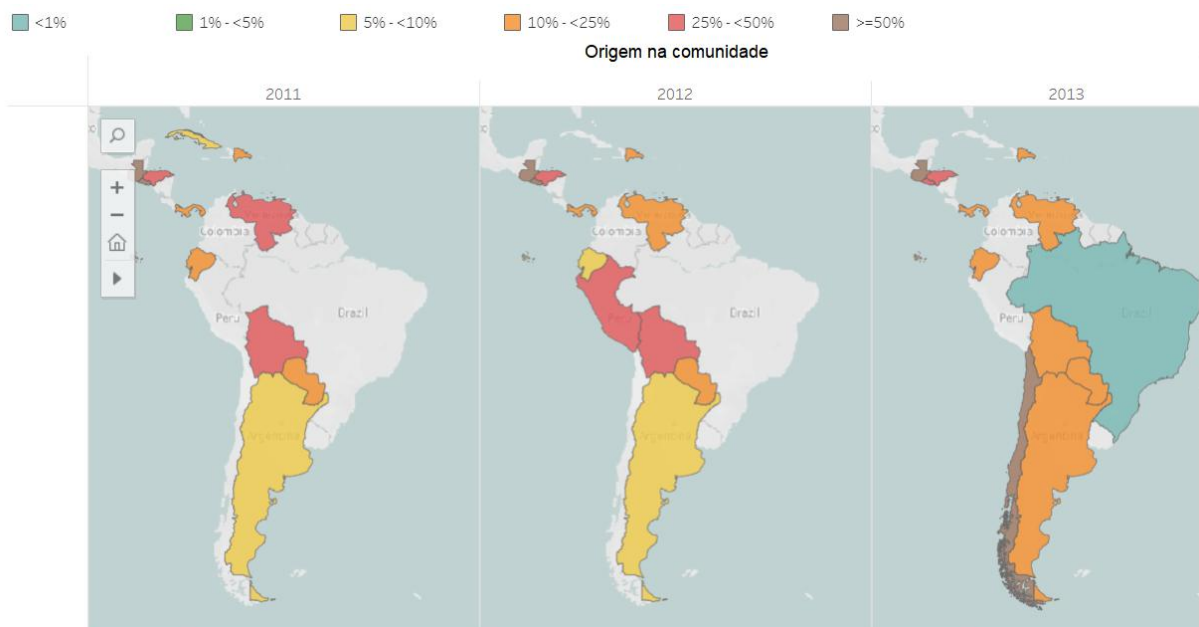
Por conta dos fatores citados acima, a descoberta de novos fármacos para tratar essas infecções resistentes é de extrema importância para a sociedade, visto que cresce cada vez mais o número de mutações nesses microrganismos, o que dificulta ainda mais o tratamento, além de encarecer e se tornar desgastante, tanto para a equipe de saúde quanto para o paciente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a implementação de um programa melhor para higiene das mãos, promoção do uso apropriado de antibióticos e higiene ambiental pelos países da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) diminuiria em

85% a carga de saúde para resistência antimicrobiana, além de gerar uma economia de 0,7 euros per capita por ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

O mapa apresentado abaixo, na figura 2, foi retirado da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e representa o percentual de *Staphylococcus aureus* resistentes por país. O primeiro mapa apresentado na figura abaixo se refere a bactérias resistentes presente na comunidade e é possível observar que o Brasil, nesse quesito, no ano de 2013 apresentou um índice menor que 1%, sendo o país com a menor porcentagem apresentada neste ano, atrás de Argentina, Bolívia, Paraguai, Venezuela e Equador, que apresentaram porcentagens de resistência entre 10 e 25%.

Já no segundo mapa, onde representa-se a porcentagem de bactérias resistentes provenientes do ambiente hospitalar, o Brasil apesar de não apresentar a maior porcentagem de resistência, ainda assim apresenta um índice significativo, junto com Argentina, Paraguai e Venezuela tem uma porcentagem de resistência entre 10 e 25% para *S. aureus*.

A)



B)

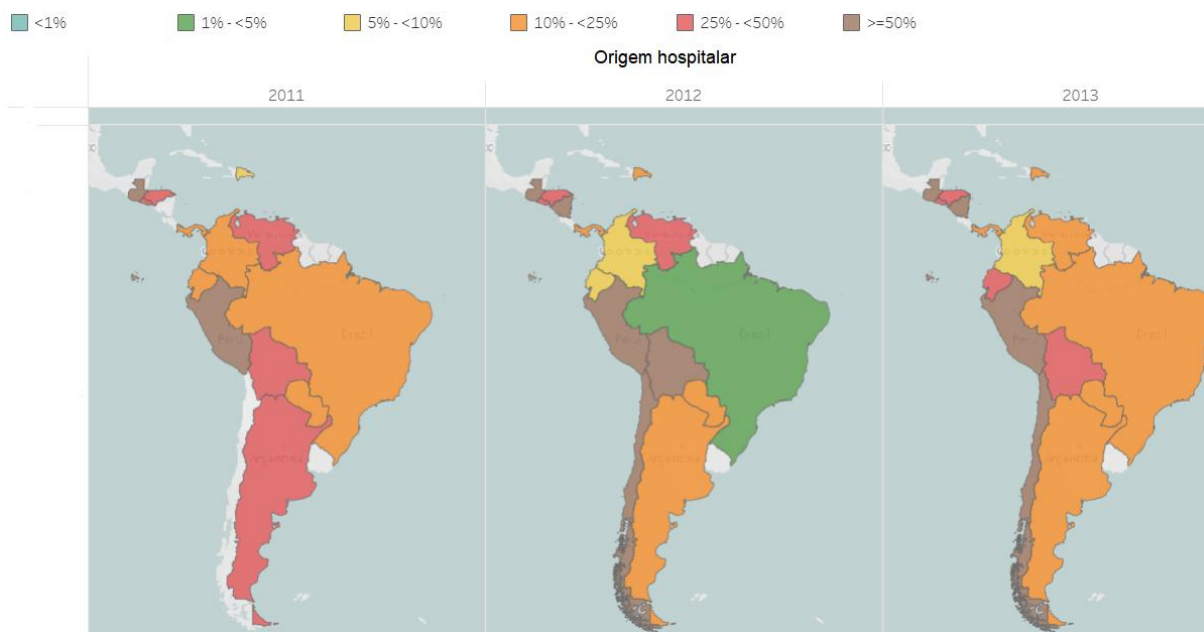


Figura 2- A) Porcentagem resistência bacteriana de origem na comunidade por países e territórios nas Américas B) Porcentagem resistência bacteriana de origem hospitalar por países e territórios nas Américas

Fonte: Adaptado Organização Pan-americana de Saúde

Os dados apresentados no quadro 1, também retirado da Organização Pan-americana de Saúde, demonstra a porcentagem de resistência dos *S. aureus* em 2016 no Brasil, a determinados antibióticos. Onde é possível observar que quando se trata de infecções de origem na comunidade não há dados disponíveis, no entanto quando é de origem hospitalar para esse microrganismo o antibiótico que mais apresentou resistência foi a clindamicina, com 48,5%, seguido por oxacilina com 33,1% e cefoxitina com 32,9%. Um panorama alarmante, visto que esses antibióticos foram criados justamente para combater a resistência e agora apresentam um percentual de resistência bastante significativo.

Quadro 1 - Porcentagem de resistência no Brasil a *S. aureus* no ano de 2016

Antibiótico	Porcentagem de Resistência (origem hospitalar)
CIP	18,8
CLI	48,5
FOX	32,9
GEN	10,5

OXA	33,1
SXT	16,2

Fonte: Adaptado OPAS

CIP - ciprofloxacino
 CLI - clindamicina
 FOX - cefoxitina
 GEN - gentamicina
 OXA - oxacilina
 SXT- sulfametoxazol trimetoprim

Na figura 3, retirada do site da OPAS, é possível observar o número de patógenos resistentes que foram isolados por ano, os dados mais recentes para o Brasil são do ano de 2016, onde foram isolados 1135 da espécie *Staphylococcus aureus* e 2405 de *Escherichia coli*, também é possível observar que os dados para a espécie gram negativa, só começaram a ser contabilizados no ano de 2014 e em um número bem menos significativo, com 859 isolamentos, o que não se manteve para o ano seguinte, onde foram registrados 2517 isolamentos para o microrganismo.

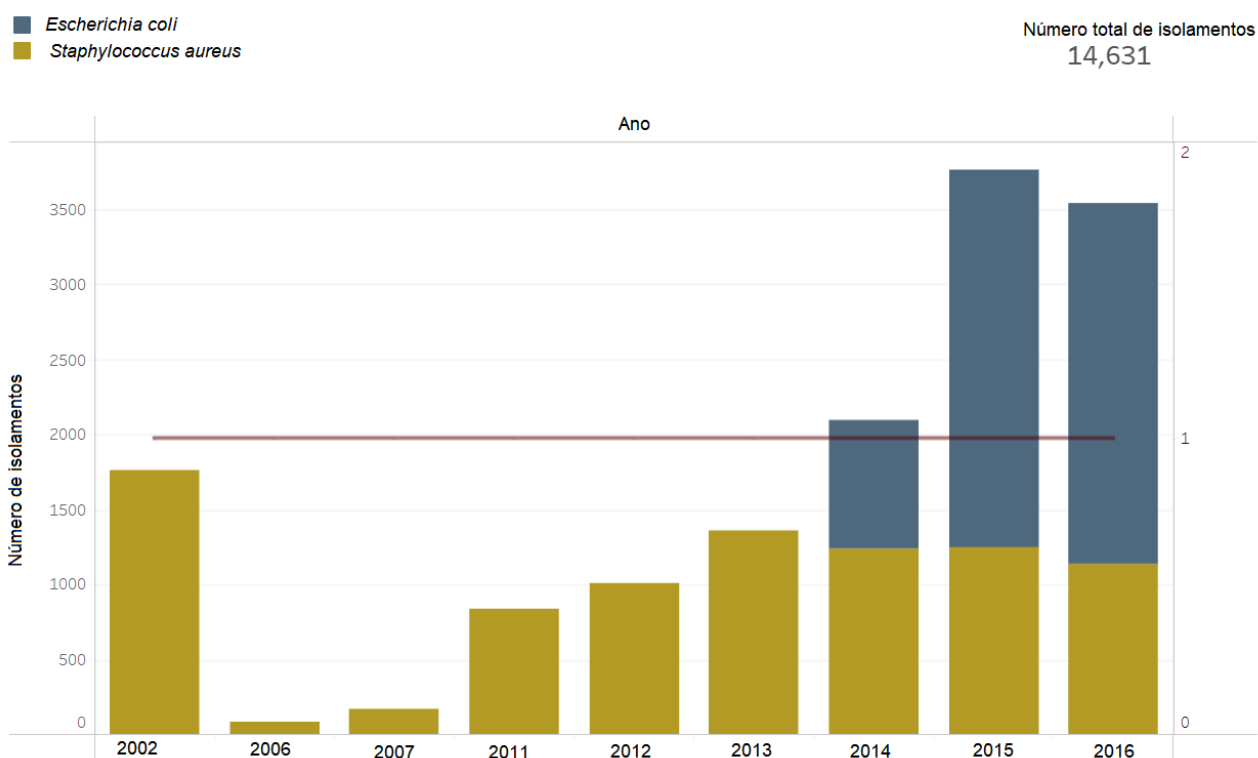


Figura 3 - Gráfico representando o número de isolamentos de bactérias resistentes no Brasil levando em consideração os patógenos *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e o ano

Fonte: Adaptado OPAS

A figura 4, retirada do relatório global de prevenção e controle de infecção da OMS, mostra as mortes globais que foram atribuídas ou associadas a um patógeno resistente, no gráfico é possível observar que o principal microrganismo associado a essas mortes foi o *E. coli*, seguido pelo *S. aureus*, com isso fica evidente a importância de procurar novas fontes de substâncias com potencial antibacteriano para combater essas infecções, visto que são as que mais causam mortes mundiais.

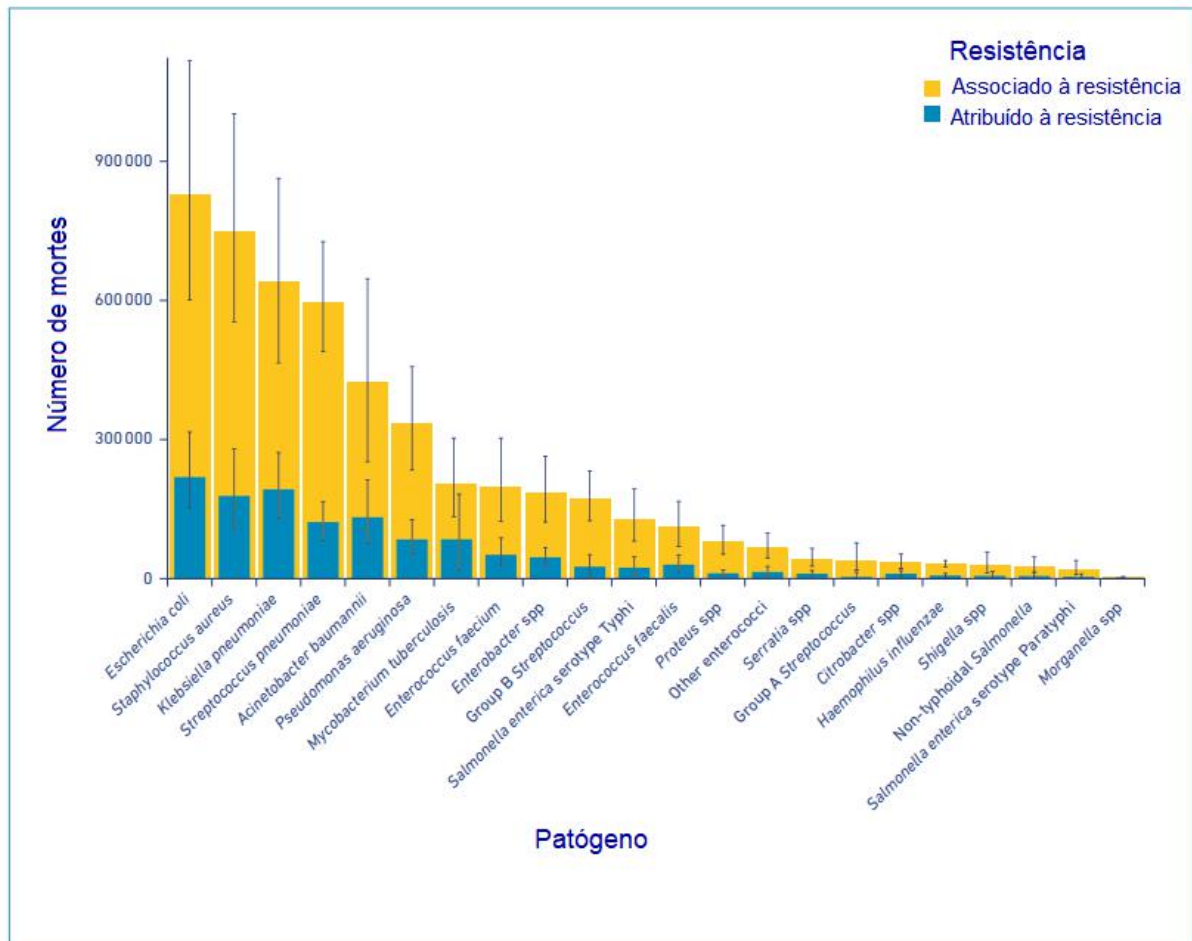


Figura 4 - Mortes mundiais atribuídas e associadas a uma bactéria resistente causadas por uma síndrome infecciosa no ano de 2019

Fonte: Adaptado WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022

A figura 5, retirada do European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), apresenta a porcentagem de *S. aureus* resistentes à meticilina isolados na Europa em 2019, é possível observar que os países que apresentaram maior quantidade de cepas isoladas foram: Romênia (46,7%), Grécia (37,6%), Portugal (34,8%), Itália (34,3%) e Eslováquia (27,2%). Comparado com os dados obtidos no Brasil em 2016, esses países apresentaram índices bastantes significativos,

reforçando a importância do controle da utilização de antibióticos e da busca por terapias alternativas (ECDC, 2019).

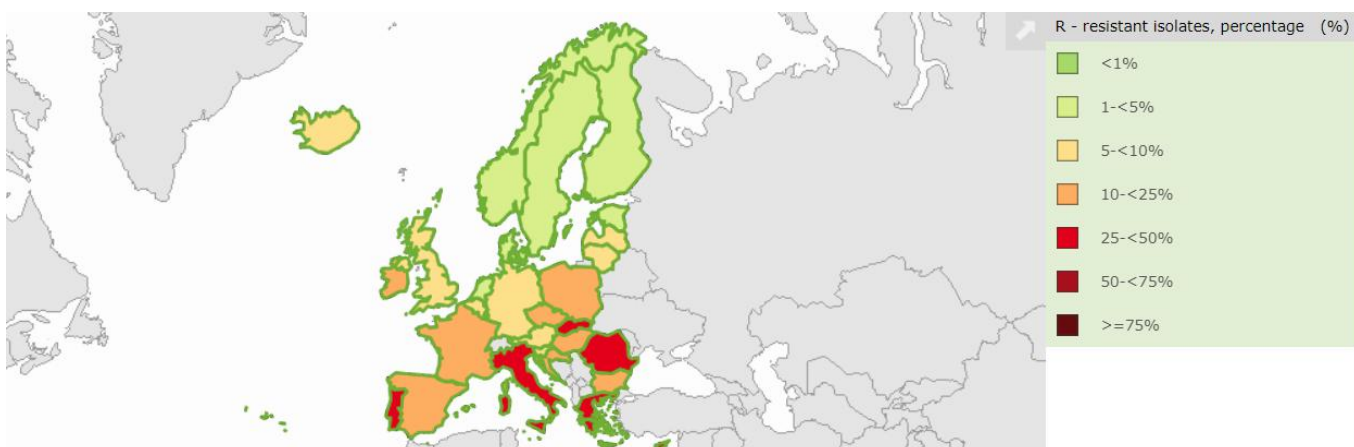


Figura 5 - Porcentagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina isolados na Europa em 2019

Fonte: ECDC

A figura 6, também retirada do ECDC, mostra a porcentagem de cepas de *E. coli* resistentes a aminopenicilinas isoladas na Europa em 2019, na qual é possível observar que a maioria dos países europeus apresentam um percentual de mais de 50%, o país que apresenta o menor percentual é a Finlândia (35,5%), e mesmo assim apresenta um percentual bastante significativo, esses dados revelam um panorama preocupante em relação a resistência à *E. coli* resistentes a aminopenicilinas.

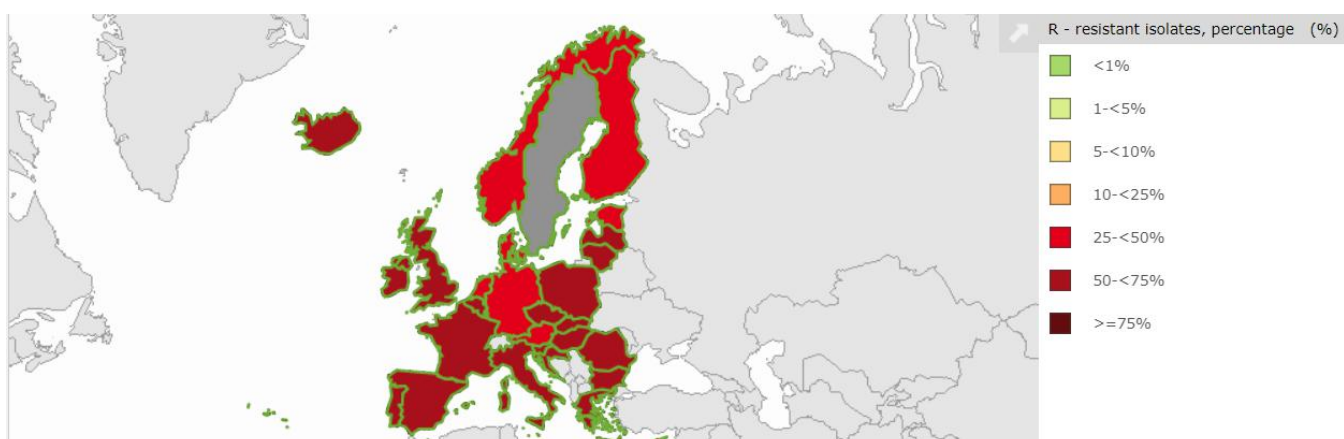


Figura 6 - Porcentagem de cepas de *Escherichia coli* resistentes a aminopenicilinas isoladas na Europa em 2019

Fonte: ECDC

1.2 Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)

Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), são as infecções que são contraídas pelo paciente após realização de alguma intervenção de assistência à saúde, além disso deve se enquadrar em um dos seguintes requisitos: a) caso o microrganismo não tenha um período de incubação descrito vai ser considerado IRAS qualquer sintoma de infecção apresentado após o terceiro dia de internação. b) caso não haja descrição do período de incubação será considerado IRAS qualquer sintoma de infecção após a realização de um procedimento, sem o paciente estar necessariamente internado (ANVISA, 2021).

As IRAS são muito comuns no ambiente hospitalar e apresentam um grande problema de saúde pública, impactando a morbidade, mortalidade e a qualidade de vida dos pacientes. Estatisticamente pelo menos uma vez na vida 7% dos pacientes de países desenvolvidos e 10% em países subdesenvolvidos, vão desenvolver algum tipo de IRAS (WHO, 2016).

Os países subdesenvolvidos ainda apresentam uma defasagem quando se trata dos dados do impacto econômico que as IRAS causam, porém segundo dados obtidos pelo centro de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos em média as IRAS custam de 35,7 a 45 bilhões de dólares por ano, já na Europa esse valor chega a 7 bilhões de euros. No Brasil, um levantamento mostrou que um paciente com IRAS, custa diariamente 55% a mais que um paciente sem IRAS. (ANVISA, 2021)

Vale ressaltar também que uma grande parte das IRAS pode ser prevenida a partir da utilização de medidas de prevenção e controle de infecção, inclusive as organizações internacionais de saúde reconhecem essas medidas como a principal estratégia para lidar com ameaças públicas de interesse internacional. Como exemplo recente da utilização de tais estratégias para doenças infecciosas pode-se citar a síndrome respiratória aguda grave, a síndrome respiratória do oriente médio e o surto do ebola, nesses casos foram utilizadas as estratégias descritas que demonstraram o papel fundamental na contenção dos casos. (WHO, 2016).

Em um estudo realizado no Brasil, se fez um levantamento de artigos a fim de mapear as principais bactérias encontradas em IRAS em UTIs e segundo os autores, o *S. aureus* foi o segundo microrganismo mais encontrado, apresentando um percentual de 14,3% dos artigos (COSTA et al, 2019).

