



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

(PPGBiotec)

DANRLEY RAMIRES DOS SANTOS DE BORBA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE
EXTRATOS DE METABÓLITOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS
DO PANTANAL CONTRA BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES

CAMPO GRANDE - MS
2023



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

(PPGBiotec)

DANRLEY RAMIRES DOS SANTOS DE BORBA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE METABÓLITOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DO PANTANAL CONTRA BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de produtos, processos e serviços.

Orientador: Prof. Dr Adilson Beatriz.

CAMPO GRANDE - MS
2023

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Professor Doutor Adilson Beatriz, pela orientação, ensinamentos e apoio recebido.

Agradeço à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela estrutura e apoios fornecidos.

Agradeço a todos aqueles que apoiaram de alguma maneira a execução da pesquisa, sejam minha família, amigos, colegas de laboratório e professores da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Resumo

A resistência bacteriana é uma séria preocupação de saúde pública em escala global, causando infecções cada vez mais desafiadoras de tratar, resultando em um alto número de óbitos e impactos econômicos significativos. Uma possível abordagem para combater essa questão é o uso de fungos endofíticos, que possuem uma riqueza de compostos bioativos, incluindo substâncias com propriedades antimicrobianas. Este estudo se concentrou em avaliar o potencial dos extratos brutos derivados de fungos endofíticos encontrados no Pantanal pertencentes a gêneros como *Fusarium* e *Acremonium* para inibir o crescimento de bactérias multirresistentes. Por meio de uma análise preliminar utilizando cromatografia em camada delgada, foram identificados compostos cumarínicos nos extratos acetato de etila de seis metabólitos fúngicos. Essa identificação foi confirmada pela emissão de fluorescência azul e visualização sob radiação ultravioleta de 365 nm. Todos os seis extratos fúngicos estudados demonstraram uma notável atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias multirresistentes, incluindo *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Staphylococcus epidermidis* MDR, *Escherichia coli* MDR e *Acinetobacter baumannii* MDR. Entre eles, um dos extratos de *Acremonium sp.*, codificado como NF14, apresentou um desempenho destacado. O extrato NF14 foi posteriormente submetido a uma coluna de sílica gel para cromatografia, resultando em frações mais puras. Estas frações foram analisadas através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas de baixa resolução. Uma das frações revelou a presença de ácidos graxos insaturados e saturados, com ênfase em ácido oleico (C18:1, 32%), ácido linoleico (C18:2, 18%), ácido palmítico (C16:0, 20,5%) e ácido esteárico (C18:0, 15%). Esses resultados sugerem o potencial deste extrato como uma fonte viável para a produção em larga escala desses compostos de interesse para a indústria. As demais frações obtidas após o processo de cromatografia exibiram somente combinações complexas de compostos orgânicos.

Palavras chave: Fungos endofíticos, atividade antimicrobiana, ácidos graxos insaturados

Abstract

Bacterial resistance is a critical global public health concern, resulting in increasingly difficult-to-treat diseases, a high number of deaths, and significant economic consequences. Endophytic fungi, which contain a multitude of bioactive chemicals, including those with antibacterial capabilities, could be used to alleviate this issue. The purpose of this investigation was to see if crude extracts obtained from endophytic fungi found in the Pantanal could prevent the growth of multidrug-resistant bacteria. Coumarinic compounds were discovered in the ethyl acetate extracts of six fungal metabolites from the genera *Fusarium* sp. and *Acremonium* sp. using thin-layer chromatography. The emission of blue fluorescence and visibility under 365 nm ultraviolet radiation validated this identification. The antibiotic activity of all six fungal extracts tested positive against strains of multidrug-resistant bacteria, including *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Staphylococcus epidermidis* MDR, *Escherichia coli* KPC, and *Acinetobacter baumannii* MDR. Among these, one of the *Acremonium* sp. extracts, encoded as NF14, performed exceptionally well. Following that, the NF14 extract was processed to silica gel column chromatography, yielding purer fractions. These fractions were examined using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy for ^1H and ^{13}C , as well as low-resolution mass spectrometry coupled with gas chromatography. Unsaturated and saturated fatty acids were found in one of the fractions, with an emphasis on oleic acid (C18:1, 32%), linoleic acid (C18:2, 18%), palmitic acid (C16:0, 20.5%), and stearic acid (C18:0, 15%). certain findings point to the extract's potential as a feasible source for large-scale synthesis of certain chemicals of industrial significance. Only complicated combinations of organic molecules were found in the residual fractions obtained following the chromatography process.