O *S. aureus* é assinalado como um dos principais causadores de IRAS, tanto em ambiente hospitalar quanto na comunidade, visto que normalmente está presente em indivíduos saudáveis e costuma colonizar pele, nariz, garganta e intestino, sendo assim normalmente a infecção ocorre após um trauma, lesões de pele e na UTI principalmente na realização de procedimentos cirúrgicos e implantação de dispositivos invasivos. Por ser bastante presente nos seres humanos e apresentar alta patogenicidade, esse microrganismo consegue infectar tanto pessoas saudáveis, quanto imunocomprometidas (COSTA et al, 2019).

A figura 7 retirada do boletim informativo da Coordenação Estadual de Controle de Infecção Hospitalar (CECIH-RJ) mostra os microrganismos que foram isolados e notificados em infecções na corrente sanguínea em adultos internados em UTI e é possível observar que no ano de 2019 o microrganismo mais isolado foi *Staphylococcus coagulase negativa* e a terceira mais isolada foi *S. aureus*, para esse tipo de infecção também foi possível observar que a *E. coli* foi o nono microrganismo isolado mostrando que para esse tipo de infecção os microrganismos gram positivos foram os principais.

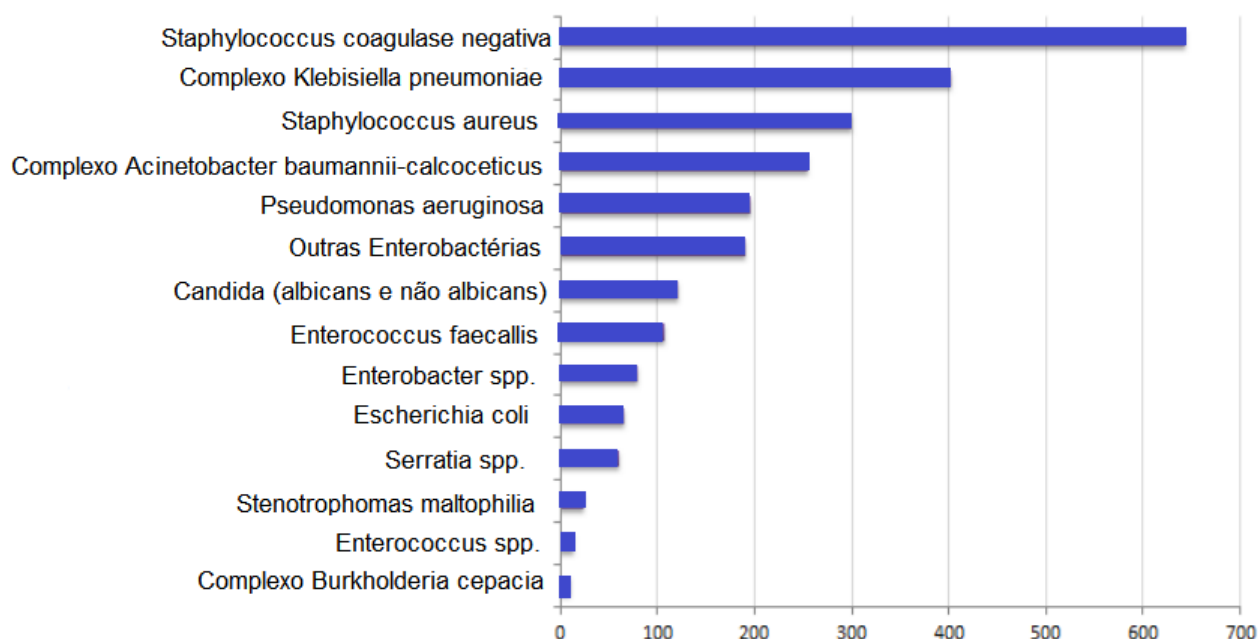


Figura 7 - Principais microrganismos isolados em infecções na corrente sanguínea em UTI adulto no RJ no ano 2019
Fonte : CECIH-RJ

Já a *E. coli* é apresentada como um dos principais microrganismos quando se trata de infecção no trato urinário (ITU) por IRAS, principalmente em pacientes na

UTI, onde é comum utilizarem sonda o que aumenta a chance de ITU, quanto maior o tempo que o paciente fica com a sonda, maior a chance de acarretar o desenvolvimento de algum patógeno, uma vez que os pacientes internados estão normalmente em uso de antimicrobianos, imunossupressores, além da condição em que se encontram, o que causa um desequilíbrio na microbiota e pode levar a uma ITU (DOS SANTOS, 2020).

A figura 8 retirada do boletim informativo do CECIH-RJ apresenta os principais microrganismos isolados em ITU no estado do Rio de Janeiro e é possível observar que o *E. coli* foi o principal microrganismo isolado quando ocorre esse tipo de infecção em pacientes adultos de UTI.

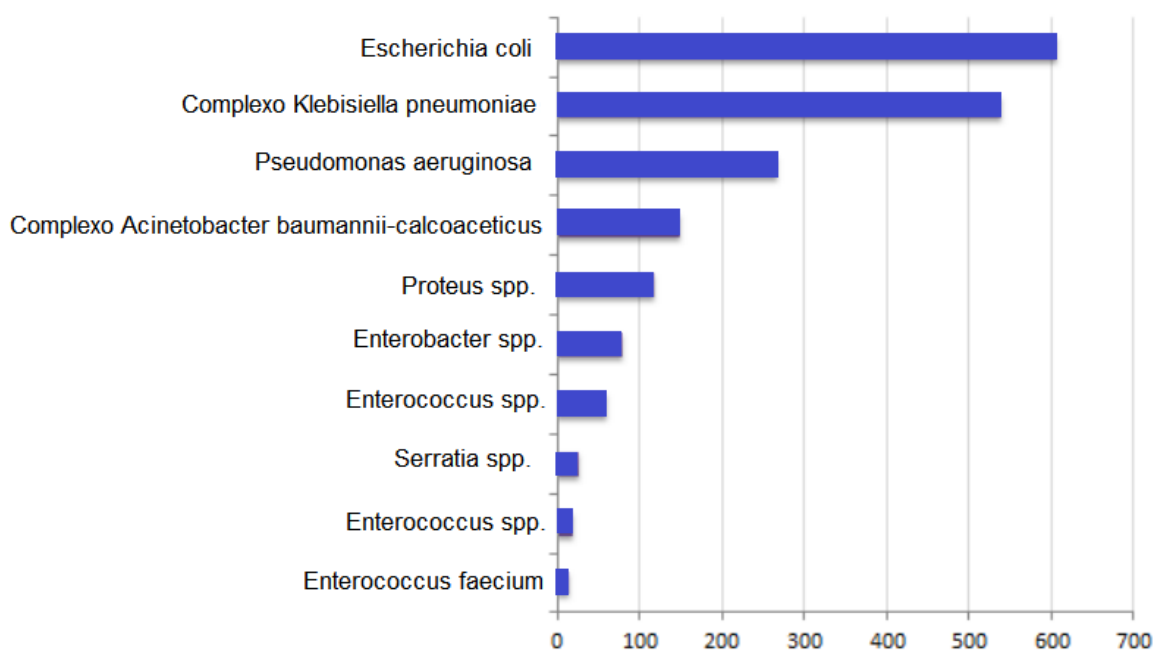


Figura 8 - Principais microrganismos isolados em infecções do trato urinário em pacientes adultos em UTI no RJ no ano de 2019

Fonte: CECIH-RJ

1.3 Importância dos produtos naturais à saúde humana

O papiro de Ebers achado no Egito foi uma grande descoberta acerca da utilização de produtos naturais pela humanidade, uma vez que documentava diversas doenças e drogas (tanto de origem vegetal quanto animal). Artefatos descobertos no Equador, demonstram a utilização das folhas de coca a 5000 anos atrás. A partir do século XVIII começam acontecer os primeiros isolamentos de substâncias oriundas do reino vegetal, que até hoje é o que mais contribui para

fornecer metabólitos secundários que apresentam funções de alto valor agregado como cosméticos, medicamentos, agroquímicos e alimentos. Muitos medicamentos sintéticos foram desenvolvidos a partir de modificações estruturais em substâncias de origem natural, como por exemplo: procaína, cloroquina, taxol, tropicamida, entre outros (PINTO et al, 2002).

Em relação aos medicamentos aprovados para uso clínico, entre os anos de 1981 e 2019, 3,8% eram produtos naturais, 18,9% é derivado de produto natural e 14,2% foram totalmente sintetizados inspirados por um produto natural. (NEWMAN e CRAGG, 2020). Supõe-se que 40% dos fármacos disponíveis no século passado foram obtidos a partir de produtos naturais, 25% de plantas, 13% microrganismos e 3% animais. Entre 1983 e 1994, 39% dos medicamentos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) tinham origem a partir de produtos naturais (NEWMAN E CRAGG, 1997; SHU, 1998).

No século XX, as pesquisas envolvendo os produtos naturais conseguiram evoluir de forma significativa, principalmente na oncologia. Na figura 9, podemos observar um gráfico, que representa todos os fármacos aprovados de 1946 a 2019 para o tratamento do câncer, sendo possível notar que a maioria dos produtos aprovados foi de origem natural. A categoria presente em maior quantidade foi a de produtos naturais com alguma modificação semi sintética, representando aproximadamente 20% do total de fármacos aprovados. Somando as categorias presentes no gráfico que representam produtos naturais, aproximadamente 68% dos fármacos aprovados tiveram essa origem para substâncias anticancerígenas até o ano de 2019, o que é uma parte considerável de um mercado muito promissor e que gera grande interesse por parte da indústria (NEWMAN E CRAGG, 2020).

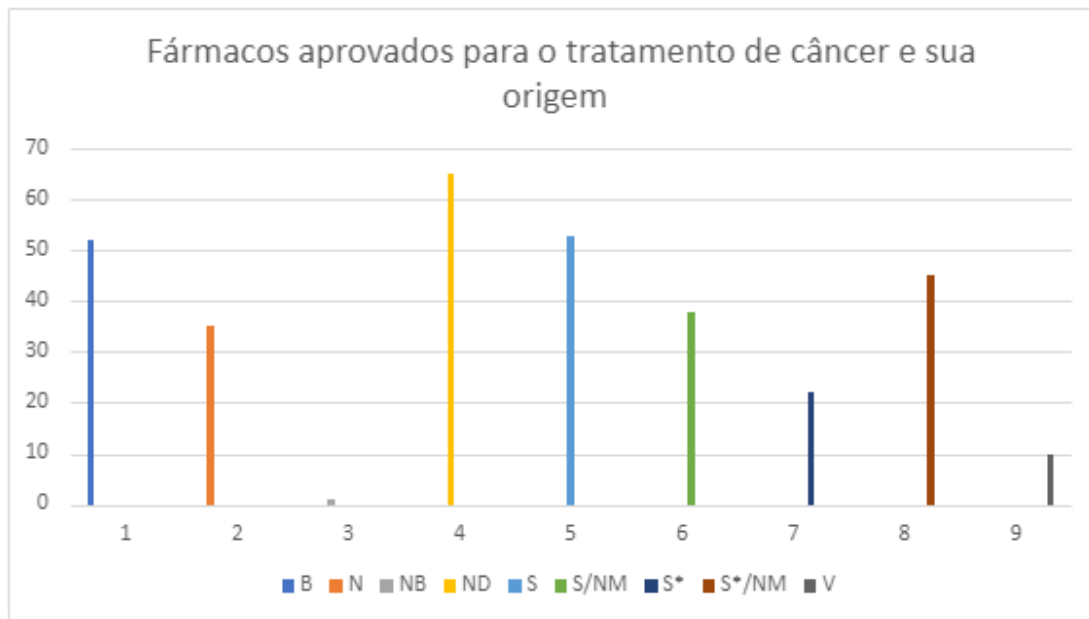


Figura 9 - Gráfico de barras representando os fármacos aprovados para o tratamento de câncer e sua origem.

Adaptado Newman e Cragg, 2020

B - Macromolécula biológica

N- Produto natural inalterado

NB- Produto natural botânico (mistura definida)

ND- Derivado de um produto natural mais utilizado com uma modificação semissintética

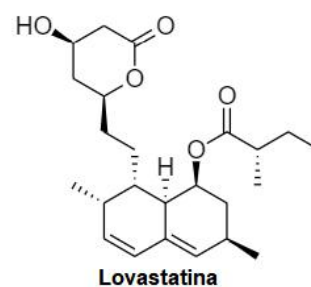
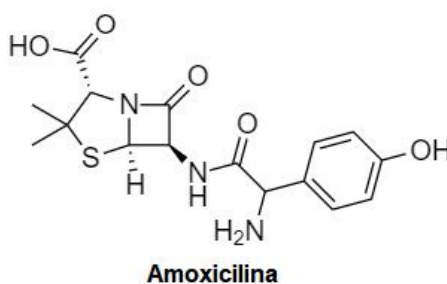
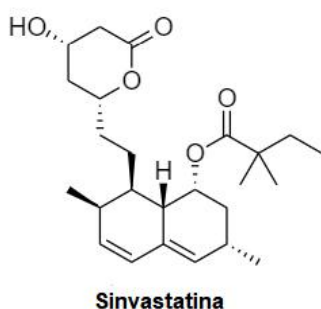
S- Totalmente sintético

S*- Produzido sinteticamente mas com o farmacóforo de origem natural

S*/NM - Produzido sinteticamente com farmacóforo de origem natural e com estrutura que mimetiza um produto natural

V- Vacina

Em 1994, dos vinte medicamentos mais vendidos, seis foram isolados diretamente ou através de transformações químicas a partir de metabólitos de fungos (sinvastatina, amoxicilina, lovastatina, pravastatina, cefaclor - cefalosporina de segunda geração, ceftriaxona - cefalosporina de terceira geração), as estruturas correspondentes aos fármacos citados estão contidos na figura 12 (CZARNIK, 1996; PINTO et al, 2002).



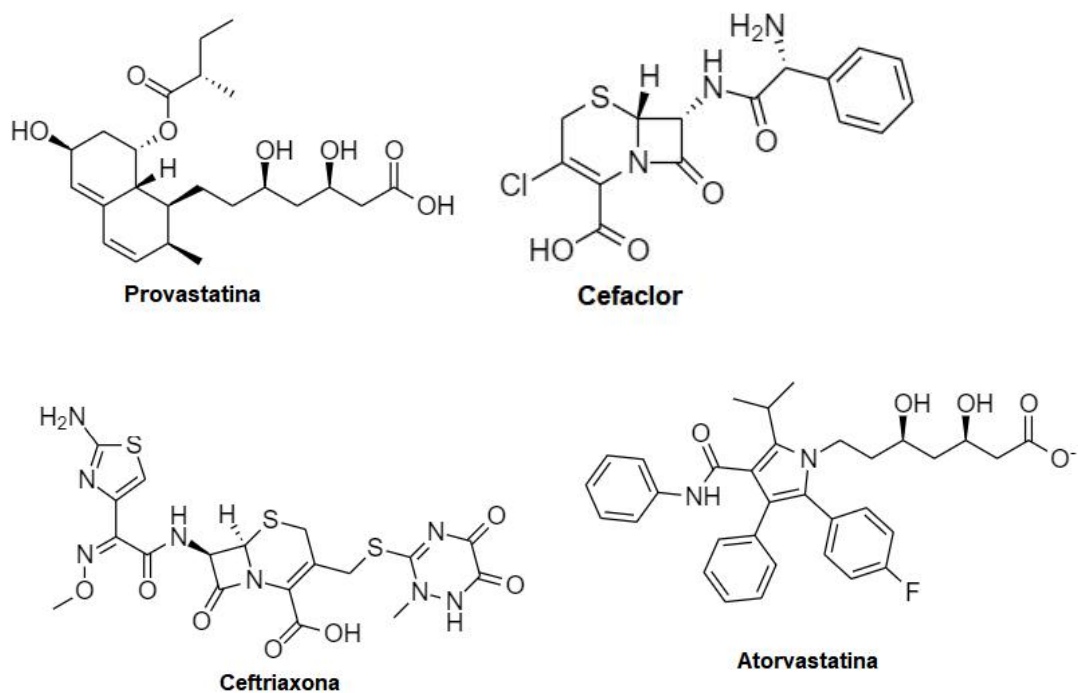


Figura 10 - Estruturas químicas correspondentes a sinvastatina, amoxicilina, lovastatina, pravastatina, cefaclor, ceftriaxona, atorvastatina

A partir disso, fica evidenciado mais uma vez a importância dos produtos de origem natural no auxílio a terapia das mais diversas doenças, por conta da grande quantidade de moléculas novas que podem ser exploradas para as mais diversas finalidades.

A figura 11 representa um gráfico contendo a quantidade de medicamentos aprovados de 2015 a 2019 com atividade antibacteriana e a origem dessas novas moléculas, com isso é importante notar que a mais da metade dos fármacos teve origem de produtos naturais, obtido exclusivamente de produtos naturais ou com alguma modificação semi sintética, que é o caso da maior parte dos fármacos, já para os fármacos de origem totalmente sintética esse índice cai para aproximadamente 22% (NEWMAN e CRAGG, 2020).

Medicamentos aprovados com atividade antibacteriana

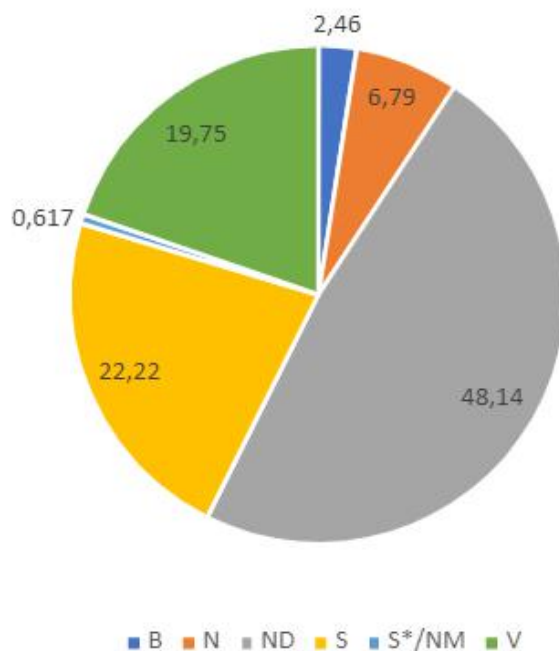


Figura 11 - Gráfico de fármacos antibacterianos aprovados de 2015 a 2019

Adaptado Newman e Cragg, 2020

B - Macromolécula biológica

N- Produto natural inalterado

NB- Produto natural botânico (mistura definida)

ND- Derivado de um produto natural mais utilizado com uma modificação semissintética

S- Totalmente sintético

S*- Produzido sinteticamente mas com o farmacóforo de origem natural

S*/NM - Produzido sinteticamente com farmacóforo de origem natural e com estrutura que mimetiza um produto natural

V- Vacina

Segundo um relatório publicado em 2018, o medicamento mais vendido nos Estados Unidos nos últimos 25 anos ainda é a atorvastatina que tem sua origem descendendo diretamente de um produto natural, faturando nestes anos o total de 94,67 bilhões de dólares, em quarto lugar para vendas encontra-se um corticosteróide modificado (Advair- fluticasona e salmeterol) que é a combinação de dois agentes derivados de um produto natural, mas com modificações semissintéticas, esse medicamento apresentou vendas de 69,1 bilhões de dólares (NEWMAN e CRAGG, 2020).

Com isso, observa-se que mesmo com as mudanças nos parâmetros de medicamentos oriundos de produtos naturais, antes produtos obtidos diretamente dessas substâncias, agora com modificações semi sintéticas, essas moléculas ainda

representam relevância no mercado e mesmo após décadas lucram bilhões de dólares por ano, somente nos EUA.

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo, totalizando em pressuposição de 20% das espécies encontradas na Terra (CALIXTO, 2003). Além disso, o Brasil sozinho abriga mais de 20% das espécies de água doce, 17% de todas as aves, 11,7% dos mamíferos, 13,3% dos anfíbios, 11,6% de todas as plantas e também a soma de todos os biomas equivale a 12% da água doce encontrada em todo planeta (RIBEIRO et al, 2020). A exploração dessa riqueza químico-biológica para obtenção de substâncias de interesse é de extrema importância, levando em conta a grande quantidade de moléculas que encontram-se nesses biomas que ainda não foram acessadas e podem levar a resultados promissores para a comunidade (CALIXTO, 2003).

1.4 Restinga de Jurubatiba

Restinga define-se como uma planície arenosa presente na região costeira, normalmente são formações mais longas que foram consequência de processos sedimentares, nesses locais habitam distintas comunidades que sofrem interferência marinha, no entanto dependem mais da origem do substrato do que do clima. A vegetação ocorre em formato de mosaico e pode apresentar vegetação herbácea, arbusto e arbóreo (CONAMA, 2002).

Estima-se que as restingas recobrem 79% da costa brasileira, onde podem ser identificadas como pequenas e grandes faixas de areia. Uma mistura de fatores químicos e físicos determinam a vegetação específica das restingas, como por exemplo a salinidade, temperaturas altas, alto índice de exposição à luz solar e grandes acúmulos de sal, além disso nas áreas mais próximas a lagoas as vegetações acabam se tornando mais densas (COGLIATTI et al, 2001). O Brasil ter essa faixa extensa de restinga é muito importante visto que é um ambiente muito específico, o que contribui com a diversificação de espécies de plantas e microrganismos (ROCHA et al, 2020).

Cerca de 1100 plantas foram catalogadas somente nas restingas do estado do Rio de Janeiro, no entanto estudos acerca da avaliação biológica de produtos derivados de espécies oriundas das restingas ainda são escassos. Vale ressaltar também que essas espécies estão em constante ameaça por conta da atividade

humana cada vez mais próxima, o que afeta o bioma constantemente (FARIA et al, 2018).

A unidade de conservação federal do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (PARNA Jurubatiba) foi criada em abril de 1998 e tem como propósito preservar e conservar com intuítos educacionais, paisagísticos, recreativos e científicos o seu abundante patrimônio natural, é possível observar sua vista aérea na figura 12. É relatado que o parque possui 44 km de costa e 18 lagoas em seus 14922 hectares (ha). O PARNA Jurubatiba preserva uma das maiores áreas de restinga e lagoas costeiras que ainda são preservadas no país e por isso abriga uma gama de espécies da flora e da fauna brasileira e muitas dessas ameaçadas de extinção (CAMPOS et al, 2015).

Examinando imagens de satélite e dados históricos é possível dizer que desde o século XVI até agora restaram apenas 13% da área total da restinga, área total que se encontra em três municípios Macaé (abriga 1% do PARNA), Carapebus (abriga 22,2% do PARNA) e Quissamã (abriga 65% do PARNA). Mesmo com somente 13% de sua área original remanescente o PARNA Jurubatiba ainda apresenta uma área considerável de aproximadamente 15 mil ha, isso se deve às próprias características da restinga que apresenta solo arenoso e pobre em matéria orgânica o que dificulta a agricultura, além disso tem praias profundas e violentas o que não permite a construção de portos e por serem impróprias para banho gera uma desvalorização imobiliária (CAMPOS et al, 2015).



Figura 12 - Vista aérea de uma das lagoas que o PARNA Jurubatiba abriga

Fonte: ICMBIO

Levando em consideração a dimensão da área que constitui o PARNA Jurubatiba e conseqüentemente a quantidade de plantas, microrganismos e animais ali presentes, pode-se dizer que o parque seria uma grande fonte de possíveis substâncias ativas, além disso 100% do seu território encontra-se no entorno da cidade de Macaé, onde reside a universidade, facilitando assim a logística para a busca desses compostos, uma vez que não é preciso se deslocar muito para encontrar um possível alvo.

Os dois fungos utilizados neste trabalho (*Sordaria tamaensis*/1[- TB1 e TB3 que ainda não foi identificado) foram obtidos a partir da planta *Tocoyena bullata*, uma espécie vegetal nativa do PARNA Jurubatiba (Figura 13).



Figura 13 - *Tocoyena bullata*, popular: marmelo da praia, marmelada da praia, araçarana, louro do brejo, jenipapo bravo.

Fonte: Registros de acervo particular de Romulo Campos

1.5 Microrganismos como produtores de substâncias bioativas

Um grupo com grande capacidade de produção de substâncias bioativas são os microrganismos, principalmente os fungos que apresentam capacidade metabólica para produzir diversas moléculas ativas (PINTO et al, 2002).

Mesmo as plantas sendo uma importante fonte de compostos que dão origem a fármacos, ainda existem alguns problemas em relação a seu uso para obtenção de derivados com potencial farmacológico. Como por exemplo a composição metabólica desses compostos é afetada pelo meio ambiente, tornando difícil a reprodução para obtenção de determinadas moléculas (HOW et al, 2021).

Em relação aos problemas citados anteriormente, uma alternativa é a utilização de microrganismos para obtenção dessas moléculas de interesse, principalmente os fungos. As vantagens em relação a sua utilização se encontram na maior facilidade que os fungos têm a responder as técnicas de cultura rotineiramente utilizadas e com isso facilita seu cultivo em larga escala, além disso

podem ser cultivados em biorreatores e armazenados por longos períodos, garantindo assim que o organismo de origem estará disponível e fornecendo os compostos desejados (HOW et al, 2021).

No início dos anos de 1940, seguido do isolamento e produção em larga escala da penicilina, vários antibióticos foram desenvolvidos e originaram as principais classes mais utilizadas até os dias de hoje: macrolídeos, tetraciclina, cefalosporinas, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, cloranfenicol e rifamicinas. (FERNANDES, 2006)

Além disso dos medicamentos de origem natural aprovados pelo FDA até o ano de 2013, a maioria teve como fonte as plantas (47%), seguido de bactérias (30%), fungos (23%), enquanto outras fontes demonstraram apenas 5% do total (PATRIDGE et al, 2016).

1.6 Fungos endofíticos

Endofítico é um termo usado comumente para descrever organismos que sobrevivem no interior de plantas. Em 1866, De Bary definiu endófitos como todos os organismos que colonizam tecidos internos de plantas. Já em 1986, Carroll restringiu o termo para organismos que causam infecções assintomáticas no tecido da planta, o que excluía fungos patogênicos e mutualísticos, por isso, em 1991, Petrini expandiu a definição de Carroll para todos os organismos que habitam órgãos de plantas e que em algum momento da vida colonizam tecidos internos sem causar nenhum dano aparente ao hospedeiro (PETRINI, 1991).

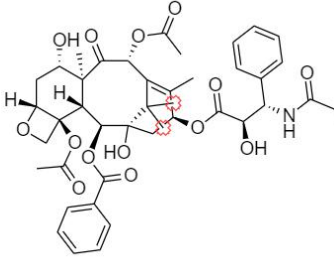
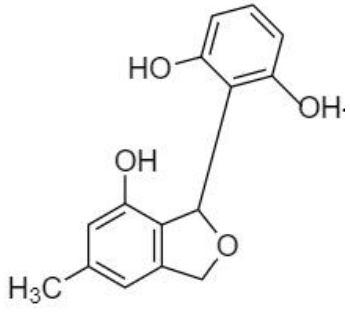
A relação entre fungo e tecido é considerada mutualística, uma vez que ambos são favorecidos, a planta oferece abrigo e nutrientes ao fungo, enquanto o microrganismo ajuda o hospedeiro com estresses bióticos (danos por patógenos) e abióticos (alta temperatura, salinidade, ambiente seco) por meio da produção de metabólitos secundários (GUPTA et al, 2020).

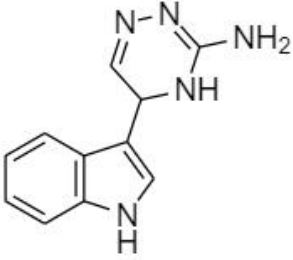
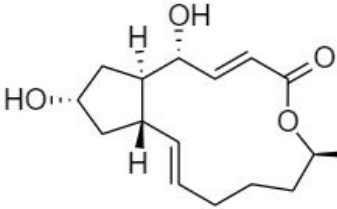
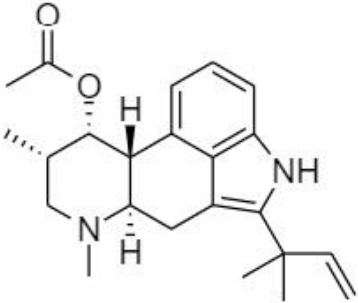
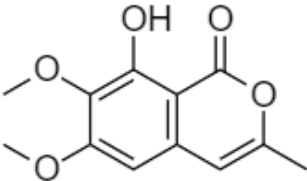
As interações entre planta e fungo acarretam na produção de metabólitos primários e secundários que melhoram várias condições para o hospedeiro, como por exemplo: queda no ataque de insetos, maior resistência a altas temperaturas, salinidade, além de ajudar a regular outras infecções por outros patógenos (CHIESA, 2022).

Estima-se que existam aproximadamente 300 mil espécies de plantas no mundo, levando em consideração que cada espécie é colonizada por um ou mais endófitos, acarreta um número interessante de metabólitos produzidos. No entanto, o número de espécies relatadas foi de aproximadamente 100 mil, número até então baixo, visto que pode chegar até um milhão de espécies, comprovando que essa possível fonte de substâncias de interesse, ainda não foi muito bem explorada e pode gerar inúmeras descobertas importantes (GUPTA et al, 2020).

O quadro 2 apresenta alguns exemplos de substâncias que foram obtidas a partir de fungos endofíticos e suas atividades, assim é possível observar a relevância desses microrganismos na descoberta de novas moléculas importantes para o tratamento de diversas doenças, visto que obtêm-se substâncias com amplo espectro terapêutico.

Quadro 2 - Exemplos de substâncias produzidas por fungos endofíticos e sua atividade

Gênero/ Espécie da qual o fungo foi isolado	Gênero/ Espécie fungo endofítico	Atividade	Estrutura	Referência
<i>Taxus walachiana</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Citotóxica	 <p>Taxol e análogos</p>	UZMA et al, 2018
Não encontrado	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	Antioxidante	 <p>Pestacina</p>	HARPER et al, 2003

<p><i>Nelumbo nucifera</i></p>	<p><i>Aspergillus cejpii</i></p>	<p>Antibacteriana</p>	 <p>5-(1H-indol-3-il)-4,5-di-hidro-[1,2,4]triazin-3-ilamina</p>	<p>TECHAOEI et al, 2020</p>
<p><i>Angelica keiskei</i></p>	<p><i>Penicillium sp.</i></p>	<p>Antiviral</p>	 <p>Brefeldina A (BFA)</p>	<p>RAEKIANSY AH et al, 2017</p>
<p><i>Rhizophora mucronata</i></p>	<p><i>Aspergillus fumigatus</i></p>	<p>Imunossupressora</p>	 <p>Fumiglacavine</p>	<p>XU et al, 2020</p>
<p><i>Quercus gilva</i></p>	<p><i>Xylariaceae sp.</i></p>	<p>Antidiabética</p>	 <p>8-Hidroxi-6,7-dimetoxi-3-metilisocumarina</p>	<p>INDRIANING SIH et al, 2017</p>

1.7 Estratégias de ampliação da produção de substâncias de interesse

Os metabólitos secundários são definidos como compostos orgânicos de baixo peso molecular que não estão diretamente envolvidos em processos metabólicos primários, tais como: fotossíntese, respiração e divisão celular, e também são obtidos por vias biossintéticas diferentes que em geral são um ramo das vias primárias. Os fungos conseguem produzir diversos grupos de substâncias ativas como por exemplo: fenóis, alcalóides, isocumarinas, quinonas, terpenóides, proteínas, peptídeos, entre outras substâncias (MOHAMED et al, 2021).

Dentre as estratégias para explorar os metabólitos microbianos, podemos citar cultivos em meios fermentativos apropriados. No entanto, esses métodos de cultura apresentam problemas ao que se refere a quantidade de metabólitos produzidos, que diminui drasticamente em condições laboratoriais, uma vez que essas condições diminuem a expressão total do metabolismo para produção de metabólitos. Além disso, a necessidade de isolar o fungo do seu hospedeiro também limita a quantidade de fungos que conseguirá se manter somente em laboratório. Com isso se faz necessário um cultivo que englobe também técnicas que possam contornar essas limitações para se obter o maior número de metabólitos possíveis (TOGHUEO et al, 2020).

Existem maneiras de contornar as limitações do cultivo em laboratório, Bode e colaboradores em 2002, investigou mudanças sistemáticas em formas de cultivo para avaliar estas maneiras e os definiu como “uma cepa, vários compostos” (OSMAC), assim alterando o meio de cultura, adicionando inibidores enzimáticos, entre outras abordagens, conseguiu isolar mais de 100 compostos, oriundos de 6 microrganismos.

A figura 14 apresenta os tipos de estratégias usados na ampliação da obtenção de metabólitos, dentre as quais pode-se citar: a) mudanças químicas, b) mudanças físicas, c) inibição enzimática, d) co-cultivo, e) eliciadores químicos e f) modulação epigenética.

Epigenética define-se como mudanças herdáveis na expressão gênica, que não alteram a sequência de DNA. O uso de modificadores epigenéticos pode levar a presença de vias biossintéticas silenciosas que geram metabólitos secundários. (HILÁRIO F ,2020). Como, por exemplo, a utilização de 5-azacitidina na espécie de

fungo *Diatrype* sp. que induziu a produção de lunalidas A e B (TOGHUEO et al, 2020).

Uma maneira que pode ser explorada para obtenção de um número maior de metabólitos secundários é a modulação epigenética, no qual estruturas denominadas moduladores epigenéticos interagem com o DNA e partes de sua estrutura, levando a diferenças na expressão gênica que podem aumentar ou diminuir a quantidade de metabólitos que o fungo produz. Como por exemplo a adição de 5-azacitidina, que é um inibidor da histona desacetilase em culturas de fungos da espécie *Chaetomium* sp., que levou ao aumento da concentração do metabólito isosulucrina (DE OLIVEIRA et al, 2019).

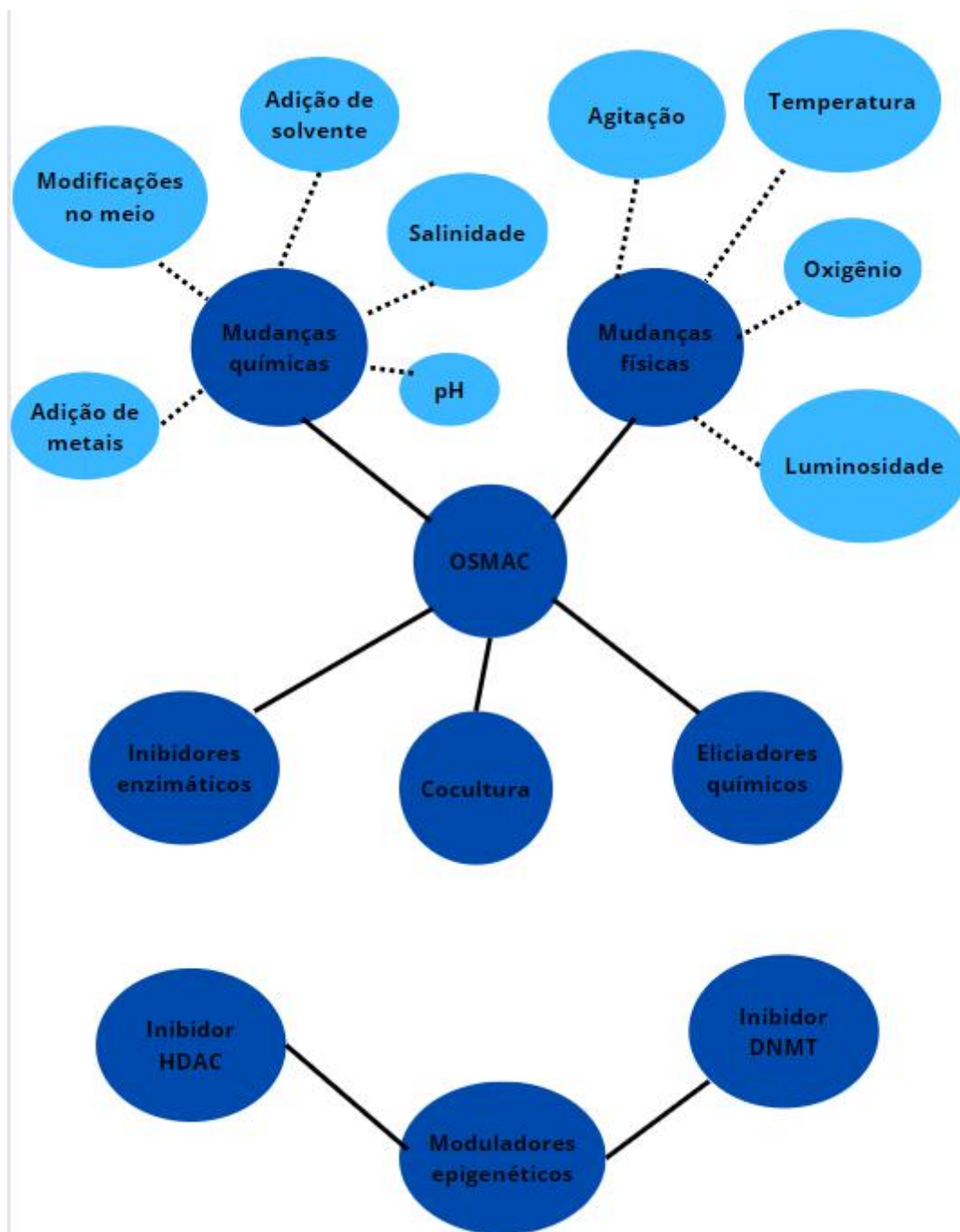


Figura 14 - Estratégias para ampliação da obtenção de metabólitos secundários
(Adaptado PINEDO-RIVILLA et al, 2022)

HDAC- Inibidor da histona desacetilase
DNMT-Inibidor da DNA metiltransferase

Com o método da co-cultura, ocorre o cultivo de duas espécies de microrganismos em conjunto, o que força a competição para obter os recursos necessários para sobreviver e espera-se que ative as vias biossintéticas silenciadas, apesar de ser uma via pouco direcionada é bem sucedida na obtenção de

metabólitos, o que pode expandir ainda mais a quantidade de moléculas de interesse a serem estudadas (LI et al, 2021).

Outro método possível é a utilização de eliciadores químicos para modular a produção de substâncias de interesse por esses microrganismos. A adição dessas substâncias ativa mecanismos inespecíficos ou que ainda não foram descritos e por conta disso, leva a uma modulação da produção de metabólitos secundários pelos microrganismos, o que gera moléculas de interesse. Esses eliciadores podem ser metais pesados, oligossacarídeos ou solventes, que vem sendo descritos como promissores no aumento da produção de metabólitos (CHAGAS, 2015).

Alguns estudos demonstram que alguns íons metálicos, solventes orgânicos e oligossacarídeos podem aumentar e induzir a produção de metabólitos secundários por fungos, como eliciadores químicos. Para exemplificar a adição de etanol 1% em uma cultura de fungos de *Pestalotia* sp, induziu a produção de um novo metabólito, a pestalona (figura 15), com atividade antibacteriana (TOGHUEO et al, 2020).

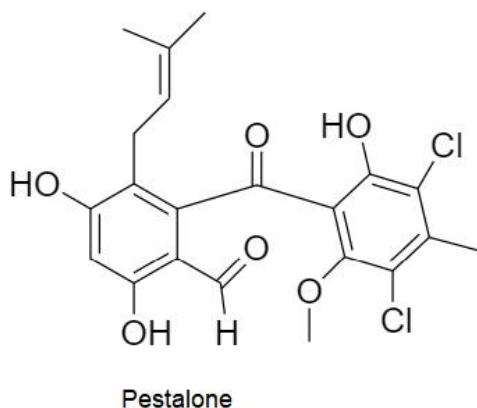


Figura 15 - Estrutura química da pestalona

Existem dois tipos de eliciadores descritos na literatura: dentre eles os bióticos que apresentam origem natural e geralmente são extraídos de bactérias, vírus e fungos, como por exemplo: poli e oligossacarídeos. Também existem os eliciadores abióticos que não têm origem biológica, como por exemplo: íons de metais pesados, estresse hiperosmótico e radiação UV (KESHAVAN et al, 2022).

A eliciação e regulação epigenética são métodos de extrema importância para descoberta de novos metabólitos secundários, que possam futuramente ser

moléculas de interesse para novos mecanismos de fármacos, uma vez que esses métodos, permitem o isolamento de metabólitos que normalmente não seriam encontrados com o cultivo tradicional, além disso com essas técnicas, também é possível aumentar a quantidade desses metabólitos que são produzidos para serem estudados melhor.

2. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos a preocupação acerca da resistência bacteriana aos antibióticos de escolha é um assunto que vem gerando destaque a terapias alternativas, com isso a temática abordada é de extrema importância nesse quesito, uma vez que além de abordar alternativas a terapias convencionais, aborda também microrganismo como fontes de substâncias bioativas, o que no Brasil é de extrema relevância, por conta da vasta biodiversidade e da quantidade de substâncias inexploradas e passíveis de estudo em seu território. A restinga de Jurubatiba por ser uma área de conservação ambiental acaba se tornando uma grande fonte de exploração de novas substâncias. Parte de seu território está presente no município de Macaé e pode ser explorada sem uma demanda logística muito difícil.

As amostras testadas neste trabalho, são reflexo de vários estudos anteriores desenvolvidos no laboratório, desde a obtenção da espécie vegetal, cultivo e isolamento dos fungos endofíticos, eliciação e obtenção das amostras a serem testadas.

Além disso paralelamente a realização desses ensaios a aluna de doutorado Juliana Givisiez realizou testes com os extratos do fungo *Sordaria tamaensis* para avaliar seu potencial antimicobacteriano para cepas de tuberculose atenuadas, os resultados do presente trabalho se complementam com os resultados obtidos para a micobactéria e busca avaliar se existe uma seletividade ou não para esses extratos com um determinado microrganismo.

A sinvastatina foi escolhida como um dos eliciadores por atuar inibindo competitivamente uma enzima (HMG-CoA redutase), que atua na via dos terpenos e assim, possivelmente levar a uma ativação desta via gerando a produção desses compostos.

Por fim, a busca de dados na literatura sobre eliciadores visa melhorar a compreensão acerca dos seus resultados, para que essas informações sejam disseminadas e possam ser colocadas em prática posteriormente.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antibacteriano de extratos obtidos do fungo *Sordaria tamaensis* (TB1) e TB3 (ainda não identificado) através de técnicas de eliciação, frente a cepas sensíveis de *Staphylococcus aureus* (TB1 e TB3) e *Escherichia coli* (somente TB1), a partir da realização do ensaio de microdiluição em caldo.

Além disso, fazer uma revisão bibliográfica acerca dos moduladores epigenéticos e eliciadores químicos utilizados para obtenção de biomoléculas ativas em fungos endofíticos.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar o ensaio de microdiluição em caldo para os extratos e frações obtidos a partir do fungo *Sordaria tamaensis* utilizando cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*
- Realizar o ensaio de microdiluição em caldo para os extratos e frações obtidos a partir do fungo TB3 utilizando cepas de *Staphylococcus aureus*
- Avaliar o perfil químico de extratos e/ou frações com potencial atividade antibacteriana.
- Avaliar os potenciais eliciadores quanto ao resultado obtido, se foram eficientes no aumento da concentração de uma substância já conhecida produzida pelo fungo ou se conseguiram levar a produção de uma nova substância

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 MATERIAL

4.1.1 Materiais plásticos

- Placa de 96 poços
- Alças descartáveis
- Ponteiras P100, P200
- Eppendorf

4.1.2 Vidrarias

- Béquer
- Placas de Petri

4.1.3 Reagentes

- Meio ágar Mueller-Hinton
- Meio caldo Mueller-Hinton
- Resazurina (0,01%)
- DMSO (dimetilsulfóxido)
- Oxacilina
- Estreptomicina
- Solução salina 0,85%

4.1.4 Equipamentos

- Pipetadores multicanal e monocanal (Kasvi)
- Autoclave
- Fluxo laminar

4.1.5 Materiais biológicos

- Cepas *S. aureus* ATCC 29213
- Cepas *E. coli* ATCC 25922
- Extratos fungo TB1 (*Sordaria tamaensis*) e TB3

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das amostras do fungo TB1 (*Sordaria tamaensis*)

A metodologia utilizada na obtenção e isolamento dos fungos endofíticos foi realizada pela aluna de graduação Leticia da Costa Carneiro e encontra-se no Anexo 1. As amostras do fungo *Sordaria tamaensis* utilizadas neste trabalho foram obtidas pela aluna de doutorado Juliana Givisiez que realizou as técnicas de cultivo descrita no item 4.2.2 e 4.2.3 e a partição líquido líquido descrita no item 4.2.4 necessária para obtenção dos extratos brutos e das frações no fungo associado a espécie vegetal *Tocoyena bullata*.

4.2.2 Amostra eliciada com *M. bovis* e *M. marinus*

Para a obtenção de extratos do fungo *Sordaria tamaensis* (Figura 17 A) eliciado com *M. bovis* e *M. marinus*, primeiramente deve-se crescer a micobactéria em meio agar 7H10, medir a densidade óptica da bactéria até a fase de lag e autoclavar a bactéria em seguida. O crescimento do fungo deve ocorrer em meio ágar-batata por 7 dias, 12 plugs do fungo são adicionados ao arroz autoclavado, sendo adicionado 10 mL da bactéria autoclavada que deve ser incubada por 28 dias a 30°C. Devem ser realizados 3 controles para o experimento 1- arroz puro; 2- arroz + fungo; 3- arroz + micobactéria; Para obtenção dos extratos foi adicionado etanol absoluto nos cultivos após a incubação e aguardar 48 horas para iniciar a filtragem e secagem no rota evaporador para assim obter os extratos.

4.2.3 Amostra eliciada com sinvastatina

Para o preparo da amostra eliciada com sinvastatina realiza-se o mesmo procedimento conforme descrito em 4.2.2 porém adiciona-se 300 µg de sinvastatina ao meio de cultura, no lugar da bactéria autoclavada.