Keywords: Endophytic fungi, antimicrobial activity, unsaturated fatty acids

Lista de Figuras e lista de Tabelas.

Figuras

Figura 1: Metodologia da fermentação dos microorganismos	25
Figura 2: Metodologia de extração de metabólitos secundários.....	26
Figura 3: Metodologia da determinação dos IC's 90 e 50.....	27
Figura 4: Crescimento bacteriano da <i>Staphylococcus epidermidis</i> frente ao extrato bruto do fungo NF14.....	31
Figura 5: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC frente ao extrato bruto do fungo NF14.....	31
Figura 6: Crescimento bacteriano da <i>Escherichia coli</i> KPC frente ao extrato bruto do fungo NF14.....	32
Figura 7: Crescimento bacteriano da <i>Escherichia coli</i> frente ao extrato bruto do fungo NF14.....	33
Figura 8: Crescimento bacteriano da <i>Staphylococcus epidermidis</i> MDR frente ao extrato bruto do fungo NF14.....	33
Figura 9: Crescimento bacteriano da <i>Staphylococcus epidermidis</i> MDR frente ao extrato bruto do fungo TR812.....	34
Figura 10: Crescimento bacteriano da <i>Acinetobacter baumannii</i> MDR frente ao extrato bruto do fungo TR812.....	35
Figura 11: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC frente ao extrato bruto do fungo TR812.....	35
Figura 12: Crescimento bacteriano da <i>Staphylococcus epidermidis</i> MDR frente ao extrato bruto do fungo LF17.....	36
Figura 13: Crescimento bacteriano da <i>Escherichia coli</i> KPC frente ao extrato bruto do fungo LR411.....	36
Figura 14: Crescimento bacteriano da <i>Escherichia coli</i> frente ao extrato bruto do fungo LR411.....	37
Figura 15: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella pneumoniae</i> frente ao extrato bruto do fungo LR411.....	38
Figura 16: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC frente ao extrato bruto do fungo LR411.....	38
Figura 17: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella pneumoniae</i> frente ao extrato bruto do fungo.....	39
Figura 18: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella pneumoniae</i> frente ao extrato bruto do fungo FI992.....	40
Figura 19: Crescimento bacteriano da <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC frente ao extrato bruto do fungo FI992.....	40
Figura 20: Formação de biofilme da <i>Acinetobacter baumannii</i> (MDR) frente ao extrato bruto do fungo NF14.....	41
Figura 21: Fórmulas estruturais de algumas das substâncias antibacterianas produzidas por fungos endofíticos.....	45

Figura 22. Fracionamento do extrato acetato de etila de NF14 (8 frações). (A) Revelado em UV 256 nm. (B) Revelado em UV 365 nm.	47
Figura 23. Fracionamento do extrato acetato de etila do NF14 (8 frações). Revelados em solução metanólica de vanilina na presença de ácido sulfúrico.....	47
Figura 24. Preparação de derivados metílicos de ácidos graxo.....	48
Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) da mistura de ácidos graxos monoinsaturados e saturados, contendo principalmente ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:1) presentes no extrato de NF14)	49
Figura 26. Espectro de RMN de ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) d a mistura de ácidos graxos monoinsaturados e saturados, contendo principalmente ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:1) presentes no extrato de NF14.....	49
Figura 27. Espectro de correlação heteronuclear HSQC para a mistura de ácidos graxos monoinsaturados e saturados, contendo principalmente ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:1) presentes no extrato de NF14.....	50

Tabelas

Tabela 1: Fungos endofíticos produtores de metabólitos com atividade antibacteriana.....	13
Tabela 2: Patógenos prioritários resistente aos antimicrobianos (OMS, 2017)	19
Tabela 3: Código dos fungos endofíticos provenientes do pantanal.....	24
Tabela 4: Biomassa dos extratos brutos após a fermentação.....	29
Tabela 5: IC's 90 e 50 dos extratos brutos.....	30
Tabela 6. Fracionamento do extrato de NF14 em coluna de cromatografia de sílica gel.....	46
Tabela 7. Principais ácidos graxos presentes na Fração 1 de <i>Acremonium sp.</i> (NF14).	48