4.2.4 Partição Líquido-líquido

Após a obtenção dos extratos brutos foi realizada a partição líquido-líquido (Figura 16) para obtenção das frações, onde os extratos brutos foram suspensos em

uma solução 1:1 de etanol e água, para em seguida ocorrer a partição começando com o hexano, seguido do acetato de etila e por fim o butanol. Gerando as frações hexânicas, acetato de etila, butanólicas e aquosas.

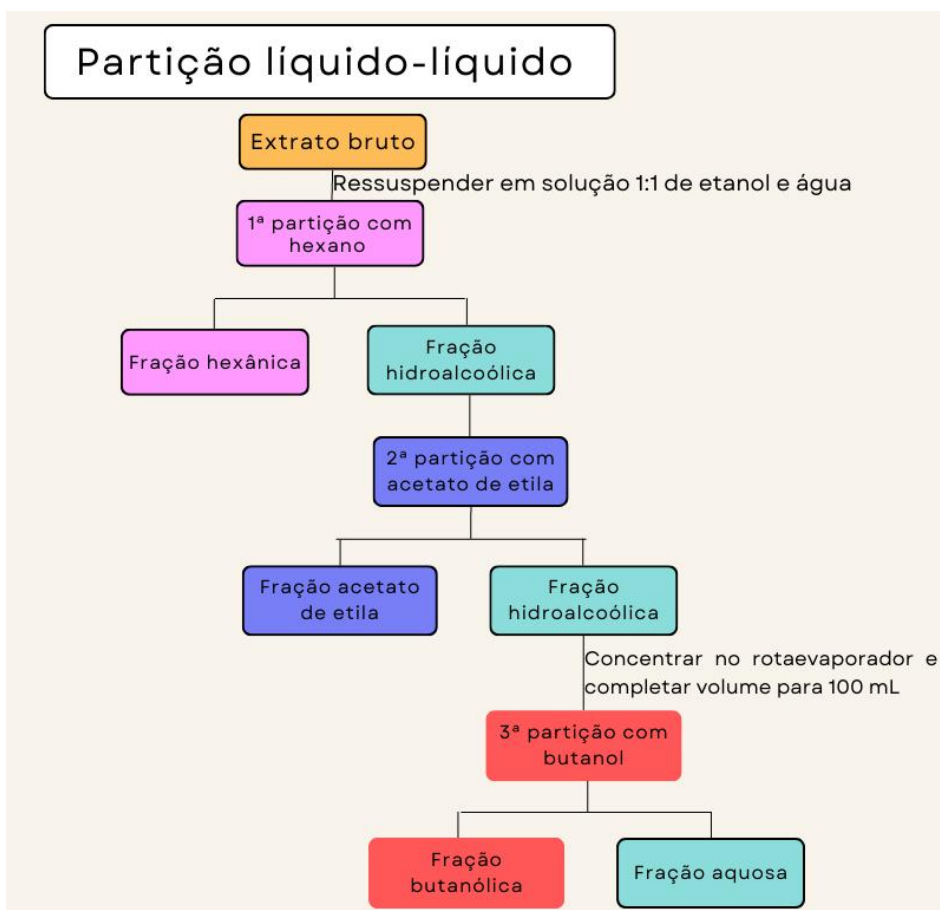


Figura 16 - Fluxograma partição líquido-líquido

4.2.5 Amostras do fungo TB3

Já as amostras oriundas do fungo TB3 (Figura 17 B) foram obtidas pela aluna de mestrado Mara Beltran, que foi responsável por cultivar e obter os extratos brutos utilizando a mesma metodologia descrita no item 4.2.2 e também obteve as frações, utilizando a metodologia descrita em 4.2.4 a partir do fungo endofítico associado a planta *Tocoyena bullata*.

A)



B)



Figura 17 - A) Cultura do fungo *Sordaria tamaensis* imagem cedida pela doutoranda Juliana Givisiez
B) Cultura do fungo TB3 imagem cedida pela mestranda Mara Beltran

4.2.6 Metodologia ensaio de concentração mínima inibitória (CIM)

Para realização do ensaio de concentração mínima inibitória, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo. Inicialmente é feito o cultivo da cepa bacteriana de interesse no meio ágar Müeller-Hinton por 24 horas a 37 °C. Para o preparo das amostras a serem testadas é necessário realizar uma diluição seriada, onde pesou-se 5,12 mg da amostra e adicionou-se 500 µL água destilada estéril e 500 µL de DMSO 1:1 onde obteve-se a concentração inicial de 1024 µg/mL (solução mãe). Para obter as demais concentrações necessárias uma alíquota de 100 µL da solução mãe foi diluída em 100 µL do meio caldo Müeller-Hinton até obter-se as concentrações de 512; 256; 128; 64; 32; 16 µg/mL.

Para o preparo do inóculo bacteriano, as colônias isoladas são diluídas em solução salina a 0,85% e ajustadas até obter o grau de turbidez de 0,5 na escala Mcfarland (10^8 UFC/mL). Também foi realizada a leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda 600 nm para garantir padronização do inóculo sendo o valor de absorbância após o ajuste foi definido como 0,06. Aos poços da placa foram adicionados 170 µL do meio caldo Mueller-Hinton, 20 µL da amostra a ser testada e 10 µL do inóculo bacteriano. Para realização do experimento devem ser realizados 4 controles, sendo eles: controle do meio (200 µL do meio), controle do inóculo bacteriano (190 µL do meio + 10 µL do inóculo), controle DMSO (170 µL meio + 20 µL DMSO/água destilada 1:1 + 10 µL inóculo) e o controle do antibiótico (170 µL

meio + 20 µL antibiótico + 10 µL inóculo), no caso do controle do antibiótico para bactérias gram positivas utiliza-se oxacilina e para bactérias gram negativas estreptomicina, além disso as concentrações dos antibióticos devem ser diluídas e testadas em uma faixa que nesse experimento foi de 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 µg/mL; todos os testes foram realizados em triplicata.

As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após essa etapa foi realizada a leitura utilizando o indicador colorimétrico resazurina a 0,01%. Esse indicador sofre redução a resofurina quando há crescimento bacteriano, o que leva a uma mudança na coloração de azul para rosa (figura 18), sendo assim utiliza-se 20 µL de resazurina em cada poço para que a leitura possa ser realizada, após 3 horas e resultado é obtido, se o poço permaneceu azul é sinal que houve inibição do crescimento bacteriano, se a cor mudou para rosa é um sinal de que houve crescimento bacteriano. A figura 19 apresenta um fluxograma contendo o ensaio antibacteriano realizado resumidamente.

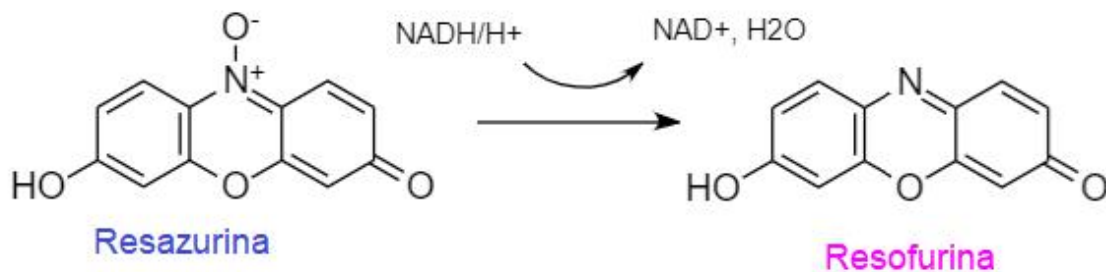


Figura 18 - Redução resazurina a resofurina

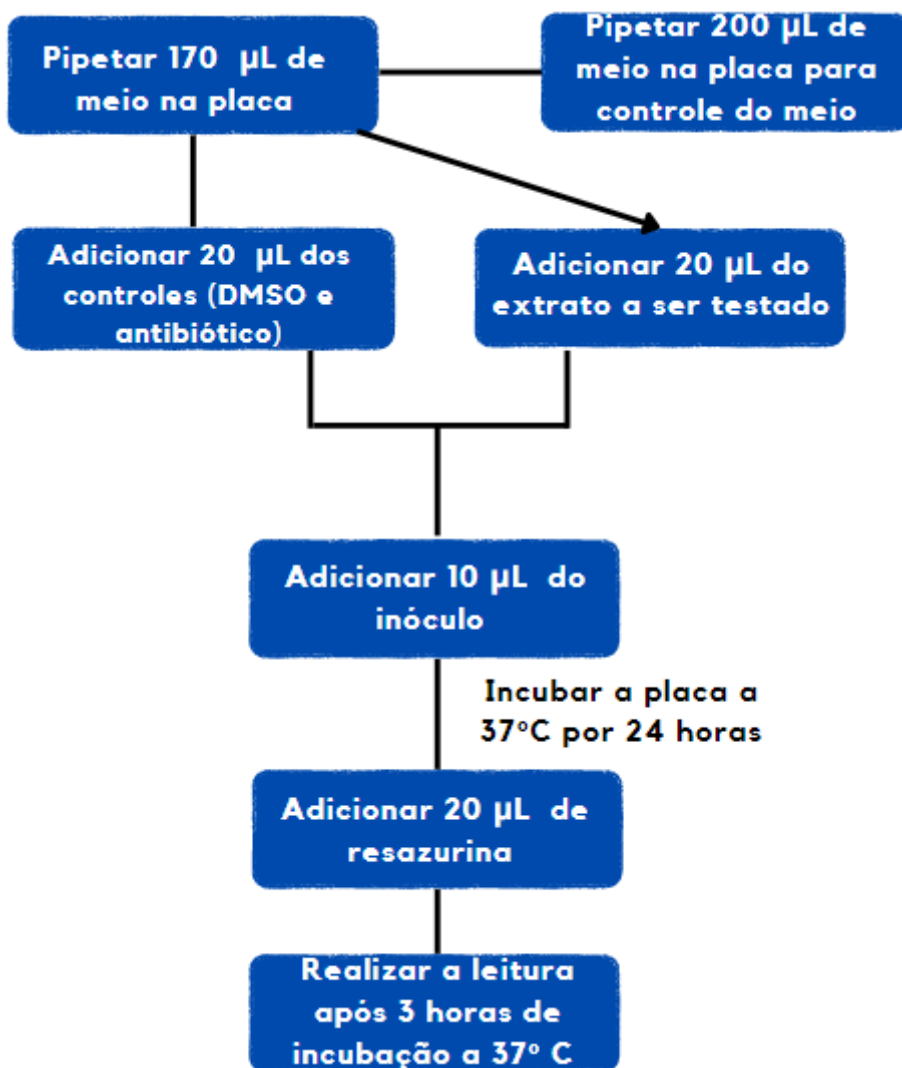


Figura 19 - Fluxograma do ensaio de microdiluição em caldo para cálculo da concentração mínima inibitória

4.2.7 Ensaios com os extratos brutos e frações de TB1 (*Sordaria tamaensis*) e TB3

Os ensaios com os extratos brutos foram realizados em triplicata, com os extratos do grupo controle cultivado tradicionalmente, do grupo com sinvastatina, com *M. bovis* e com *M. marinus*, todos foram testados nas concentrações de 512; 256; 128; 64; 32 µg/mL, o anexo 2 representa como a placa foi organizada levando em conta as substâncias testadas e os controles realizados.

Os testes com esses extratos foram realizados utilizando bactérias gram positivas e gram negativas oriundas do banco de cultura *American Type Culture*

Collection sendo ATCC 29213 o código do *Staphylococcus aureus* e ATCC 25922 o código da *Escherichia coli*. O quadro 3 representa os códigos criados para identificação dos extratos brutos e das frações obtidas posteriormente.

Assim como para os ensaios realizados para os extratos brutos, as frações também foram testadas em triplicata, nas concentrações 512; 256; 128; 64; 32; µg/mL e utilizando os mesmos microrganismos provenientes do banco de cultura *American Type Culture Collection* sendo ATCC 29213 o código do *Staphylococcus aureus* e ATCC 25922 o código da *Escherichia coli*. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e utilizando os mesmos extratos e frações obtidos no item 4.2.3 e 4.2.4.

Quadro 3 - Códigos representando os extratos brutos e frações para o fungo *Sordaria tamaensis*

Código amostra	Descrição da amostra
1 JG	TB1 cultivo tradicional
2 JG	TB1 cultivado na presença de sinvastatina
3 JG	TB1 cultivado na presença de lisado autoclavado de <i>M. bovis</i>
4 JG	TB1 cultivado na presença de lisado autoclavado <i>M. marinus</i>
1 A JG	cultivo controle fração butanólica
2 A JG	cultivo controle fração aquosa
3 A JG	cultivo controle fração hexânica
4 A JG	cultivo controle fração acetato de etila
1 B JG	grupo sinvastatina fração butanólica
2 B JG	grupo sinvastatina fração aquosa
3 B JG	grupo sinvastatina fração hexânica
4 B JG	grupo sinvastatina fração acetato de etila
1 C JG	grupo <i>M. bovis</i> fração butanólica

2 C JG	grupo <i>M. bovis</i> fração aquosa
3 C JG	grupo <i>M. bovis</i> fração hexânica
4 C JG	grupo <i>M. bovis</i> fração acetato de etila
1 D JG	grupo <i>M. marinus</i> fração butanólica
2 D JG	grupo <i>M. marinus</i> fração aquosa
3 D JG	grupo <i>M. marinus</i> fração hexânica
4 D JG	grupo <i>M. marinus</i> fração acetato de etila

4.2.8 Ensaio com o fungo TB3

Após a realização dos ensaios utilizando os extratos obtidos a partir do fungo *Sordaria tamaensis*, foram feitos ensaios com os extratos obtidos do fungo TB3 que é associado a planta *Tocoyena bullata*, foram realizadas partições para obtenção das frações, ensaios esses que foram conduzidos anteriormente pela aluna de mestrado Mara Beltran. O CIM foi realizado em triplicata e utilizando somente a cepa de *Staphylococcus aureus* proveniente do *American Type Culture Collection* sendo ATCC 29213 o código da mesma e utilizando as concentrações de 512; 256; 128; 64; 32; µg/mL para os extratos obtidos. O quadro 4 mostra os códigos que foram utilizados para identificação dos extratos.

Quadro 4 - Códigos utilizados para os extratos brutos e frações do fungo TB3

Código	Descrição da amostra
Amostra 1	TB3 no cultivo tradicional
Amostra 2	TB3 cultivado na presença de lisado autoclavado de <i>M. bovis</i>
Amostra 3	Somente o arroz
Amostra 4	Arroz mais lisado

1ATB3	Fração hexânica cultivo tradicional
2ATB3	Fração hexânica mais <i>M. bovis</i>
3AB	Fração hexânica controle arroz
4AM	Fração hexânica controle lisado
1BTB3	Fração acetato de etila cultivo tradicional
2BTB3	Fração acetato de etila mais <i>M. bovis</i>
3BB	Fração acetato de etila controle arroz
4BM	Fração acetato de etila controle lisado
1CTB3	Fração butanólica cultivo tradicional
2CTB3	Fração butanólica mais <i>M. bovis</i>
3CB	Fração butanólica controle arroz
4CM	Fração butanólica controle lisado
1DTB3	Fração aquosa cultivo tradicional
2DTB3	Fração aquosa mais <i>M. bovis</i>
3DB	Fração aquosa controle arroz
4DM	Fração aquosa controle lisado

4.2.9 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM)

As análises referentes a CG-EM foram realizadas na Central Analítica da Farmácia da UFRJ Campus Ilha do Fundão, onde o mestre Marcos Vinicius Toledo e Silva realizou os experimentos. Utilizando o hélio como gás de arraste em um fluxo de 1,1 mL/min, a coluna capilar utilizada é a do modelo RTx-5Ms (L=30 m; d=0,25 µm) o injetor utilizado foi do tipo split a 270 °C, durante a separação o forno apresenta característica linear, elevando 10 °C por minuto, a temperatura inicial foi

de 60 °C e alcançou 290 °C. Para as condições aplicadas ao detector de massas: fonte de ionização 200 °C e a interface 230 °C. Essa técnica foi empregada nos extratos 1 ATB3 e no 3 B JG.

4.2.10 Revisão bibliográfica

Para obtenção dos dados foram utilizadas três bases de dados, "scopus", "web of science" e "science direct", utilizando como palavras-chave "endophytic fungi elicitors". Quando realizadas as buscas no scopus foram obtidos 76 artigos, no web of science 101, no science direct inicialmente foram obtiveram-se mais de mil artigos, com isso foi necessário a limitação das buscas a partir do ano de 2015 o que levou a 647 artigos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio com os extratos brutos do TB1

Para os ensaios realizados com os extratos brutos nenhum foi capaz de inibir o crescimento, tanto das cepas gram positivas, quanto das cepas gram negativas. As imagens das placas utilizadas no ensaio encontram-se no anexo 3 a e b.

5.2 Ensaio com as frações

- ***Staphylococcus aureus* ATCC 29213**

Foi possível observar que para o microrganismo gram positivo a amostra 3 B JG (fração hexânica do grupo eliciado com sinvastatina) foi capaz de inibir o crescimento bacteriano na sua maior concentração de 512 µg/mL. As imagens das placas referentes a esses ensaios estão no anexo 3 c; d; e;

- ***Escherichia coli* ATCC 25922**

No resultado obtido para o teste das frações para o microrganismo gram negativo é possível observar que nenhum dos extratos foi eficiente na inibição do

crescimento da cepa, as imagens das placas utilizadas no teste estão disponíveis no anexo 3 f e g.

Foram testados no total 20 amostras para cada microrganismo, oriundos do fungo TB1 que continham os extratos brutos e as frações obtidas após partição líquido líquido, dentre esses apenas um apresentou atividade na maior concentração de 512 µg/mL para o *Staphylococcus aureus*, enquanto para o *Escherichia coli* nenhum foi ativo. Sendo assim 5% das amostras testadas apresentaram atividade para o microrganismo gram positivo.

Em estudos preliminares feitos pela aluna de doutorado Juliana Givisiez o mesmo grupo de extratos e frações foram testados para atividade frente a *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*, os extratos eliciados com sinvastatina e lisado de *M. bovis* conseguiram inibir com o sucesso o crescimento das cepas, indicando que também tem atividade em micobactérias, sendo a fração acetato de etila a responsável pela inibição do crescimento em ambas as eliciações.

Em um estudo recente foi possível observar que a subfração eliciada com acetato de etila de uma cultura em arroz do fungo endofítico *Aspergillus versicolor*, obtido de pétalas do aguapé egípcio apresentou uma boa atividade antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 700699, apresentando uma concentração mínima inibitória de 0,4 µg/mL e além disso não apresentou nenhum efeito citotóxico (EBADA, et al, 2020).

Em um estudo realizado na Argentina, extratos da planta *Laurus nobilis* L. popularmente conhecida como loureiro, foram testados para inibição de cepas gram positivas e gram negativas de *S. aureus* e *E. coli*, os resultados obtidos demonstram que nenhuma fração foi capaz de inibir o crescimento de nenhuma cepa de *E. coli* utilizada, enquanto para as cepas de *S. aureus* somente a fração metanólica não conseguiu inibir o crescimento, as frações hexânicas, clorofórmicas e acetato de etila apresentaram resultados positivos. Nesse experimento, uma das cepas de *S. aureus* foi a ATCC 29213 a mesma utilizada para o presente trabalho e foi relatado o valor de concentração mínima inibitória de 500 µg/mL para a fração hexânica que também apresentou resultado no presente trabalho em uma concentração de 512 µg/mL (MOLINA et al, 2020).

Em relação aos resultados obtidos positivamente somente com a bactéria gram positiva, deve-se levar em consideração as diferenças estruturais que essas espécies apresentam e conseqüentemente uma maior facilidade de determinadas

substâncias em conseguir inibir o crescimento de uma e não obter sucesso na outra. Em um estudo observou-se que metabólitos oriundos de *B. subtilis* foram eficazes contra microrganismos gram positivos e não obtiveram sucesso com os gram negativos, já os metabólitos oriundos de *B. licheniformis* foram eficazes contra os microrganismos gram negativos e não conseguiram inibir o crescimento dos gram positivos. O que pode ter ocorrido por conta da produção de um metabólito que tem mais facilidade com algum componente presente na parede celular da espécie que conseguiu o resultado positivo (ARAUJO et al, 2013).

5.3 Ensaio com o fungo TB3

Para os resultados dos extratos brutos do fungo TB3 foi possível observar que nenhum foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, as imagens da placa utilizada neste ensaio encontram-se no anexo 3 h.

Já nos resultados obtidos para os testes com as frações obtidas após partição líquido líquido é possível observar que o extrato 1ATB3 (fração hexânica) foi capaz de inibir o crescimento bacteriano na concentração mínima de 64 µg/mL para o *S. aureus*, as imagens das placas utilizadas na realização do experimento encontram-se no anexo 3 h, i, j e k.

Vale ressaltar que após obtenção dos resultados com a fração hexânica no cultivo tradicional do fungo TB3, o ensaio foi repetido nas concentrações 512; 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5 µg/mL. O resultado obtido foi que a concentração mínima inibitória para esse extrato foi de 64 µg/mL.

5.4 Análise dos cromatogramas

Após a realização dos ensaios CIM para as amostras de interesse de ambos os fungos, as que apresentarem atividade foram enviadas à Central Analítica da Farmácia, onde foi realizada a técnica de CG-EM .

5.4.1 Cromatogramas *Sordaria tamaensis*

A figura 20 representa o cromatograma de íons totais que foi obtido após análise do extrato do fungo TB1 eliciado com sinvastatina na sua fração hexânica (3 B JG), na figura 21 é possível observar o cromatograma do meio de cultura, em

comparação é possível notar que as substâncias presentes no extrato e que conseqüentemente geraram o efeito não estão presente no meio de cultura, uma vez que apresentam tempos de retenção distintos. A substância majoritária presente nesta fração apresentou tempo de retenção de 47.701 e o seu cromatograma está presente na figura 21.