Lista de Abreviações

CDC = Centers for Disease Control and Prevention

OMS = Organização Mundial da Saúde

MDR = *Multidrug-resistant*

KPC = *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase

IC 50 = Concentração que inibe 50%

IC 90 = Concentração que inibe 90%

μL = Microlitro

mL = Mililitro

Nm = Nanômetros

MHz = Mega-hertz

Hz = Hertz

μg = Micrograma

mg = Miligrama

g = Grama

cm = Centímetros

BHI = *Brain heart infusion*

BDA = Batata dextrose agar

MHB= *Muller-Hinton Broth*

CIM = Concentração inibitória mínima

RMN= Ressonância magnética nuclear

RPM = Rotação por minuto

HSQC = Espectro de correlação heteronuclear

O.D = *Optic density*

CCDA = Cromatografia em camada delgada analítica

UFC = Unidade Formadora de colônia

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ = Micrograma por Mililitro

mg.mL^{-1} = Miligrama por Mililitro

ufc.mL^{-1} = Unidade Formadora de colônia por Mililitro

Sumário

Lista de Abreviações	8
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.2 Resistencia bacteriana	19
3. OBJETIVOS	22
3.1 Gerais	22
3.2 Específicos	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Geral	23
4.2 Microrganismos	23
4.3 Fermentação	24
4.3.1 Meio de Cultura e Cultivo	24
4.3.2 Fermentação dos microorganismos	24
4.3.3 Extração de metabólitos secundários	25
4.4 Ensaio biológico	26
4.4.1 Determinação dos IC's 90 e 50	26
4.4.2 Biofilme	27
4.4.3 Análise química dos extratos	28
5.1 Fermentação	28
5.2 Determinação da concentração inibitória de 90% e 50% (IC's 90 e IC's 50)	29
5.2.1 Bactérias planctônicas	29
5.3 Estudos de separação dos metabólitos secundários por coluna cromatográfica de sílica gel	45
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

Ao identificar o potencial antibiótico do fungo *Penicillium*, Fleming inaugurou uma revolução no tratamento de infecções, marcando a ascensão de antibióticos e suas contribuições inestimáveis para a medicina moderna. Essa descoberta não apenas transformou a abordagem das doenças infecciosas, mas também inaugurou uma nova era de tratamento médico e a bioprospecção de novas moléculas antimicrobianas a partir de microorganismos (Pereira & Pita, 2018).

Os agentes antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas que atuam inibindo o crescimento ou causando a destruição de microrganismos. São utilizados preventivamente e/ou terapeuticamente, constituindo um avanço farmacológico significativo e generalizado. (Souza et al., 2010).

Uma das maiores problemáticas atuais do sistema de saúde são as resistências bacterianas aos agentes antimicrobianos. Infecções e mortalidades causadas por bactérias resistentes são cada vez mais presentes e causam um grave problema a saúde pública. As principais espécies relacionadas á essas infecções são *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudoamonas aureginosa* e *Acinotebacter baumannii*. (Du et al., 2017; Sun et al., 2017)

Algumas das maiores organizações globais de saúde, como o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), a Sociedade de Doenças Infecciosas da América, o Fórum Econômico Mundial e a Organização Mundial da Saúde (OMS) declararam que a resistência aos antibióticos é uma problemática mundial de saúde pública (Spellberg et al., 2016).

O mecanismo de ação da resistência das bactérias aos antimicrobianos consiste principalmente em modificações na molécula de antibiótico, como a alteração química ou a destruição do antibiótico, diminuição na permeabilidade da membrana e bombas de efluxos que empurram a molécula do antibiótico para o meio extracelular (Munita & Arias, 2016).