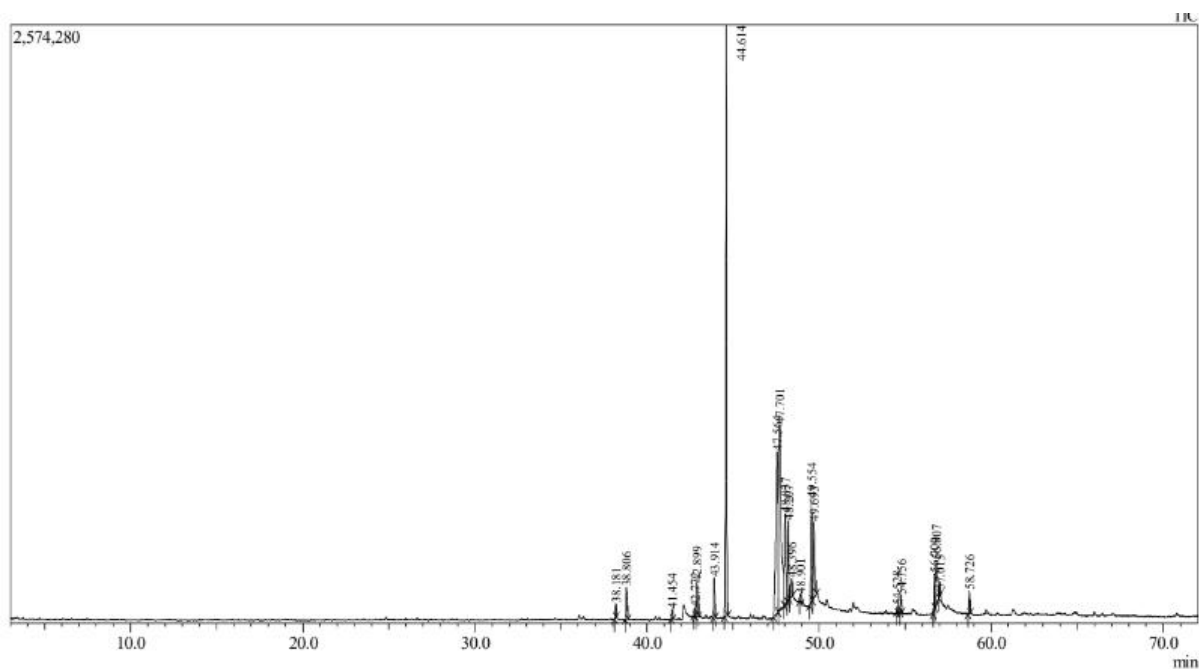


Figura 20 - Cromatograma de íons totais da fração hexânica do extrato eliciado com sinvastatina do fungo TB1 obtido através de análise CG-EM

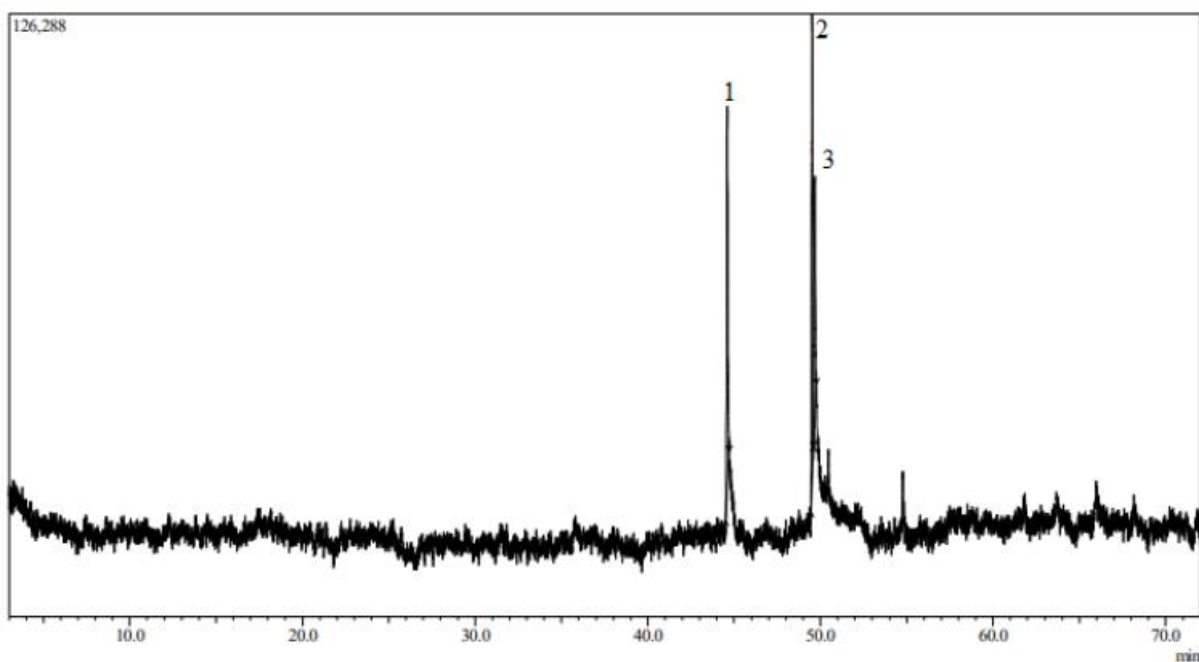


Figura 21 - Cromatograma do branco do arroz obtido através de análise CG-EM

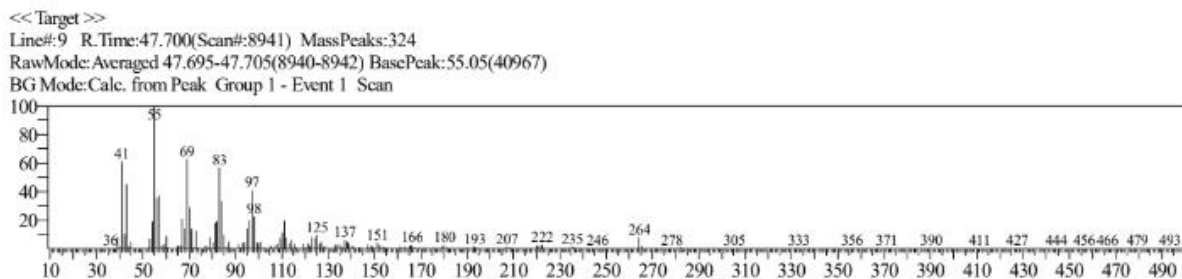


Figura 22 - Espectro de massa do tempo de retenção presente na substância majoritária obtido através de análise CG-EM

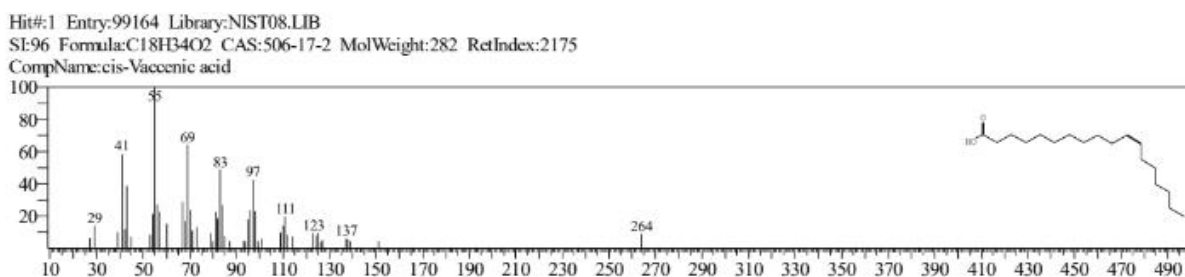


Figura 23 - Espectro de massas obtido pela base de dados do software utilizado na análise do extrato 3 B JG obtido através de análise CG-EM

O software do programa utilizado na obtenção dos espectros tem uma biblioteca, e realiza uma busca na base de dados dando a estrutura possível da substância encontrada comparando os espectros de massa (Figura 22 e 23). A substância majoritária presente no extrato é um ácido graxo denominado ácido cis vacênico, também chamado de ácido cis-11-octadecenóico, a figura 24 apresenta sua fórmula estrutural.

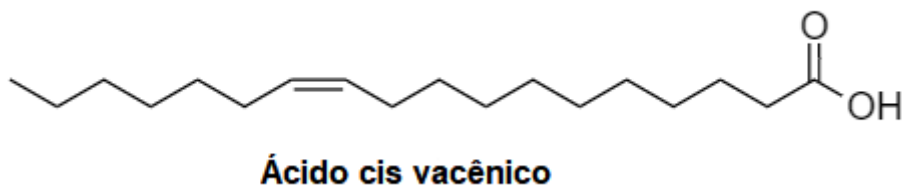


Figura 24 - Estrutura ácido cis vacênico

5.4.2 Cromatogramas TB3

A figura 25 apresenta o cromatograma de íons totais que foi obtido após a análise do extrato do fungo TB3 no cultivo tradicional em sua fração hexânica (1ATB3), na figura 21 encontra-se o cromatograma do controle do meio de cultura e é possível observar que a substância majoritária apresenta picos diferentes dos presentes no meio, mostrando que houve a produção de novas substâncias.

A figura 26, é o espectrômetro de massas do tempo de retenção do pico majoritário presente na fração, na figura 27 é um espectrômetro da base de dados do software utilizado para comparação a fim de saber o desenho da molécula apresentada, pela semelhança nos espectros é possível dizer que provavelmente se trata de um heneicosano (figura 28), que também é um ácido graxo, assim como o encontrado na análise do extrato do fungo *Sordaria tamaensis*.

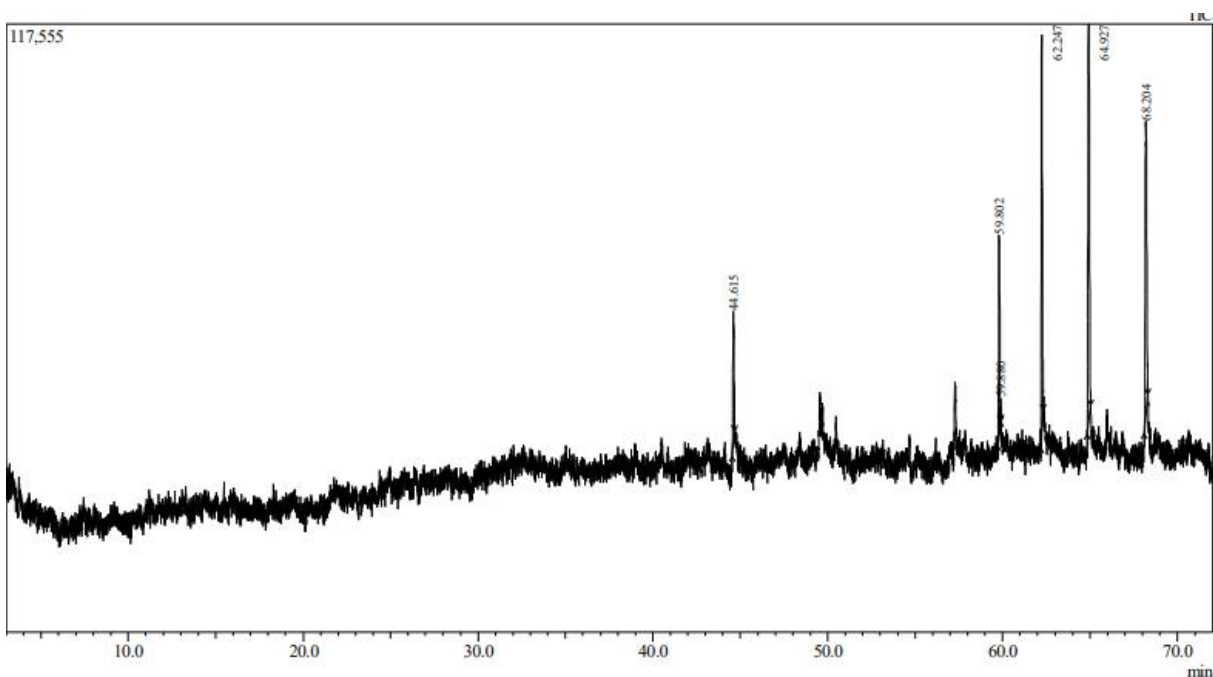


Figura 25 - Cromatograma de íons totais 1ATB3 obtido através de análise CG-EM

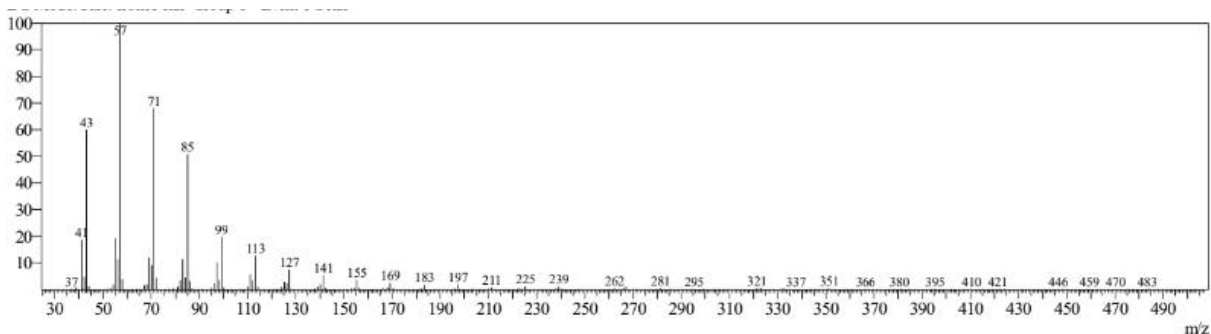


Figura 26 - Espectro de massas do tempo de retenção do pico majoritário obtido após a análise do extrato 1ATB3 em CG-EM

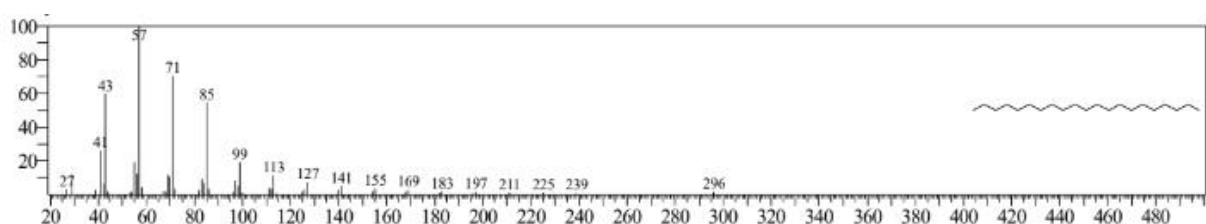


Figura 27 - Espectro de massas oriundo da base de dados do software utilizado para análise do extrato 1ATB3 obtido através de análise CG-EM

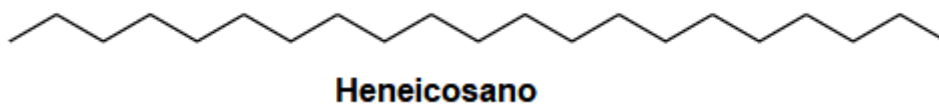


Figura 28 - Estrutura heneicosano

É relatado na literatura que os ácidos graxos tratam-se de compostos orgânicos com ácidos carboxílicos, longas cadeias alifáticas, que podem ser saturadas ou insaturadas. Esses compostos apresentam atividade bacteriana que é bem conhecida há algum tempo e além disso, algas e plantas produzem diversos ácidos graxos de interesse para se proteger de possíveis patógenos disseminados no ambiente, muita das vezes sendo úteis para proteção contra patógenos multirresistentes. Apesar de ter sua atividade antibacteriana conhecida, os mecanismos de ação que conferem essa atividade ainda não são muito compreendidos (CASILLAS-VARGAS et al, 2021).

Existem diversos benefícios que justificam a utilização de ácidos graxos em produtos por conta da sua atividade antibacteriana. Normalmente essas substâncias

conseguem exercer um efeito em uma parcela grande de microrganismos, como por exemplo os gram-positivos, gram-negativos, micobactérias, Archae, fungos filamentosos, vírus envelopados, protozoários e algas eucarióticas. Por conta disso seu uso se torna interessante quando há necessidade de afetar diversos microrganismos distintos (P DESBOIS, 2012).

Além disso, também já foi descrito que ácidos graxos apresentam uma boa interação sinérgico com outros compostos antibacterianos, o sinergismo nada mais é do que ambas as substâncias em conjunto apresentam uma eficácia maior do que se estivessem separadas, com isso, utilizam-se concentrações menores de cada substância para alcançar o efeito desejado, o que é especialmente benéfico para antibióticos com alta toxicidade, o que pode levar a uma diminuição dos efeitos adversos que são apresentados (P DESBOIS, 2012).

Um estudo realizado utilizando lipossomas de ácido oleico como carreadores de antibióticos demonstrou que o valor de concentração inibitória mínima (CIM) para essas substâncias foi de 8 µg/mL, enquanto para os antibióticos sozinhos variou de 32 a 1024 µg/mL, o que indica o efeito sinérgico dessa substância para o tratamento de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes, tanto em conjunto com antibiótico, quanto sozinha (PUSHPARAJ et al, 2018).

Em um estudo realizado com derivados sintéticos do ácido hexadecanóico foi possível observar que tais substâncias conseguiram inibir o crescimento tanto de *S. aureus*, quanto de *E. coli*, além disso, um desses compostos isolados foi testado em conjunto com o ciprofloxacino, para isolados clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina e os resultados demonstraram que o isolado sintético conseguiu melhorar a atividade do antibacteriano (SANABRIA-RÍOS et al, 2020).

Neste ano foi publicado um artigo reportando que a fração hexânica do extrato bruto de *Talaromyces trachyspermus* conseguiu inibir o crescimento de bactérias gram positivas (*S. aureus*) e gram negativas (*E. coli*), quando realizada a análise do extrato para obtenção das estruturas, uma das encontradas foi o ácido cis vacênico, assim como o encontrado no extrato do TB1 (FARHAT et al, 2022).

Em um trabalho publicado em 2021 pesquisadores avaliaram a atividade antibacteriana da fração acetato de etila obtido através do fungo endofítico *Paraconiothyrium brasiliense*, onde demonstrou-se que esse fungo apresentou CIM de 62,5 µg/mL para *E. coli* e de 15,62 µg/mL para *S. aureus*, em análises para observar quais os compostos presentes encontraram 12 compostos voláteis, dentre

eles o heneicosano, similar ao encontrado na análise do fungo TB3 (SATHIYASEELAN, et al 2021).

5.5 Revisão bibliográfica

Após a busca na base de dados o resultado obtido foi transformado no quadro 5, onde na primeira coluna está a espécie do fungo utilizado no experimento, na segunda coluna está o método de eliciação presente, já na terceira coluna encontra-se o que gerou essa eliciação e na quarta e última coluna a referência da base de dados.

Com os dados inseridos na tabela fez-se um levantamento para saber quais eliciadores foram mais utilizados, o que resultou a utilização desse eliciador (aumento da concentração de uma substância já conhecida ou produção de uma nova substância) e quais foram as principais substâncias que tiveram sua obtenção melhorada através da eliciação.

Quadro 5 - Resultados obtidos na busca das bases de dados

Espécie do fungo	Método utilizado	Resultado obtido	Referência
<i>Trichoderma atroviride</i> D16	ácido jasmônico e KAR ₁	Aumento da produção de tanshinona I (T-I)	ZHOU et al, 2019
<i>Meyerozyma caribbica</i> cepa h63a (KP674752)	nanopartículas de óxido de zinco, prata, quitosana	Aumento da concentração do metabólito CPT	ASWANI et al, 2020
<i>P. microspora</i>	ácido salicílico	Aumento da concentração de taxol	SUBBAN et al, 2019

<i>Paraconiothyrium variable</i>	ácido salicílico	Aumento da concentração de taxol	SUBBAN et al, 2019
<i>Aspergillus aculeatus</i>	CuSO ₄	Aumento da concentração de taxol	SUBBAN et al, 2019
<i>Aspergillus aculeatus</i>	acetato de sódio	Aumento da concentração de taxol	SUBBAN et al, 2019
<i>Aspergillus aculeatus</i>	ácido salicílico	Aumento da concentração de taxol	SUBBAN et al, 2019
<i>Aspergillus niger</i> 58	metanol; clorofórmio; acetonitrila; acetona; 1-butanol	Produção de compostos com potencial antimalárico	TOGHUEO et al, 2018
<i>Fusarium</i> sp. N240	1-butanol; acetona; clorofórmio; acetonitrila	Produção de compostos com potencial antimalárico	TOGHUEO et al, 2018
<i>Phomopsis</i> sp. N114	clorofórmio; acetonitrila; 1-butanol; acetona	Produção de compostos com potencial antimalárico	TOGHUEO et al, 2018

<i>Xylaria</i> sp. N120	acetonitrila; 1-butanol; acetona; clorofórmio	Produção de compostos com potencial antimalárico	TOGHUEO et al, 2018
<i>Aspergillus aculeatinus</i>	benzoato de sódio; AS; fenilalanina; acetato de sódio; glicina; CuSO ₄	Aumentou a produção de taxol	QIAO et al, 2017
<i>Alternaria alternata</i>	Tricostatina A (inibidor da histona desacetilase)	Levou a produção de várias pequenas moléculas não identificadas	OKADA et al, 2017
<i>Penicillium expansum</i>	Tricostatina A (inibidor da histona desacetilase	Levou a produção de várias pequenas moléculas não identificadas	OKADA et al, 2017
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5-azacitidina (inibidor da DNA metiltransferase)	Levou a produção de diversas oxilipinas	OKADA et al, 2017
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	ácido suberoilânida hidroxâmico (inibidor da histona desacetilase)	Levou a produção de perilenquinonas críticas, incluindo novos análogos de cladocromo	OKADA et al, 2017

<i>Diatrype</i> sp	5-azacitidina (inibidor da DNA metiltransferase)	Levou a produção de policetídeos críticos e lunaldas A e B	OKADA et al, 2017
<i>A. niger</i>	ácido suberoilânido hidroxâmico (inibidor da histona desacetilase)	Produção do metabólito crítico nigerona	OKADA et al, 2017
<i>Alternaria</i> sp	5-azacitidina; ácido suberoilânido hidroxâmico	Produção de diversas micotoxinas críticas, como: alternariol, ácido tenuazônico e aumento da produção de altertoxina II	OKADA et al, 2017
<i>Paraconiothyrium variable</i>	acetato de amônio; fenilalanina; ácido jasmônico; acetato de sódio; AS; nitrato de prata; serina	Aumento da produção de taxol	SOMJAIPEN et al, 2017
<i>Epicoccum nigrum</i>	AS; ácido jasmônico; acetato de amônio; serina; fenilalanina; nitrato de	Aumento da produção de taxol	SOMJAIPEN et al, 2017

	prata; acetato de sódio		
<i>Xylaria sp.</i>	Li ²⁺ ;Mn ²⁺ ;triptofano; AS; indol;Ce(NO ₃) ₃ ·6H ₂ O; Cr(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O; CuSO ₄ ·5H ₂ O; FeCl ₂ ·H ₂ O; MnSO ₄ ·H ₂ O; CaCl ₂ ; NaSeO ₃ ; LiCl·H ₂ O	Melhorou a produção de hidroxiamptecina (HCPT)	LIU et al, 2010
<i>Nodulisporium sylviforme</i>	serina; AS;nitrato de prata; acetato de amônio	Aumentou a produção de taxol	EL-SAYED et al, 2019
<i>Periconia sp.</i>	serinol; ácido p-hidroxibenzoico; ácido gálico; ácido benzoico; benzoato; ácido β-resorcílico	Aumentou a produção de taxol	EL-SAYED et al, 2019
<i>Fusarium mare</i>	acetato de sódio	Aumentou a produção de taxol	EL-SAYED et al, 2019
<i>Epicocum nigrum</i>	serina	Aumentou a produção de taxol	EL-SAYED et al, 2019

<i>Pestalotiopsis microspora</i>	fluconazol	Aumentou a produção de taxol	EL-SAYED et al, 2019
<i>Aspergillus flavipes</i>	fluconazol	Aumentou a produção de taxol	EL-SAYED et al, 2019
<i>T. atroviride</i>	metil jasmonato; AS; Ca ²⁺ ;Cu ²⁺ ;Li ⁺ ; Mn ²⁺ ; triptamina; secologanina	Melhorou a produção de camptotecina (CPT)	PU et al, 2013
<i>Diaporthe pseudomangiferae</i>	ácido valpróico (inibidor da HDAC)	Levou a produção de xilarolida, xilalorida A, xilalorida B e diportarina	BHARATIYA et al, 2021
<i>Diaporthe terebinthifoli</i>	ácido valpróico (inibidor da HDAC)	Levou a produção de xilarolida, xilalorida A, xilalorida B e diportarina	BHARATIYA et al, 2021
<i>Torrubiella luteorostrata</i>	suberoilanolida hidroxâmico	Levou a produção de luteoína A, B e C, terezina D e paecilodepsipeptídeo	BHARATIYA et al, 2021
<i>Diatrype sp.</i>	5-Azacidina	Produção de lunalidas A e B	BHARATIYA et al, 2021

<i>Cladosporium cladosporioides</i>	5-Azacitidina	Produção de oxilipinas , ácido 9,12 hidroioctadeca-9dienoico,	BHARATIYA et al, 2021
<i>Pestalotiopsis acaciae</i>	Adição de 5-Azacitidina; ácido suberoilânido hidroxâmico	Produção de prenildepside, metilcumarinas e aumentou a concentração de metabólitos já conhecidos.	BHARATIYA et al, 2021
<i>Phomopsis asparagi</i>	jasplakinolida	Produção de chaetoglobosinas 510, 540 e 542	BHARATIYA et al, 2021
<i>Chaetomium cancroideum</i>	nicotinamida (inibidor HDAC);	Produção de cancrolidas A e B, chaetofenol G, B e C	BHARATIYA et al, 2021
<i>Chaetomium cancroideum</i>	ácido suberoilânido hidroxâmico (inibidor da histona desacetilase)	Produção de cladocromos R e F e calfofostima B	BHARATIYA et al, 2021
<i>Microascus sp. 098059A</i>	ácido suberoilânido hidroxâmico (inibidor da histona desacetilase)	Produção do ciclo depsipeptideo	BHARATIYA et al, 2021

<i>Penicillium brevicompactum</i>	nicotinamida (inibidor HDAC)	Levou a produção de compostos fenólicos	BHARATIYA et al, 2021
<i>Leucostoma personii</i>	ácido suberoilânida hidroxâmico (inibidor da histona desacetilase)	Levou a produção de citosporonas B, C e E	BHARATIYA et al, 2021
<i>Aspergillus niger</i>	ácido suberoilânida hidroxâmico (inibidor da histona desacetilase)	Produção de nigerona A	BHARATIYA et al, 2021
<i>Penicillium brevicompactum</i>	butirato de sódio (inibidor da HDAC)	Produção de peróxido de egosterol e ácido antranílico	BHARATIYA et al, 2021
<i>Fusarium oxysporum</i>	ácido suberoilânida hidroxâmico (inibidor da histona desacetilase)	Produção de ácido fusárico	BHARATIYA et al, 2021
<i>Ganoderma lucidum</i>	cafeína, 3-isobutil-1-metil-xantina e fluoridrato de sódio	Produção de ácido ganodérmico	BHARATIYA et al, 2021

<i>Alternaria alternata</i>	5-azacitidina; ácido suberoilânido hidroxâmico	Produção de alternariol, altenusim e ácido tenuasônico	BHARATIYA et al, 2021
<i>Aspergillus unguis</i>	procaína (inibidor da DNA metiltransferase)	Produção de unguinol, unguisina A e aspergilusidona F	BHARATIYA et al, 2021
<i>Aspergillus flavus</i>	cicloheximida (inibidor de síntese de dsRNA)	Produção de aflatoxina	BHARATIYA et al, 2021
<i>Penicillium oxalicum B4</i>	ácido artemisínico	Produção das moléculas: ácido 3 α ,14-dihidroxiarte misinico , ácido 14-hidroxi-3-oxo-art emisinico, ácido 15-hidroxi-3-oxo-art emisinico, ácido 12, 15-artemisinodioico e ácido 1,2,3,6-tetradehidro -12, 15-artemisinodioico	TIAN et al, 2021
<i>Aspergillus sp. AST0006</i>	ácido suberoilânido hidroxâmico (inibidor da histona desacetilase)	Produção de aspiranocromenon as A e B e isocoumarina, (-)-6,7-dihidroxi melena	DE AMORIM et al, 2020

<i>Hyalodendriella</i> sp. Ponipodef12	Zn ²⁺ ; Cu ²⁺ ; Mg ²⁺	Produção melhor de botralina e de TMC-264	LUO et al, 2016
<i>Phoma</i> sp. nov. LG0217	ácido suberoilânilda hidroxâmico (inibidor da histona desacetilase)	Obtenção de (10'S)-verruculideo B, vermistatina e dihidrovermistatina	GUBIANI et al, 2017
<i>Aspergillus flavipes</i>	fluconazol	Melhorou a produção de taxol	EL-SAYED et al, 2019

AS - ácido salicílico

CPT - camptotecina

KAR₁ - butenolida isolada por fumaça

De acordo com os dados apresentados acima, a eliciação permitiu aos fungos aumentarem a concentração de um metabólito conhecido em 55,12% e em 44,88% foi produzido um novo metabólito secundário. (Figura 29)

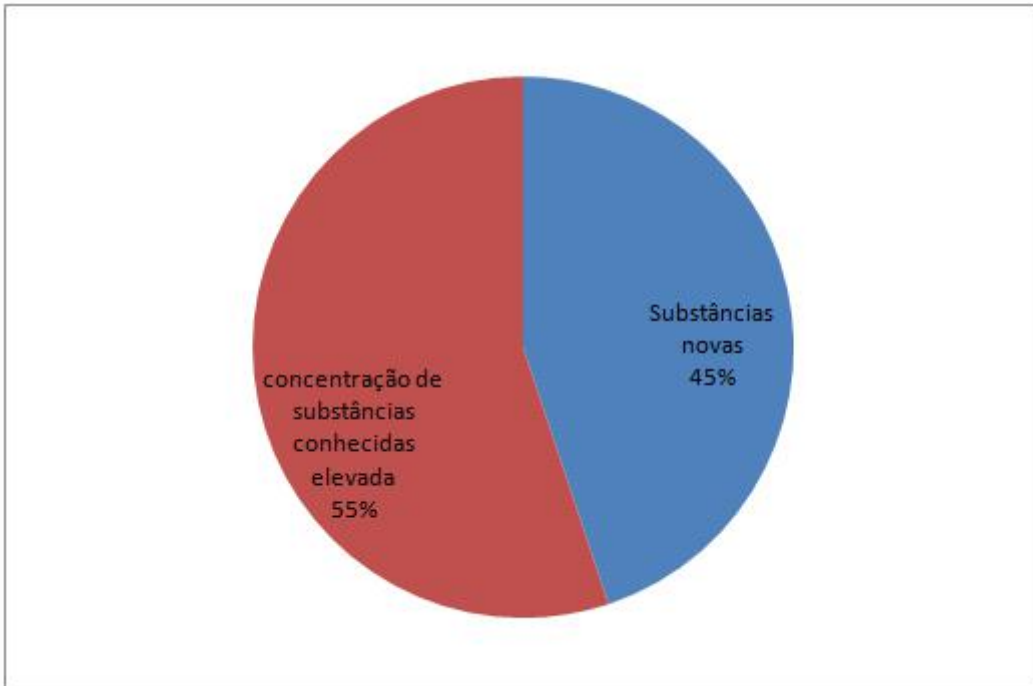


Figura 29 - Gráfico representando a porcentagem de substâncias novas descobertas e a porcentagem de aumento da concentração de substâncias conhecidas

As substâncias que mais tiveram sua concentração aumentada através da eliciação foram : taxol (57,14%), seguida de hidroxicamptotecina (18,57%) e camptotecina (15,71%). As demais substâncias que tiveram sua concentração aumentada foram : TMC, botrallina e tanshinona I (Figura 30).

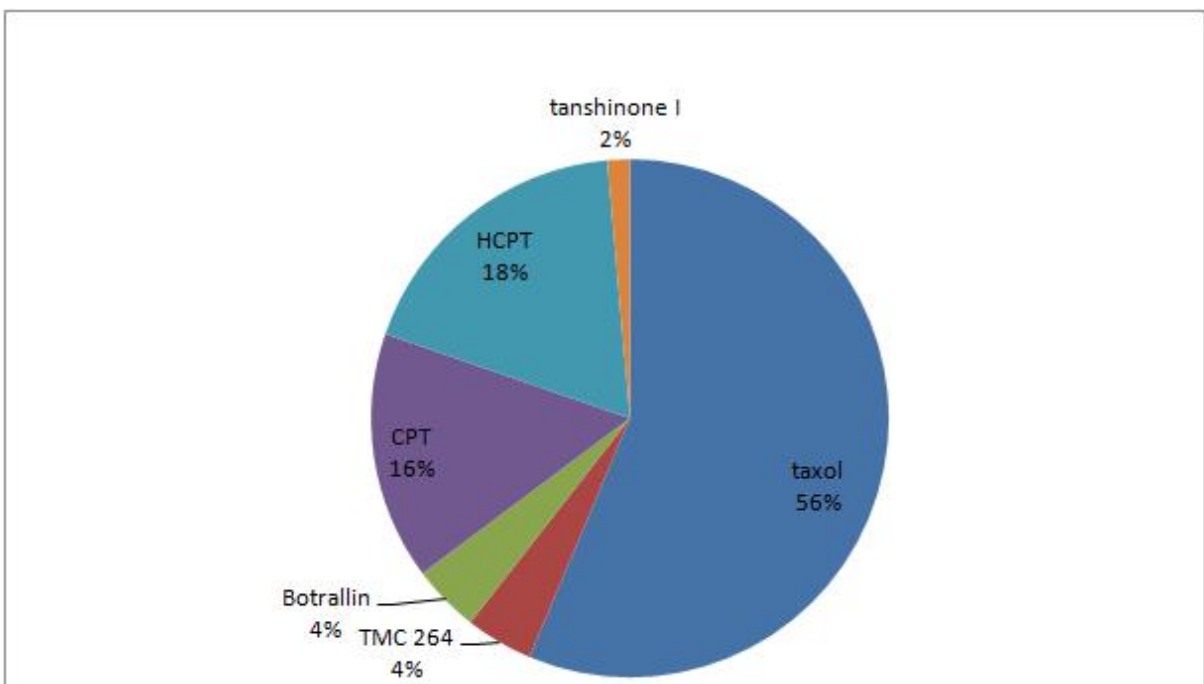


Figura 30 - Gráfico representando a porcentagem de substâncias que tiveram sua concentração aumentada através da eliciação

HCPT- hidroxycamptotecina

CPT- camptotecina

Tendo em vista que o taxol é uma molécula muito visada nos últimos anos, por sua importância terapêutica e econômica, isso pode explicar o motivo de ser um alvo para estudos, visto que sua obtenção através da natureza demanda muita matéria prima, com isso muito artigos visam descobrir uma maneira de aumentar significativamente a concentração obtida dessa molécula.

Para obtenção do resultado no qual acontecia o aumento de alguma substância já produzida pela planta foram utilizados 30 eliciadores, dentre os mais utilizados em ordem decrescente estão: íons (17,91%), ácido salicílico (13,43%), acetato de sódio (7,46%), serina (5,97%), ácido jasmônico (4,47%), fluconazol (4,47%), acetato de amônio (4,47%), nitrato de prata (4,47%) e fenilalanina (4,47%) (Figura 31).

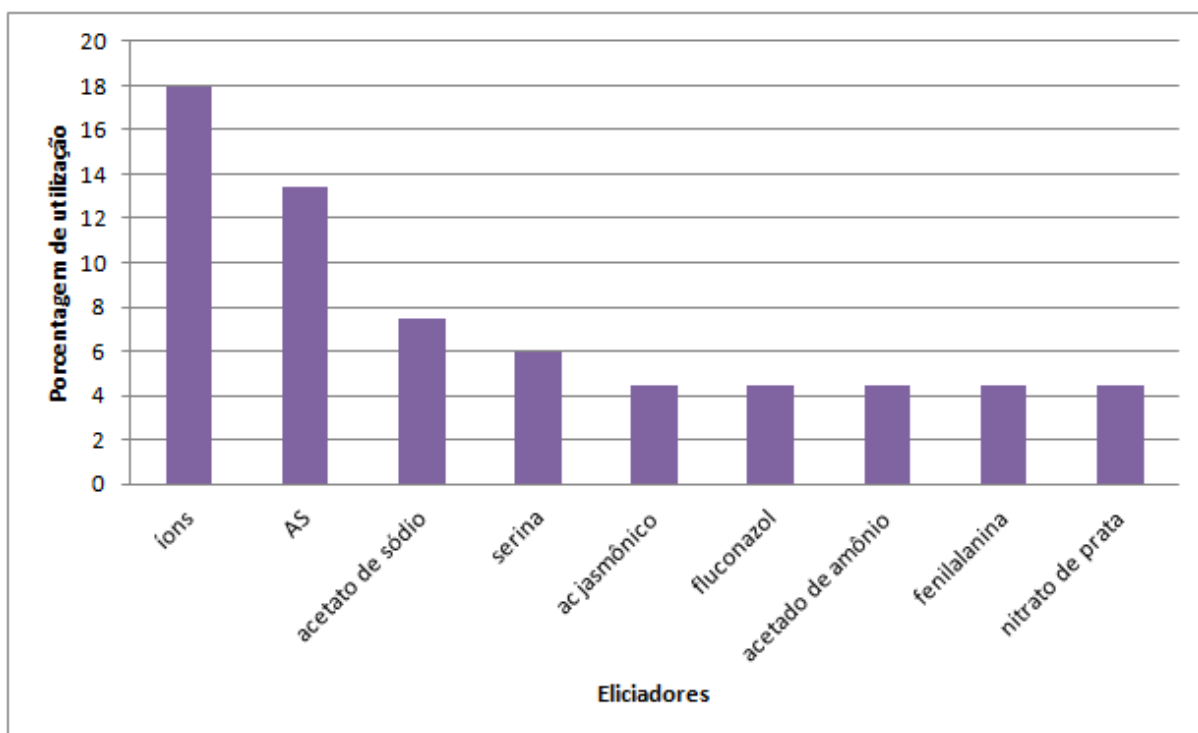


Figura 31 - Gráfico representando os eliciadores mais utilizados quando havia aumento de concentração de substâncias já conhecidas

AS - ácido salicílico

íons - Zn²⁺; Li⁺; Mn²⁺; Ca²⁺; Cu⁺; Mg²⁺

Já quando o resultado era obtenção de novas substâncias os eliciadores que mais foram utilizados: ácido suberoilânido hidroxâmico ou SAHA (26,53%), 5-azacitidina (14,28%), 1-butanol (8,16%), acetonitrila (8,16%), acetona (8,16%), clorofórmio (8,16%), nicotinamida (4,08%), ácido valproico (4,08%) e tricostatina A (4,08%) (Figura 32).

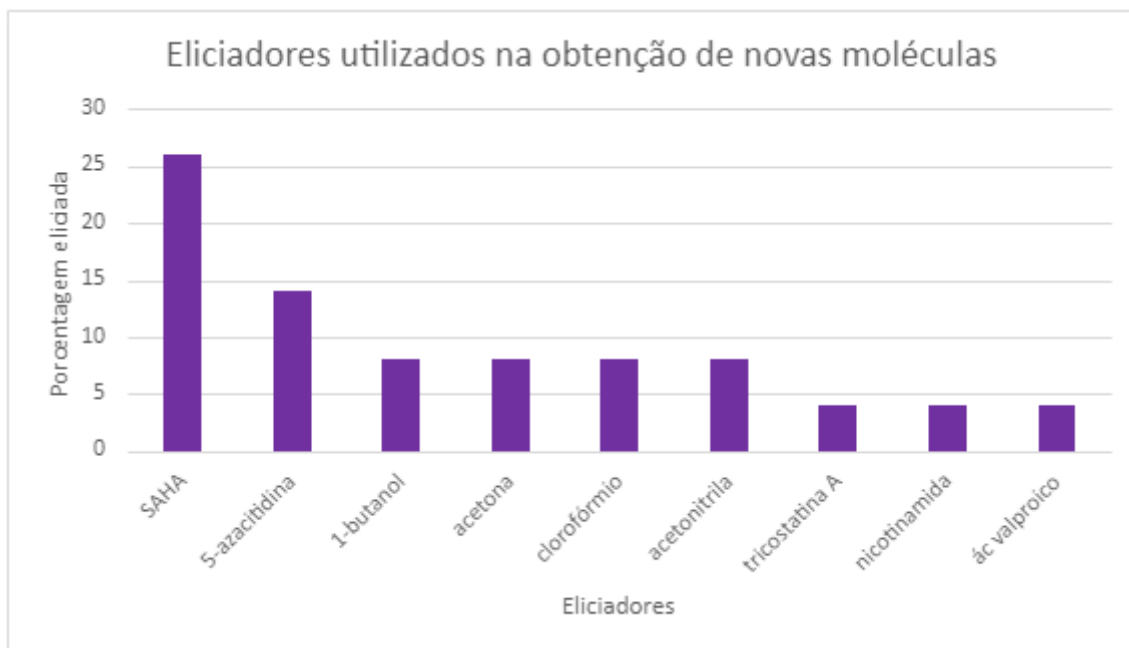


Figura 32 - Gráfico representando os eliciadores mais utilizados quando há produção de novas moléculas

SAHA - ácido suberoilânido hidroxâmico

Os dados obtidos através das bases de dados demonstram que para a eliciação de fungos endofíticos que resultaram na descoberta de novas moléculas, os eliciadores que mais deram resultados foram um inibidor da histona desacetilase (ácido suberoilânido hidroxâmico) e um inibidor da DNA metiltransferase (5-azacitidina).

As enzimas histona desacetilase e histona acetilase estão envolvidas no processo de acetilação e desacetilação da lisina, que é uma modificação pós traducional sofrida por fungos, a acetilação da lisina faz com que ela perca sua afinidade de se ligar com o DNA, enquanto sua desacetilação aumenta sua afinidade com o DNA, com isso essa afinidade ou não da lisina de se ligar com o DNA, contribui para a cromatina estar “aberta” ou “fechada”, o que sabe-se estar envolvido na ativação de genes e na silenciamento (CICHEWICZ, 2010).

Sabe-se que a enzima DNA metiltransferase é responsável por modificações no DNA após a tradução, uma vez que transforma a citosina em seu produto 5-metilcitosina, essas mudanças causadas tanto pela metilação do DNA, quanto pelas modificações causadas pelas enzimas histonas, conseguem mudar aspectos da cromatina e da expressão gênica, sendo assim responsáveis pelo silenciamento de genes nos fungos (CICHEWICZ, 2010). A partir disso, a utilização de inibidores dessas enzimas, são capazes de ativar os genes que são silenciados por esses mecanismos.

Esses resultados comprovam a grande eficácia desses mecanismos de eliciação, que ativa genes silenciosos responsáveis pela produção de metabólitos secundários. Também fica evidente a importância da utilização de solventes orgânicos e de íons metálicos, apesar de não terem mecanismos muito bem elucidados, pelos resultados obtidos pode-se perceber que promovem sim mudanças no metabolismo de fungos (TOGHUEO et al, 2020).

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que nenhum extrato foi capaz de inibir o crescimento da *Escherichia coli* ATCC 25922. Em contrapartida os extratos eliciados com sinvastatina na fração hexânica obtidos a partir do fungo TB1 em sua maior concentração (512 µg/mL), conseguiram inibir o crescimento da *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Já para os extratos testados oriundos do fungo TB3, a fração hexânica cultivada tradicionalmente conseguiu inibir o crescimento bacteriano nas concentrações 512; 256; 128; 64 µg/mL.

Após análise em CG-EM das frações que obtiveram resultado positivo, foram identificados ácidos graxos em ambas, para o *Sordaria tamaensis* foi identificado o ácido cis vacênico e para o TB3 o heneicosano.

Com base nos dados obtidos na literatura foi possível identificar inúmeros eliciadores, observou-se que a principal molécula estudada para melhorar sua obtenção foi o taxol, por conta de sua importância terapêutica e econômica, além disso os principais mecanismos que resultaram em obtenção de novas moléculas foi a inibição da histona desacetilase, inibição da DNA metiltransferase, além da utilização de íons e solventes orgânicos como fonte de mudanças no metabolismo

de fungos. Com isso pode-se concluir que a utilização de eliciadores é de extrema importância tanto para melhorar a produção de metabólitos secundários já conhecidos, quanto para levar a produção de metabólitos que ainda não foram estudados, com isso torna-se uma fonte importante de novas moléculas com potencial para serem novos fármacos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (PNPCIRAS) 2021 a 2025. Brasília, 5 de março de 2021.

ANVISA. RESOLUÇÃO – RDC Nº 20, DE 5 DE MAIO DE 2011. Disponível em <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/rdc0020_05_05_2011.html> . Acesso em outubro de 2022

ARAUJO, L.V.; FREIRE, D.M.G; NITSCHKE, M. Biosurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. Química Nova, v. 36, p. 848-858, 2013.

ASWANI, R. et al. Nanoelicitor based enhancement of camptothecin production in fungi isolated from *Ophiorrhiza mungos*. Biotechnology progress, v. 36, n. 6, p. e3039, 2020.

BHARATIYA, P. et al. Multifarious Elicitors: Invoking Biosynthesis of Various Bioactive Secondary Metabolite in Fungi. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 193, n. 3, p. 668-686, 2021.

BODE, H. et al. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. ChemBioChem, v. 3, n. 7, p. 619-627, 2002.

CABRAL, L.G. et al. Racionalização de antimicrobianos em ambiente hospitalar. Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica, v. 16, n. 1, p. 59-63, 2018.

CALIXTO, C.M.F; CAVALHEIRO, É. T. G. Penicilina: efeito do acaso e momento histórico no desenvolvimento científico. Química Nova na escola, v. 34, n. 3, p. 118-123, 2012.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Ciência e Cultura, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

CAMPOS, R. et al. Parque nacional da restinga de Jurubatiba. Macaé, RJ. Iris mídia, 2015

CASILLAS-VARGAS, G. et al. Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. *Progress in lipid research*, v. 82, p. 101093, 2021.

CECIH-RJ. Boletim informativo da coordenação estadual de controle de infecção hospitalar divulgação de dados referentes a IRAS no estado do Rio de Janeiro em 2019. Edição anual, setembro de 2020. Disponível em <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/boletim_informativo_cecjh_rj_2020_dados_iras_2019.pdf>. Acesso em outubro de 2022

CHAGAS, F.O. Cultura mista, manipulação química e genética de micro-organismos: estratégias para a diversificação do metabolismo secundário. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CHIESA, D.P. Fungos Endolíticos: uma revisão integrativa. 2022.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standards – Tenth Edition*, 2015.