Entre tanto, os fungos endofíticos são reconhecidos atualmente por vários pesquisadores como uma ótima alternativa na obtenção de novas substâncias bioativas de relevância medicinal. Existem numerosos relatos de fungos endofíticos que habitam uma ampla gama de espécies de plantas, esses microrganismos podem

ser isolados de tecidos vegetais, desinfetados da superfície ou extraídos do interior da planta. (Venieraki et al., 2017)

O termo endófito foi estabelecido pela primeira vez em 1896 por Bary como qualquer organismo que vive no interior de uma planta. Porém os endófitos foram definidos e entendidos como microrganismos que habitam tecidos e órgãos das plantas sem causar nenhum dano, tendo assim uma interação mutualística (Carroll, 1986; Petrini, 1991).

Eles produzem uma variedade de compostos bioativos, tais como ciclohexanos, flavonoides, hidrocarbonetos, alcaloides, terpenos e quininos, com propriedades antiinflamatórias, antioxidantes, citotóxicas e antimicrobianas (Rana et al., 2019). Também são relatados na literatura metabólitos secundários derivados de fungos endofíticos com propriedades antibacterianas, antifúngicas, inseticidas, antioxidantes, citotóxicas e anticancerígenas. (Gupta et al., 2020)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos endofíticos

Atualmente existe diversos estudos sobre sua bioprospecção e seu potencial para produzir compostos bioativos com atividade antimicrobiana. Foi comprovado compostos com atividade contra bactérias, fungos e vírus (Chen et al., 2022). E produção de enzimas com atividade antiparasitária, anticâncer e anti-inflamatória (Khan et al., 2017).

Recentemente mostraram que fungos endofíticos possuem potencial na produção de antibióticos naturais. Esses fungos demonstraram a capacidade de sintetizar compostos ativos contra problemáticas emergentes, tais como resistência bacteriana e problemas oncológicos. Isso abriu novas perspectivas para a descoberta de novos medicamentos a partir desses endofitos. (Kohler & Genre, 2020)

Os fungos do gênero *Acremonium* já vem sendo alvo de estudo como fonte de compostos bioativos. Ele é encontrado como endofítico em diversas plantas, e tem sido associado à produção de compostos que exibem potencial atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (Gao et al., 2020).

Os fungos endofíticos do gênero *Fusarium* também tem sido associado à produção de compostos bioativos com atividade antimicrobiana, e também estudos mostraram citotoxicidade significativa contra linhagens de células tumorais humanas A549 com valores de IC 50 de 8,7 e 4,3 μM , respectivamente (Chen et al., 2022).

São apresentadas na Tabela 1 algumas moléculas que possuem atividade contra bactérias resistentes. A tabela demonstra a cepa dos fungos endofíticos, a planta hospedeira da qual foram isolados, o habitat da planta hospedeira, tipo de extrato ou metabólito secundário com atividade antibacteriana, a cepa da bactéria patogênicas, o método utilizado para os testes antibacterianos e as referências utilizada (Radić & Štrukelj, 2012).

Tabela 1: Fungos endofíticos produtores de metabólitos com atividade antibacteriana