COGLIATTI-CARVALHO, L. et al. Variação na estrutura e na composição de Bromeliaceae em cinco zonas de restinga no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, Macaé, RJ. *Brazilian Journal of Botany*, v. 24, p. 01-09, 2001.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2002. nº 303, de 20 de março de 2002. Ministério do Meio Ambiente.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

COSTA, M. et al. Principais micro-organismos responsáveis por infecções relacionadas à assistência em saúde (iras) em UTIs: uma revisão integrativa. *Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres*, v. 8, n. 1, p. 30-30, 2019.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of natural products*, v. 60, n. 1, p. 52-60, 1997.

CZARNIK, A. W.; Guest editorial. *Acc. Chem. Res.* 1996, 29, 112.

DE AMORIM, M.R. et al. An epigenetic modifier induces production of 3-(4-oxopyrano)-chromen-2-ones in *Aspergillus sp.* AST0006, an endophytic fungus of *Astragalus lentiginosus*. *Tetrahedron*, v. 76, n. 43, p. 131525, 2020.

DE OLIVEIRA, G.P. et al. Indução metabólica de fungos filamentosos pelas técnicas de co-cultivo, OSMAC e modulação epigenética: produção de metabólitos secundários com atividade neuroprotetora. 2019.

DOS SANTOS LEITE, M. Perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de amostras de urina de pacientes de uma Unidade de Terapia Intensiva. RBAC, v. 52, n. 3, p. 243-7, 2020.

EBADA, S.S.; EBRAHIM, W. A new antibacterial quinolone derivative from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* strain Eich. 5.2. 2. South African Journal of Botany, v. 134, p. 151-155, 2020.

ECDC. Surveillance Atlas of infectious Diseases. Disponível em <<https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>>. Acesso em outubro de 2022

EL-SAYED, A.S.A. et al. Exploiting the Biosynthetic Potency of Taxol from Fungal Endophytes of Conifers Plants; Genome Mining and Metabolic Manipulation. Molecules, v. 25, n. 13, p. 3000, 2020.

EL-SAYED, A.S.A. et al. Sterol inhibitor “Fluconazole” enhance the Taxol yield and molecular expression of its encoding genes cluster from *Aspergillus flavipes*. Process Biochemistry, v. 76, p. 55-67, 2019.

FARHAT, H. et al. Evaluation of antibacterial potential of endophytic fungi and GC-MS profiling of metabolites from *Talaromyces trachyspermus*. South African Journal of Botany, v. 150, p. 240-247, 2022.

FARIA, R.X. et al. Molluscicidal activity of *Manilkara subsericea* (Mart.) dubard on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Acta tropica, v. 178, p. 163-168, 2018.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development—the failure of success?. Nature biotechnology, v. 24, n. 12, p. 1497-1503, 2006.

GOODMAN, L.S. e GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.

GUBIANI, J.R. et al. An epigenetic modifier induces production of (10' S)-verruculide B, an inhibitor of protein tyrosine phosphatases by *Phoma* sp. nov. LG0217, a fungal endophyte of *Parkinsonia microphylla*. Bioorganic & medicinal chemistry, v. 25, n. 6, p. 1860-1866, 2017.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Química Nova, v. 33, p. 667-679, 2010.

GUPTA, S. et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant

endophytic fungi. *Biotechnology advances*, v. 39, p. 107462, 2020.

HARPER, J.K. et al. Pestacin: a 1, 3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron*, v. 59, n. 14, p. 2471-2476, 2003.

HILÁRIO F. Estudo de modificadores químicos epigenéticos no cultivo de fungos endofíticos associados à *Paepalanthus chiquitensis* (Eriocaulaceae) e avaliação da atividade antimicrobiana. Araraquara- SP, 2020 . Disponível em <2020 https://repositório.unesp.br/bitstream/handle/11449/192276/hilario_f_dr_arafcf_par.pdf?sequence=10&isAllowed=y>. Acesso em março de 2021

HOW, C.W et al. How Far Have We Explored Fungi to Fight Cancer?. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2021.

ICMBIO. Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba, galeria de imagens. Disponível em <<https://www.icmbio.gov.br/parnajurubatiba/galeria-de-imagens.html>>. Acesso em setembro de 2022

INDRIANINGSIH, A.W.; TACHIBANA, S. α -Glucosidase inhibitor produced by an endophytic fungus, *Xylariaceae* sp. QGS 01 from *Quercus gilva* Blume. *Food Science and Human Wellness*, v. 6, n. 2, p. 88-95, 2017.

KESHAVAN, B. et al. In vitro elicitation of Camptothecin by challenging with biotic elicitors in *Nothapodytes nimmoniana* (J. Graham) Mabb. *South African Journal of Botany*, v. 144, p. 325-331, 2022.

LI, F. et al. Inducing new bioactive metabolites production from coculture of *Pestalotiopsis* sp. and *Penicillium bialowiezense*. *Bioorganic Chemistry*, v. 110, p. 104826, 2021.

LIMA, C.C.; BENJAMIM, S.C.C.; SANTOS, R.F.S. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. *CuidArte, Enferm*, p. 105-113, 2017.

LIU, K. et al. 10-Hydroxycamptothecin produced by a new endophytic *Xylaria* sp., M20, from *Camptotheca acuminata*. *Biotechnology Letters*, v. 32, n. 5, p. 689-693, 2010.

LUO, H. et al. Enhancement of botrallin and TMC-264 production in liquid culture of endophytic fungus *Hyalodendriella* sp. Ponipodef12 after treatments with metal ions. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 24, p. 12-20, 2016.

MOHAMED, H. et al. Deep learning strategies for active secondary metabolites biosynthesis from fungi: Harnessing artificial manipulation and application. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 38, p. 102195, 2021.

MOLINA, R.D.I et al. Laurel extracts inhibit Quorum sensing, virulence factors and biofilm of foodborne pathogens. LWT, v. 134, p. 109899, 2020.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. Journal of natural products, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020.

OKADA, B.K.; SEYEDSAYAMDOST, M.R. Antibiotic dialogues: induction of silent biosynthetic gene clusters by exogenous small molecules. FEMS microbiology reviews, v. 41, n. 1, p. 19-33, 2017.

OPAS. PLISA Plataforma de informação de saúde das Américas. Disponível em <<https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/resistencia-antimicrobiana/567-amr-vig-es.html>>. Acesso em 2022

P DESBOIS, A. Potential applications of antimicrobial fatty acids in medicine, agriculture and other industries. Recent patents on anti-infective drug discovery, v. 7, n. 2, p. 111-122, 2012.

PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. Drug discovery today, v. 21, n. 2, p. 204-207, 2016.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial ecology of leaves. Springer, New York, NY, 1991. p. 179-197.

PINEDO-RIVILLA, C.; ALEU, J.; DURÁN-PATRÓN, R. Cryptic metabolites from marine-derived microorganisms using OSMAC and epigenetic approaches. Marine Drugs, v. 20, n. 2, p. 84, 2022.

PINTO, A.C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Química nova, v. 25, p. 45-61, 2002.

PU, X. et al. Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. Applied microbiology and biotechnology, v. 97, n. 21, p. 9365-9375, 2013.

PUSHPARAJ SELVADOSS, P. et al. Enhancement of antimicrobial activity by liposomal oleic acid-loaded antibiotics for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology, v. 46, n. 2, p. 268-273, 2018.

QIAO, W. et al. Enhancing taxol production in a novel endophytic fungus, *Aspergillus aculeatinus* Tax-6, isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. Fungal biology, v. 121, n. 12, p. 1037-1044, 2017.

RAEKIANSYAH, M. et al. Identification of novel antiviral of fungus-derived brefeldin A against dengue viruses. *Tropical medicine and health*, v. 45, n. 1, p. 1-7, 2017.

RIBEIRO, R. et al. Hiperdiversidade tropical. Disponível em <<https://hiperdiversidade.ambiental.media/sobre>>; 2020. Acesso em agosto de 2022

ROCHA, K.S.C. et al. Lipases of Endophytic Fungi *Stemphylium lycopersici* and *Sordaria sp.*: Application in the synthesis of solketal derived Monoacylglycerols. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 142, p. 109664, 2020.

SANABRIA-RÍOS, D.J. et al. Antibacterial Activity of Hexadecynoic Acid Isomers toward Clinical Isolates of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Lipids*, v. 55, n. 2, p. 101-116, 2020.

SANTOS, N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto & Contexto-Enfermagem*, v. 13, p. 64-70, 2004.

SATHIYASEELAN, A. et al. Antibacterial activity of ethyl acetate extract of endophytic fungus (*Paraconiothyrium brasiliense*) through targeting dihydropteroate synthase (DHPS). *Process Biochemistry*, v. 111, p. 27-35, 2021.

SHU, Y. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of natural products*, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, R.A.C. Plantas medicinais do Nordeste do Brasil-*Ximenia americana* Linn: investigação química dos grãos e seu uso como biocatalisador. 2016.

SILVA, S.H.D ; BOLZANI, S.V ; PINTO, C.A; LOPES, P.N; EPIFANIO A.R. PRODUTOS NATURAIS: ATUALIDADE, DESAFIOS E PERSPECTIVAS, *Quím. Nova*, vol.25 suppl.1, São Paulo May 2002. Disponível em <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000800009>. Acesso em março de 2021.

SOMJAIPENG, S.; MEDINA, A.; MAGAN, N. Environmental stress and elicitors enhance taxol production by endophytic strains of *Paraconiothyrium variabile* and *Epicoccum nigrum*. *Enzyme and microbial technology*, v. 90, p. 69-75, 2016.

SUSSMANN, O.; MATTOS, L.; RESTREPO, A. Resistencia bacteriana. *Univ Med*, v. 43, n. 1, p. 20-6, 2002.

SUBBAN, K. et al. Salicylic acid as an effective elicitor for improved taxol production in endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *PloS one*, v. 14, n. 2, p. e0212736, 2019.

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

TEJESVI, M. V. et al. New hopes from endophytic fungal secondary metabolites. Bol Soc Quím Méx, v. 1, n. 1, p. 19-26, 2007.

TEIXEIRA, A.R. et al. Resistência bacteriana relacionada ao uso indiscriminado de antibióticos. 2019.

TIAN, H. et al. Biotransformation of artemisinic acid to bioactive derivatives by endophytic *Penicillium oxalicum* B4 from *Artemisia annua* L. Phytochemistry, v. 185, p. 112682, 2021.

TOGHUEO, R.M.K; SAHAL, D; BOYOM, F.F; Recent advances in inducing endophytic fungal specialized metabolites using small molecule elicitors including epigenetic modifiers, Phytochemistry, Volume 174,2020,. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942219303115>

UZMA, F. et al. Endophytic fungi—alternative sources of cytotoxic compounds: a review. Frontiers in pharmacology, v. 9, p. 309, 2018.

VERMA, T. et al. Current challenges and advancements towards discovery and resistance of antibiotics. Journal of Molecular Structure, v. 1248, p. 131380, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global report on infection prevention and control. World Health Organization, 23 may 2022.

XU, Z. et al. Secondary metabolites produced by mangrove endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* HQD24 with immunosuppressive activity. Biochemical Systematics and Ecology, v. 93, p. 104166, 2020.

ZHOU, J. et al. Smoke-isolated butenolide elicits tanshinone I production in endophytic fungus *Trichoderma atroviride* D16 from *Salvia miltiorrhiza*. South African Journal of Botany, v. 124, p. 1-4, 2019.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1

Metodologia de extração dos fungos endofíticos a partir da espécie vegetal *Tocoyena bullata*

Folhas e galhos da *Tocoyena bullata* foram coletados do PARNA-Jurubatiba no município de Carapebus pela Profa. Dra. Tatiana Ungaretti Paleo Konno

(UFRJ-Macaé), essas partes foram envolvidas em jornal e acomodadas em um isopor para seu transporte ao laboratório.

Para o isolamento dos fungos as folhas e os galhos foram esterilizados, sendo adicionados em álcool 70% durante dois minutos e meio, em seguida em solução de hipoclorito de sódio 5% por 90 segundos para as folhas e 5 minutos para os galhos, logo após foram mergulhados novamente em álcool 70%, foram feitos controles para cada tempo de esterilização.

Dentro do fluxo laminar os materiais foram cortados em partes pequenas, que foram transferidas para uma placa de vidro e posteriormente esses fragmentos foram inoculados em placas de petri contendo o meio BDA para crescimento dos fungos, as placas foram incubadas à 30°C e observadas diariamente, quando uma nova colônia era observada, com o auxílio de um palito de madeira era transferida para um tubo de ensaio contendo meio de cultura. Os fungos isolados foram incubados por 7 dias a 30°C.

8.2 Anexo 2

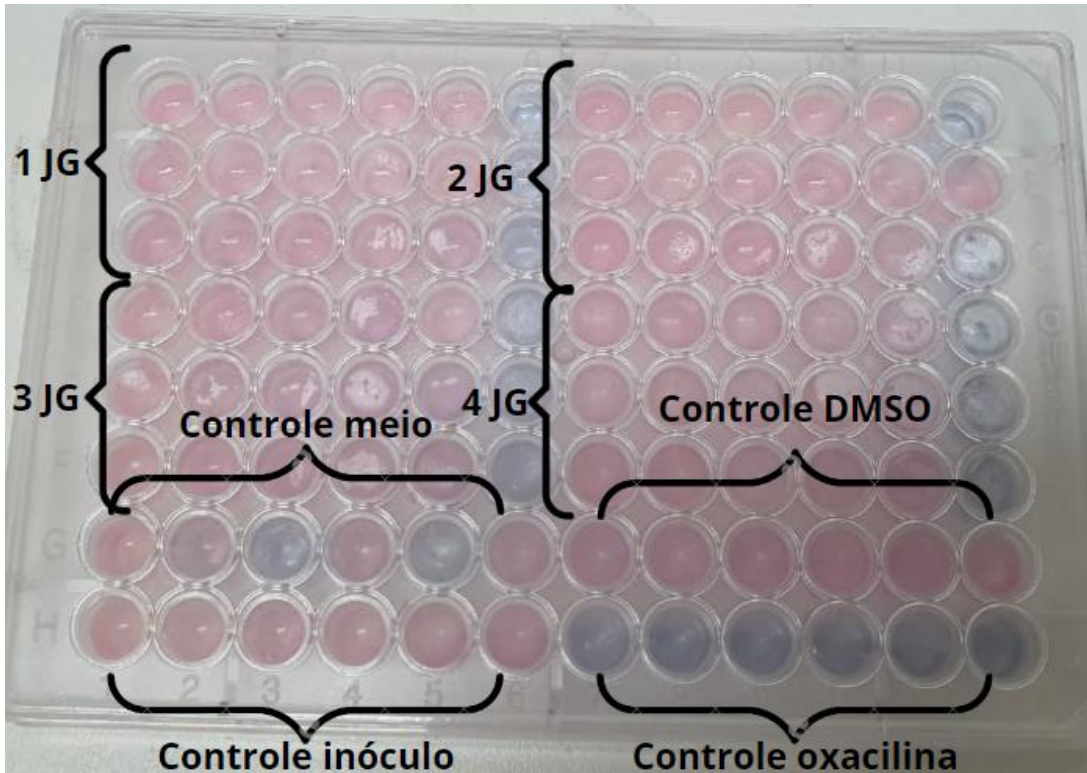
Exemplo do desenho da placa utilizada no experimento quando eram feitos ensaios com duas placas, testando no total 8 amostras. Sendo 1.1 a concentração de 512 µg/mL; 1.2 256 µg/mL; 1.3 128 µg/mL; 1.4 64 µg/mL; 1.5 32 µg/mL e 1.6 16 µg/mL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Caldo, inoculo, extrato 1.1	Caldo, inoculo, extrato 1.2	Caldo, inoculo, extrato 1.3	Caldo, inoculo, extrato 1.4	Caldo, inoculo, extrato 1.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 3.1	Caldo, inoculo, extrato 3.2	Caldo, inoculo, extrato 3.3	Caldo, inoculo, extrato 3.4	Caldo, inoculo, extrato 3.5	Controle meio
B	Caldo, inoculo, extrato 1.1	Caldo, inoculo, extrato 1.2	Caldo, inoculo, extrato 1.3	Caldo, inoculo, extrato 1.4	Caldo, inoculo, extrato 1.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 3.1	Caldo, inoculo, extrato 3.2	Caldo, inoculo, extrato 3.3	Caldo, inoculo, extrato 3.4	Caldo, inoculo, extrato 3.1	Controle meio
C	Caldo, inoculo, extrato 1.1	Caldo, inoculo, extrato 1.2	Caldo, inoculo, extrato 1.3	Caldo, inoculo, extrato 1.4	Caldo, inoculo, extrato 1.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 3.1	Caldo, inoculo, extrato 3.2	Caldo, inoculo, extrato 3.3	Caldo, inoculo, extrato 3.4	Caldo, inoculo, extrato 3.5	Controle meio
D	Caldo, inoculo, extrato 2.1	Caldo, inoculo, extrato 2.2	Caldo, inoculo, extrato 2.3	Caldo, inoculo, extrato 2.4	Caldo, inoculo, extrato 2.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 4.1	Caldo, inoculo, extrato 4.2	Caldo, inoculo, extrato 4.3	Caldo, inoculo, extrato 4.4	Caldo, inoculo, extrato 4.5	Controle meio
E	Caldo, inoculo, extrato 2.1	Caldo, inoculo, extrato 2.2	Caldo, inoculo, extrato 2.3	Caldo, inoculo, extrato 2.4	Caldo, inoculo, extrato 2.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 4.1	Caldo, inoculo, extrato 4.2	Caldo, inoculo, extrato 4.3	Caldo, inoculo, extrato 4.4	Caldo, inoculo, extrato 4.5	Controle meio
F	Caldo, inoculo, extrato 2.1	Caldo, inoculo, extrato 2.2	Caldo, inoculo, extrato 2.3	Caldo, inoculo, extrato 2.4	Caldo, inoculo, extrato 2.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 4.1	Caldo, inoculo, extrato 4.2	Caldo, inoculo, extrato 4.3	Caldo, inoculo, extrato 4.4	Caldo, inoculo, extrato 4.5	Controle meio
G	Caldo, inoculo, extrato 5.1	Caldo, inoculo, extrato 5.2	Caldo, inoculo, extrato 5.3	Caldo, inoculo, extrato 5.4	Caldo, inoculo, extrato 5.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 6.1	Caldo, inoculo, extrato 6.2	Caldo, inoculo, extrato 6.3	Caldo, inoculo, extrato 6.4	Caldo, inoculo, extrato 6.5	Controle meio
H	Caldo, inoculo, extrato 5.1	Caldo, inoculo, extrato 5.2	Caldo, inoculo, extrato 5.3	Caldo, inoculo, extrato 5.4	Caldo, inoculo, extrato 5.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 6.1	Caldo, inoculo, extrato 6.2	Caldo, inoculo, extrato 6.3	Caldo, inoculo, extrato 6.4	Caldo, inoculo, extrato 6.5	Controle meio

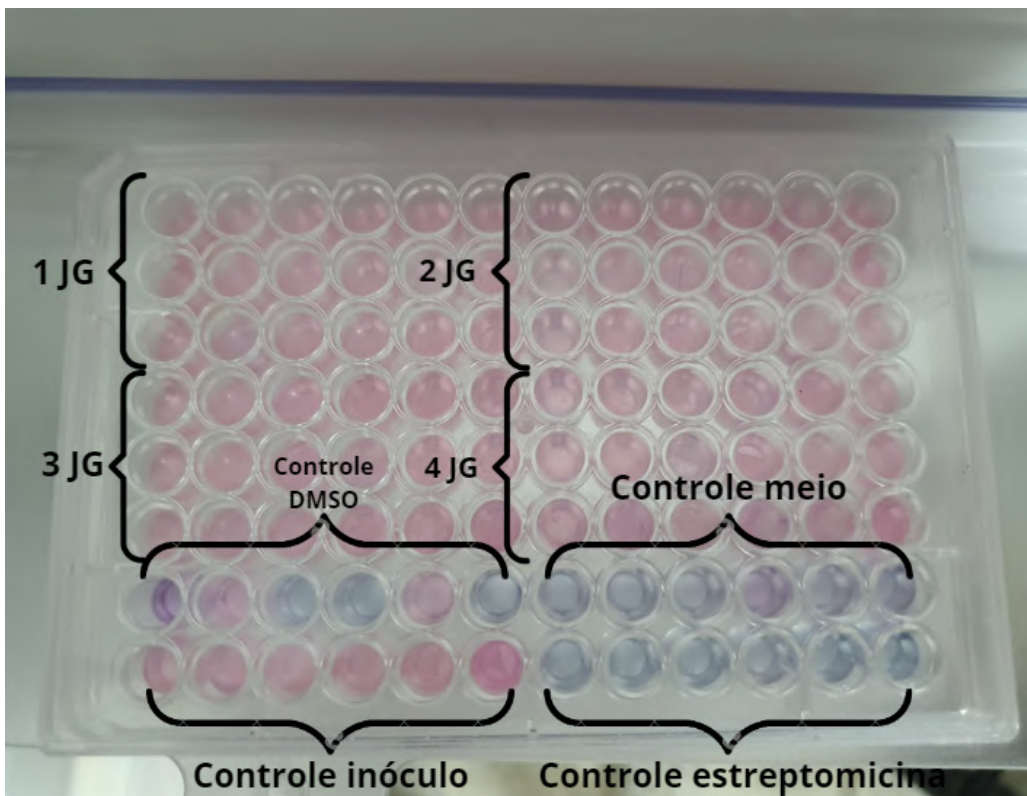
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Caldo, inoculo, extrato 5.1	Caldo, inoculo, extrato 5.2	Caldo, inoculo, extrato 5.3	Caldo, inoculo, extrato 5.4	Caldo, inoculo, extrato 5.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 6.1	Caldo, inoculo, extrato 6.2	Caldo, inoculo, extrato 6.3	Caldo, inoculo, extrato 6.4	Caldo, inoculo, extrato 6.5	Controle meio
B	Caldo, inoculo, extrato 7.1	Caldo, inoculo, extrato 7.2	Caldo, inoculo, extrato 7.3	Caldo, inoculo, extrato 7.4	Caldo, inoculo, extrato 7.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 8.1	Caldo, inoculo, extrato 8.2	Caldo, inoculo, extrato 8.3	Caldo, inoculo, extrato 8.4	Caldo, inoculo, extrato 8.5	Controle meio
C	Caldo, inoculo, extrato 7.1	Caldo, inoculo, extrato 7.2	Caldo, inoculo, extrato 7.3	Caldo, inoculo, extrato 7.4	Caldo, inoculo, extrato 7.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 8.1	Caldo, inoculo, extrato 8.2	Caldo, inoculo, extrato 8.3	Caldo, inoculo, extrato 8.4	Caldo, inoculo, extrato 8.5	Controle meio
D	Caldo, inoculo, extrato 7.1	Caldo, inoculo, extrato 7.2	Caldo, inoculo, extrato 7.3	Caldo, inoculo, extrato 7.4	Caldo, inoculo, extrato 7.5	Controle meio	Caldo, inoculo, extrato 8.1	Caldo, inoculo, extrato 8.2	Caldo, inoculo, extrato 8.3	Caldo, inoculo, extrato 8.4	Caldo, inoculo, extrato 8.5	Controle meio
E	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico					
F	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico					
G	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico	Controle antibiótico					
H	Controle meio	Controle meio	Controle meio	Controle inóculo	Controle inóculo	Controle inóculo	Controle DMSO	Controle DMSO	Controle DMSO			