Endophytic fungal strain	Host plant(s) (family), plant part or tissue	Habitat of the host plant	Crude extract/isolated metabolite	Test bacteria	Type of test
<i>Phomopsis</i> isolate MF6031	<i>Salix gracilistyla</i> var. <i>Melanostachys</i> (Salicaceae); twig	Acquisition number 237-71-5282. Wakehurst Place, UK	• Phomopsichalasin	• <i>B. subtilis</i> • <i>Enterococcus faecium</i> • <i>P. aeruginosa</i> • <i>S. aureus</i>	Disk diffusion assay
Unidentified endophytic fungus CR115	<i>Daphnopsis americana</i> (Thymelaeaceae); branch	Guanacaste Conservation Area in Costa Rica	• Guanacastepenes A-O	• Methicillin-resistant <i>S. aureus</i> • Vancomycin-resistant <i>E. faecalis</i>	Agar diffusion method
<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Artemisia annua</i> L. (Asteraceae); stem	ns	• 6-Isoprenylindole-3-carboxylic acid • 3b,5a-Dihydroxy-6b-acetoxy-ergosta-7,22-diene • 3b,5a-Dihydroxy-6b-phenylacetyloxy-ergosta-7,22-diene • 3b-Hydroxy-ergosta-5-ene • 3-Oxo-ergosta-4,6,8(14),22-tetraene • 3b-Hydroxy-5a,8a-epidioxy-ergosta-6,22-diene	• <i>B. subtilis</i> • <i>S. aureus</i> • <i>Sarcina lutea</i> • <i>Pseudomonas</i> sp.	Paper-disk assay on LB
<i>Guignardia</i> sp.	<i>Spondias mombin</i> L. (Anacardiaceae); leaf and twig	Pará and Rio de Janeiro states, Brazil	• Ethyl acetate crude extract of culture broth	• <i>S. aureus</i> • <i>E. coli</i>	Microtiter plate assay
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	<i>Artemisia mongolica</i> (Fisch. ex Bess.) Nakai (Asteraceae); stem	Zijin Mountain, the suburb of Nanjing, China	• Colletotric acid	• <i>B. subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn • <i>S. aureus</i> Rosenbach • <i>Sarcina lutea</i> Schroeter • <i>Pseudomonas</i> sp.	Paper-disk assay on LB
13 isolates of <i>Phomopsis</i> sp.	<i>Aspidosperma tomentosum</i> MART. (Apocynaceae); leaf <i>Spondias mombin</i> L. (Anacardiaceae); twig	Rio de Janeiro city (Morro do Entorno, Pedra do Marinho) and the Brazilian Amazon forest near Redenção (Pará state)	• Ethyl acetate crude extracts of cultivation broth	• <i>E. coli</i> (ATCC 25922) • <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) • <i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	Bioautographic TLC agar-overlay assay

<i>Periconia</i> sp. OBW-15	<i>Taxus cuspidate</i> Siebold & Zucc (Taxaceae); small branch	Kangwon region, Korea	<ul style="list-style-type: none"> • Periconicin A • Periconicin B 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> (ATCC 25922) • <i>K. pneumoniae</i> (IFO 13541) • <i>P. vulgaris</i> (ATCC 3851) • <i>S. typhimurium</i> (ATCC 14028) • <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633) • <i>M. luteus</i> (IFO 12708) • <i>S. aureus</i> (ATCC 6538p) • <i>S. epidermis</i> (ATCC 12228) 	Twofold microtiter broth dilution method
<i>Rhizoctonia</i> sp. strain Cy064	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. (Poaceae); leaf	Jiangsu Province, China	<ul style="list-style-type: none"> • Rhizoctonic acid • Monomethylsulochrin • Ergosterol • 3β,5α,6β-trihydroxyergosta-7,22-diene 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>H. pylori</i> (ATCC 43504) • Five randomly selected clinical strains from antral biopsies from children and adults. 	Agar dilution method
<i>Fusarium</i> sp. IFB-121	<i>Quercus variabilis</i> Blume (Fagaceae); bark	Southern hillside of the Zijin Mountain in the eastern suburb of Nanjing, China	<ul style="list-style-type: none"> • Cerebroside 1 • Cerebroside 2 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. subtilis</i> • <i>E. coli</i> 	Liquid dilution method
<i>Phomopsis</i> sp. strain E02018	<i>Erythrina crista-galli</i> L. (Fabaceae); twig	Boraso Stream-Delta del Parana, Argentina	<ul style="list-style-type: none"> • Phomol 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Arthrobacter citreus</i> • <i>Corynebacterium insidiosum</i> • <i>Pseudomonas fluorescens</i> • <i>E. coli</i> • <i>B. subtilis</i> 	Serial dilution assay
<i>Aspergillus</i> sp. strain CY725	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers. (Poaceae); leaf	Sheyang Port on the Yellow Sea	<ul style="list-style-type: none"> • Helvolic acid • Monomethylsulochrin • Ergosterol • 3β-Hydroxy-5α,8α-epidioxy-ergosta-6,22-diene 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>H. pylori</i> (ATCC 43504) • Five clinical isolates obtained from antral biopsies of child and adult patients, • <i>B. subtilis</i>, • <i>P. fluorescens</i>, • <i>E. coli</i>, • <i>S. lutea</i> • <i>S. aureus</i> 	Disk diffusion method
<i>Ampelomyces</i> sp.	<i>Urospermum picroides</i> (L.) F.W. Schmidt (Asteraceae); flower	Alexandria, Egypt	<ul style="list-style-type: none"> • 3-O-methylalaternin • Altersolanol A 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. epidermidis</i> • <i>S. aureus</i> • <i>E. faecalis</i> 	Serial dilution assay