8.3 Anexo 3

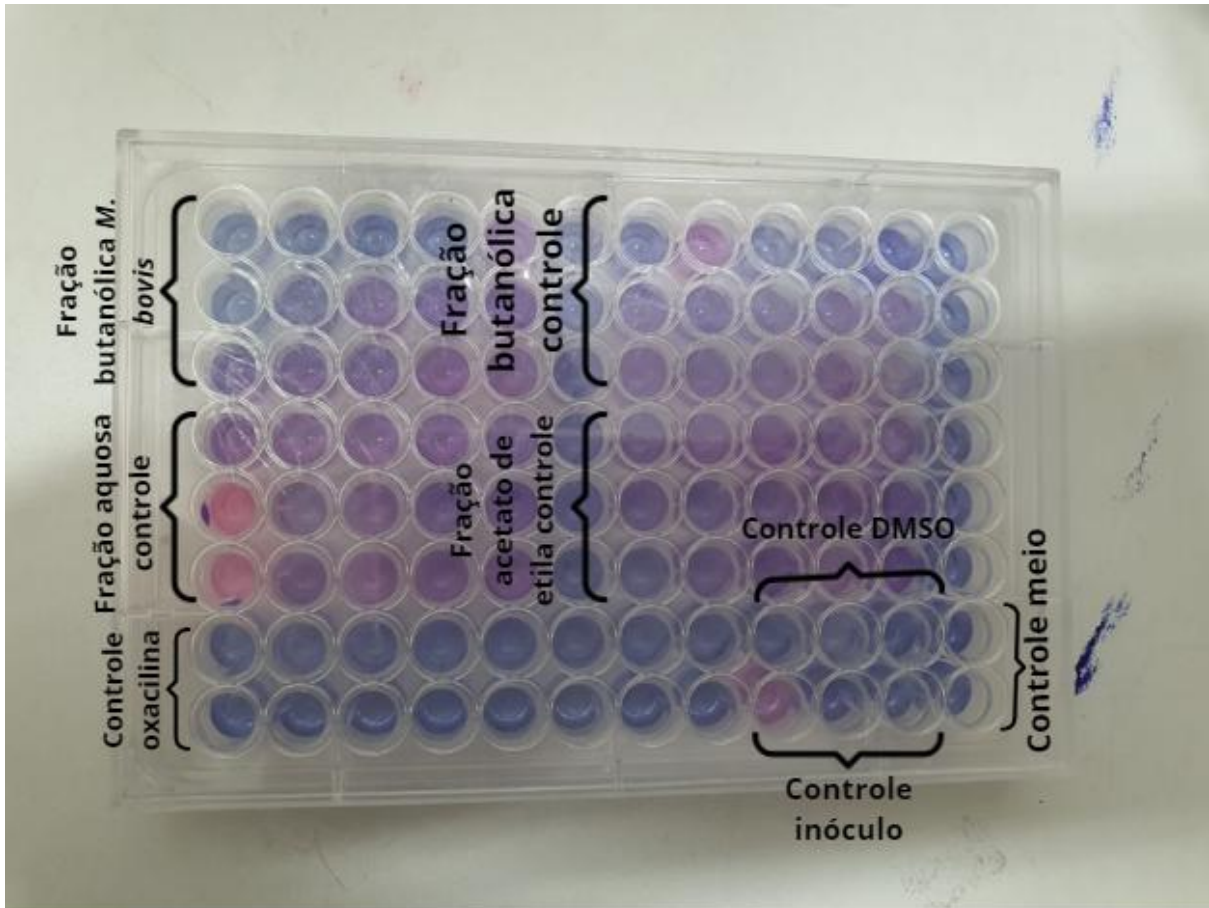
A) Ensaio de concentração mínima inibitória utilizando cepas sensíveis de *S. aureus* com os extratos brutos do fungo TB1 (*Sordaria tamaensis*) nas concentrações de 512; 256; 128; 64; 32 µg/mL



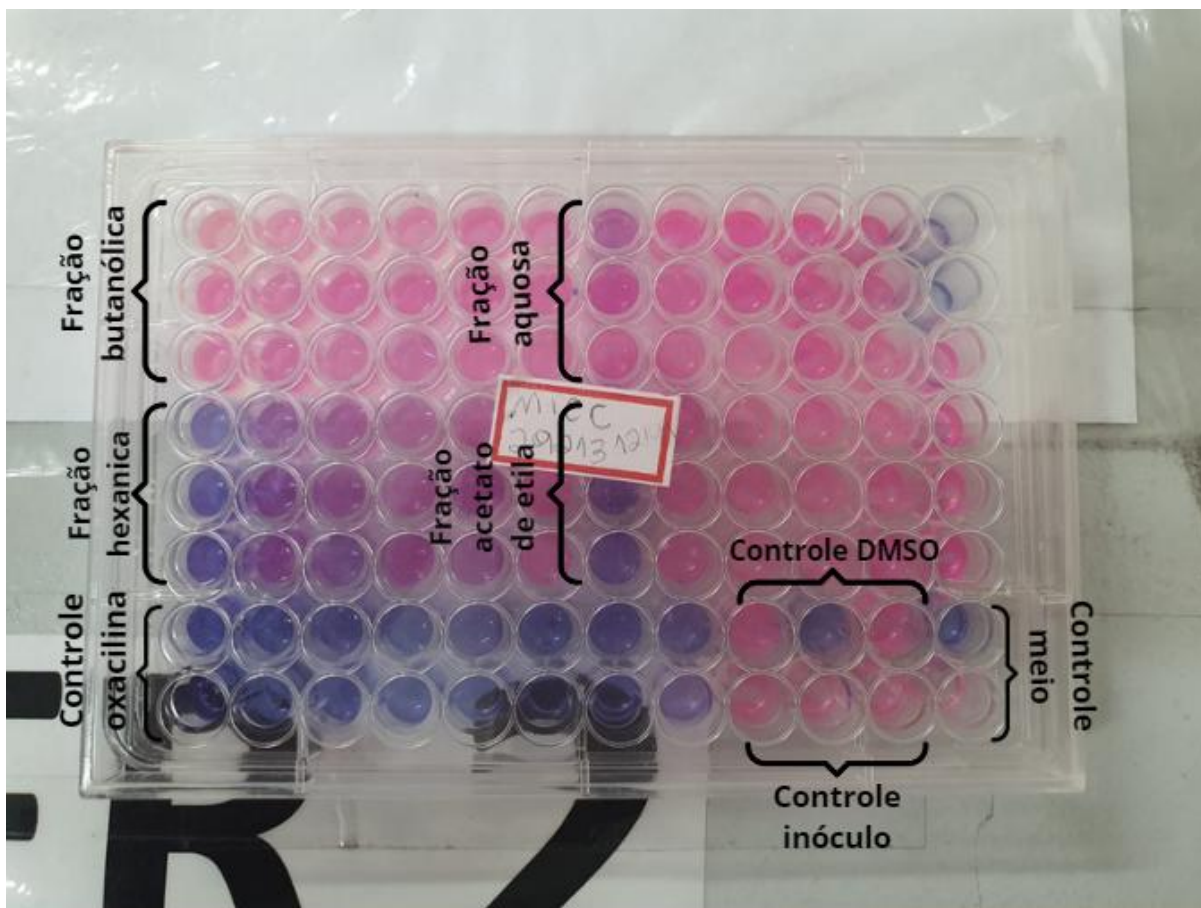
B) Ensaio de concentração mínima inibitória utilizando cepas sensíveis de *E. coli* com os extratos brutos do fungo TB1 (*Sordaria tamaensis*) nas concentrações de 512; 256; 128; 64; 32 µg/mL



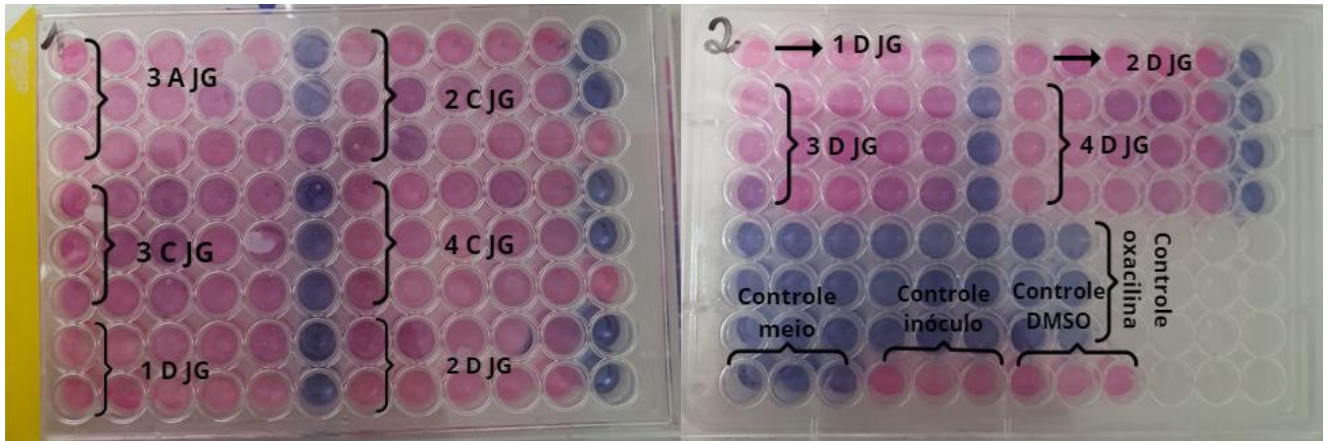
C) Ensaio de concentração mínima inibitória utilizando os extratos do grupo controle e suas frações aquosa, butanólica, acetato de etila e do grupo com *M. bovis* com a fração butanólica obtidos a partir do fungo TB1 para *S. aureus*, testando as concentrações de 512; 256; 128; 64; 32 $\mu\text{g/mL}$.



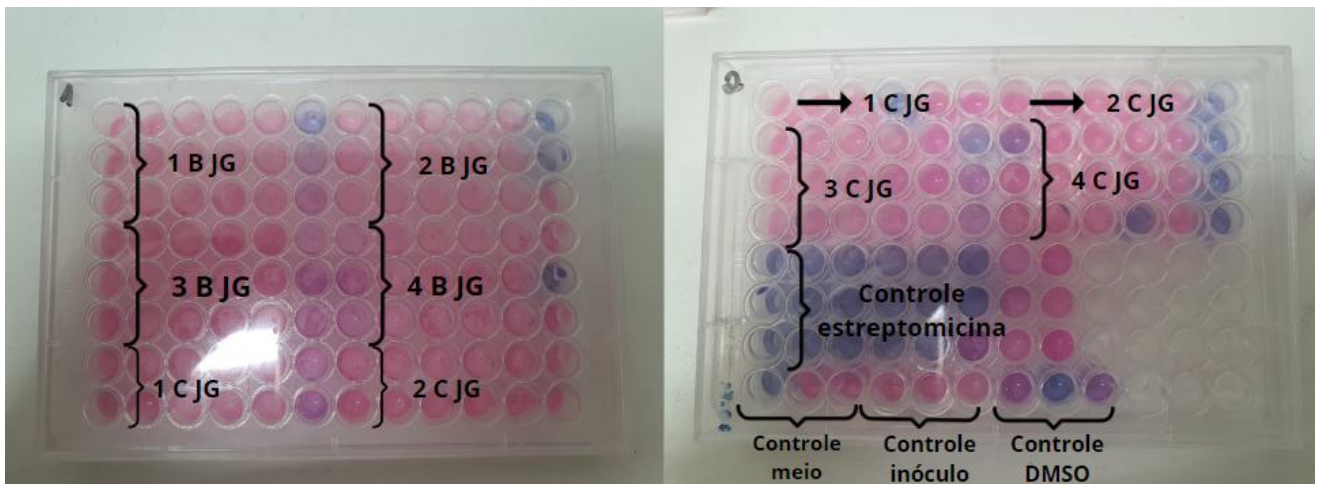
D) CIM realizado com os extratos do grupo contendo sinvastatina e suas frações butanólicas, hexanicas, fração aquosa e acetato de etila obtidos a partir do fungo TB1 para *S. aureus* testando as concentrações de 512; 256; 128; 64; 32 µg/mL.



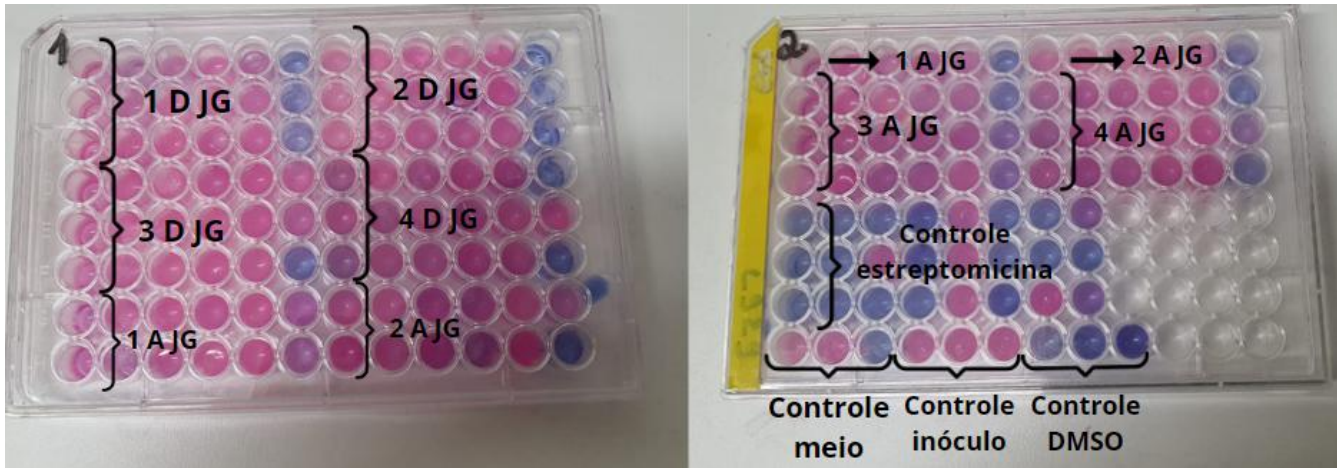
E) CIM realizado com extratos do grupo *M. bovis*, *M. marinus* e controle obtidos a partir do fungo TB1 após partição com hexano, acetato de etila, fração aquosa e butanol para *S. aureus* testando as concentrações de 512; 256; 128; 64; 32 µg/mL.



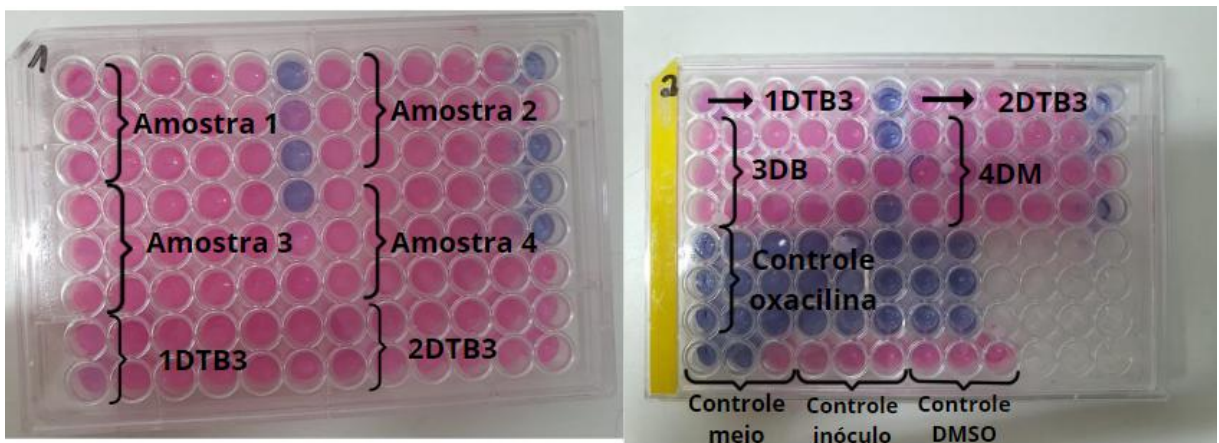
F) CIM com o grupo com *M. bovis* e sinvastatina obtidos a partir do fungo TB1 após partição com hexano, fração aquosa, acetato de etila e butanol para *E. coli* testando as concentrações de 512; 256; 128; 64; 32 $\mu\text{g/mL}$



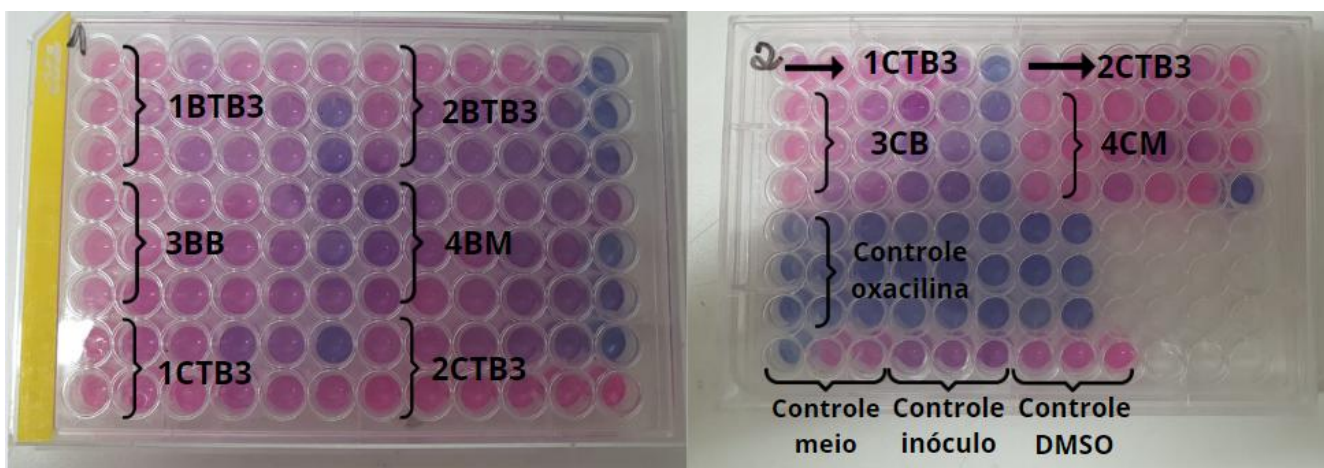
G) CIM com o grupo *M. marinus* e controle obtidos a partir do fungo TB1 após partição com hexano, butanol, fração aquosa acetato de etila para *E. coli*, testando as concentrações de 512; 256; 128; 64; 32 $\mu\text{g/mL}$



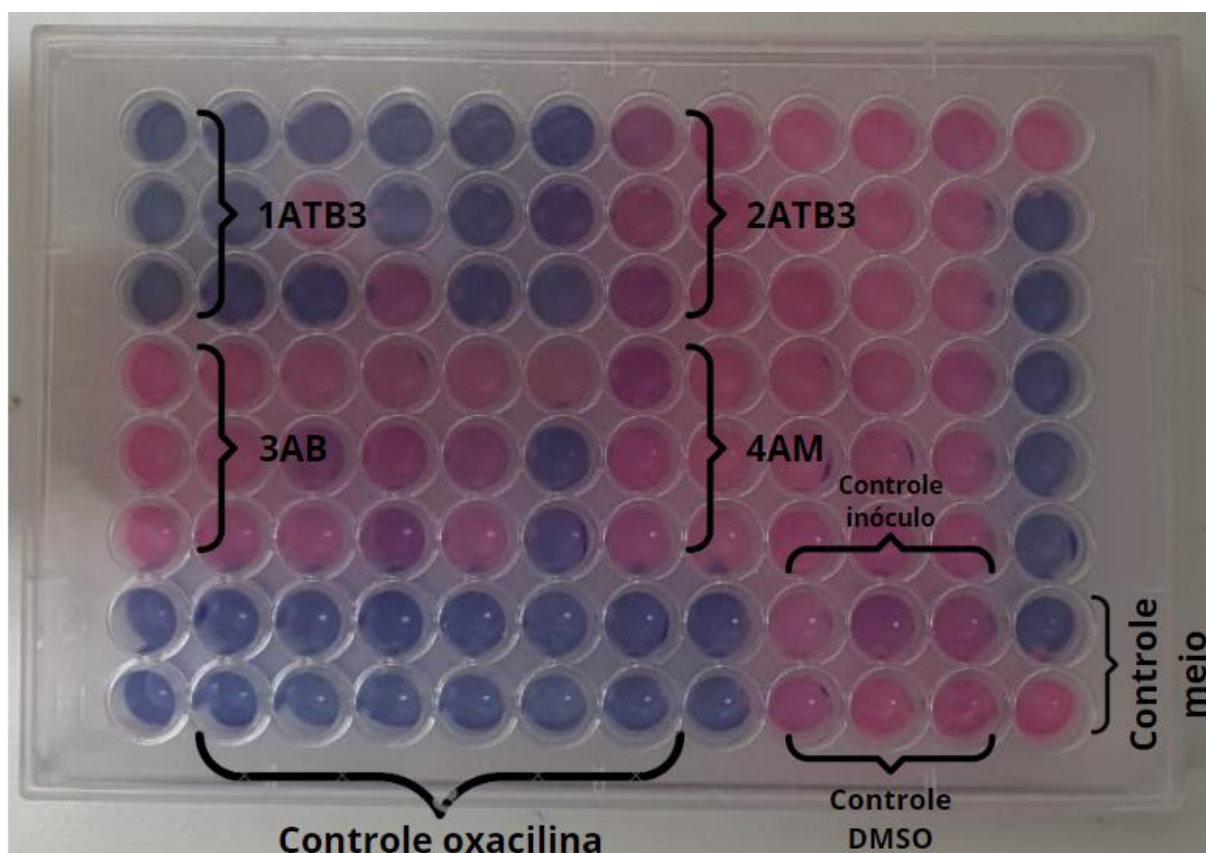
H) CIM com os extratos brutos e frações aquosas obtidas após partição com o fungo TB3 testadas para *S. aureus* nas concentrações de 512; 256; 128; 64; 32 $\mu\text{g/mL}$.



I) CIM com frações butanólicas e acetato de etila obtidas após partição a partir do fungo TB3 testadas para cepas de *S. aureus* nas concentrações de 512; 256; 128; 64; 32 $\mu\text{g/mL}$.



J) CIM com a fração hexânica obtida após partição do fungo TB3 testada para cepas de *S. aureus* nas concentrações de 512; 256; 128; 64; 32 µg/mL.



K) Repetição do ensaio com o fungo TB3 no cultivo tradicional da fração hexânica e do cultivo tradicional do fungo TB1 nas frações hexânicas e acetato para *S. aureus*.