<i>Phoma</i> sp. NG-25	<i>Saurauia scaberrinae</i> (Actinidiaceae); stem	Central highlands of Papua New Guinea	<ul style="list-style-type: none"> • Phomodione • Usnic acid • Cercosporamide 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) • <i>E. coli</i> (Life Technology 18290–015) 	Disk diffusion assay
<i>Thielavia subthermophila</i> INFU/HP/KF/348	<i>Hypericum perforatum</i> L. (Hypericaceae); stem	Harwan, Jammu and Kashmir, India	<ul style="list-style-type: none"> • Hypericin • Emodin 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> ssp. <i>aureus</i> (DSM 799) • <i>K. pneumoniae</i> ssp. <i>ozaenae</i> (DSM 681) • <i>P. aeruginosa</i> (DSM 1128) • <i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> (DSM 9898) • <i>E. coli</i> (DSM 682) 	Disk diffusion method
<i>Xylaria</i> sp. YX-28	<i>Ginkgo biloba</i> L. (Ginkgoaceae); twig	Jiangsu and Shandong Provinces, China	<ul style="list-style-type: none"> • 7-Amino-4-methylcoumarin 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> • <i>E. coli</i> • <i>S. typhi</i> • <i>S. typhimurium</i> • <i>S. enteritidis</i> • <i>Aeromonas hydrophila</i> • <i>Yersinia</i> sp. • <i>V. anguillarum</i> • <i>Shigella</i> sp. • <i>V. parahaemolyticus</i> 	Twofold serial dilutions method
<i>Pichia guilliermondii</i> Ppf9	<i>Paris polyphylla</i> var. <i>yunnanensis</i> (Franch) Hand.-Mazz. (Trilliaceae); rhizome	Kunming, China	<ul style="list-style-type: none"> • Helvolic acid 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> (ATCC 29425), • <i>B. subtilis</i> (ATCC 11562), • <i>S. aureus</i> (ATCC 6538) • <i>S. haemolyticus</i> (ATCC 29970) 	A modified micro-dilution-colorimetric assay, using the chromogenic MTT reagent
15 endophytic fungi with antibacterial activity	<i>Dracoena cambodiana</i> (Asparagaceae); leaf, root and stem <i>Aquilaria sinensis</i> (Lour.) Spreng. (Thymelaeaceae); leaf, root and stem	Jinghong city, Xishuangbanna prefecture, Yunnan, China	<ul style="list-style-type: none"> • Crude extract 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. subtilis</i> As 1.308 • <i>E. coli</i> As 1.355 • <i>S. aureus</i> As 1.72. 	Agar diffusion test
24 endophytic fungi (with moderate antibacterial activity)	43 plant samples; leaf, stem, root, rhizome, flower, fruit and bark	Two locations in the National Park, Pahang, Malaysia	<ul style="list-style-type: none"> • Crude ethyl acetate extract from mycelium and culture agar combined 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633) • <i>M. luteus</i> (ATCC 10240) • <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) • <i>E. coli</i> (ATCC 25922) • <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) 	Disc diffusion method
Unidentified Ascomycete endophytic fungus strain 6650	<i>Melilotus dentatus</i> (Waldst. & Kit.) Pers. (Fabaceae); ns	Coastal area of the Baltic Sea, Ahrenshoop, Germany	<ul style="list-style-type: none"> • 4-Hydroxyphthalide; • 5-methoxy-7-hydroxyphthalide • (3R,4R)-cis-4-hydroxymellein 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> 	Disc diffusion method

<i>Chloridium</i> sp. (J.F.H. Beyma) W. Gams & Holubova-Jchova	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss. (Meliaceae); root	Varanasi district, India	<ul style="list-style-type: none"> • Javanicin 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> • <i>Bacillus</i> sp. • <i>P. aeruginosa</i> • <i>P. fluorescens</i> 	Microdilution method in a 96-well microplate
<i>Alternaria</i> sp. strain JCM9.2	<i>Sonneratia alba</i> J.E. Smith (Sonneratiaceae); leaf	Dong Zhai Gang Mangrove Garden on Hainan Island, China	<ul style="list-style-type: none"> • Xanalteric acid I • Xanalteric acid II • Altenusin 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> • <i>E. faecium</i> • <i>Enterococcus cloacae</i> • <i>S. aureus</i> • <i>S. pneumonia</i> • <i>P. aeruginosa</i> • <i>K. pneumonia</i> 	Dilution assay
<i>Microdiplodia</i> sp. strain 7092	<i>Erica arborea</i> L. (Ericaceae); ns	Gomera, Spain	<ul style="list-style-type: none"> • 3,4-Dihydroglobosuxanthone A 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> 	Agar diffusion assay
<i>Microsphaeropsis</i> sp. strain 8875	<i>Lycium intricatum</i> Boiss. (Solanaceae); ns	Playa del Ingles, Gomera, Spain	<ul style="list-style-type: none"> • Microsphaeropsone A • Microsphaeropsone C • Citreorosein • Enone (oxidized microsphaeropsone A) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> 	Agar diffusion assay
<i>Microsphaeropsis</i> sp. strain 7177	<i>Zygophyllum fortanesei</i> (Zygophyllaceae); ns	Gomera, Spain	<ul style="list-style-type: none"> • Fusidienol A • 8-Hydroxy-6-methyl-9-oxo-9H-xanthene-1-carboxylic acid methyl ester 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> 	Agar diffusion assay
Twenty-nine unidentified endophytic fungal strains	<i>Eucommia ulmoides</i> Oliver (Eucommiaceae); stem	Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, China	<ul style="list-style-type: none"> • Crude ethanol extract of fermentation broth • Chlorogenic acid 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i>, • <i>S. aureus</i> • <i>B. subtilis</i> • <i>P. aeruginosa</i> • <i>Salmonella lignieres</i> 	Agar diffusion test
<i>F. solani</i> 2, <i>Bionectria</i> sp 2, 15 other strains	<i>Dendrobium loddigesii</i> Rolfe (Orchidaceae); root, stem, and leaf	Nature Reserve of Pogang, Xingyi, Guizhou Province, China	<ul style="list-style-type: none"> • Ethyl acetate extract of the culture filtrate 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> (As1.355) • <i>S. aureus</i> (As 1.72) • <i>B. subtilis</i> (As 1.308) 	Paper-disc diffusion method
<i>Trichoderma ovalisporum</i> PRE-5	<i>Panax notoginseng</i> (Burkill) F.H. Chen ex C.Y. Wu & K.M. Feng (Araliaceae); root	Yunnan Province, China	<ul style="list-style-type: none"> • Koninginin A • (E)-2,3-dihydroxypropyl octadec-9-enoate • Shikimic acid • Cytosine ribonucleoside A compound considered to be adenine ribonucleoside 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> • <i>B. cereus</i> • <i>M. luteus</i> • <i>E. coli</i> 	Paper-disc diffusion method
<i>Xylaria</i> sp. NCY2	<i>Torreya jackii</i> Chun (Taxaceae)	Jiangshi Nature Reserve Zone of Fujian Province, China	<ul style="list-style-type: none"> • 1-(Xylarenone A) xylariate A, • Xylarioic acid B, • Xylariolide A, • Xylariolide B, • Xylariolide C, • Methyl xylariate C, • Xylariolide D • Taiwapyrone 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> ATCC 25922, • <i>B. subtilis</i> ATCC 9372 • <i>S. aureus</i> ATCC 25923 	Microdilution method in a 96-well microplate

<i>Aspergillus</i> sp. strain HAB10R12	<i>Garcinia scorteichinii</i> (Clusiaceae); root	Kuala Pilah Rain Forest, Negeri Sembilan, Malaysia	<ul style="list-style-type: none"> • Crude ethyl acetate extract of the culture broth 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633) • <i>E. coli</i> (ATCC 25922) • <i>M. luteus</i> (ATCC 10240) • <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) • <i>S. aureus</i> (ATCC 6538) 	Disc diffusion method
<i>Fusarium equiseti</i> , <i>Guignardia vaccinii</i>	<i>Garcinia mangostana</i> L. (Clusiaceae); leaf, stem, root, fruit, and flower <i>Garcinia parvifolia</i> (Miq.) Miq. (Clusiaceae); leaf, stem, root, fruit, and flower	Sungai Rengit Village, Johor, Malaysia	<ul style="list-style-type: none"> • Filtered broth suspension 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>B. subtilis</i> • <i>Aeromonas hydrophila</i> • <i>S. faecalis</i> 	Well diffusion assay
<i>Guignardia</i> sp. IFB-E028	<i>Hopea hainanensis</i> Merrill & Chun (Dipterocarpaceae)	Hainan Island, China	<ul style="list-style-type: none"> • Monomethylsulochrin • Rhizoctonic acid • Guignasulfide 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>H. pylori</i> 	Agar dilution method
<i>Fusarium</i> sp., <i>Phoma</i> sp., <i>Epicoccum nigrum</i> .	<i>Dendrobium devonianum</i> Paxton (Orchidaceae); stem and root <i>Dendrobium thyrsiflorum</i> (Orchidaceae); stem and root	Longling, Vietnam	<ul style="list-style-type: none"> • Crude ethanol extract of fermentation broth 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> • <i>B. subtilis</i> • <i>S. aureus</i> 	Agar diffusion method
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Vitex negundo</i> L. (Lamiaceae); leaf	Botanical Garden, Virudhunagar, Tamil Nadu, India	<ul style="list-style-type: none"> • Hexane crude extract • Ethyl acetate crude extract • Methanol crude extract 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> (MTCC 3160) • <i>B. subtilis</i> (MTCC 619) • <i>E. coli</i> (MTCC 4296) • <i>P. aeruginosa</i> (MTCC 2488) • 10 clinical strains of <i>S. aureus</i> obtained from Bose Clinical Laboratory and X-ray (India) 	Kirby-Bauer disk diffusion test; Paper disk diffusion method; Broth microdilution method in a 96-well microplate
<i>Acremonium</i> sp., <i>Diaporthe</i> sp., <i>Hypoxylon</i> sp., <i>Pestalotiopsis</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Xylaria</i> sp., and other	<i>Aegiceras corniculatum</i> , <i>Avicennia alba</i> , <i>Avicennia officinalis</i> , <i>Bruguiera gymnorrhiza</i> , <i>Bruguiera parviflora</i> , <i>Lumnitzera littorea</i> , <i>Rhizophora apiculata</i> , <i>Rhizophora mucronata</i> , <i>Sonneratia caseolaris</i> Scyphiphora hydrophyllacea, <i>Xylocarpus granatum</i> and <i>Xylocarpus moluccensis</i> ; leaves and branches	Mangrove areas in the south of Thailand in Satun, Songkhla, Surat Thani and Trang Provinces	<ul style="list-style-type: none"> • Ethyl acetate crude extract of culture medium • Ethyl acetate and hexane extract of fungal mycelium 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> ATCC25923 • A clinical isolate of MRSA SK1, • <i>E. coli</i> ATCC25922 • <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 	microdilution method according to a modification of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M7-A4

49 endophytic fungi The most active of the isolated strains: <i>Fusarium oxysporum</i> strain YNDC05 <i>Fusarium oxysporum</i> strain YNDC11 <i>Dictyosporium heptasporum</i> strain YNDC07	<i>Dracaena cochinchinensis</i> (Lour.) S.C. Chen (Asparagaceae); ns <i>Dracaena cambodiana Pierre ex Gagnep</i> (Asparagaceae); ns	Yunnan Province, Hainan Province and Beijing, China	<ul style="list-style-type: none"> • Ethanol extract of culture broth 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. subtilis</i> (No. 1.0088) • <i>S. aureus</i> (No. 1.0089) • <i>E. coli</i> (No. 1.2385) 	Agar well diffusion method
14 species, mainly: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Guignardia bidwellii</i> , <i>Phomopsis archeri</i> and <i>Drechslera dematioidea</i>	<i>Lippia sidoides</i> Cham. (Verbenaceae); Leaves and stems	Experimental Station of the Agropecuary Research Company of Pernambuco in Carpina-PE, Brazil	<ul style="list-style-type: none"> • Fungal mycelium 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> (ATCC-6538), • <i>B. subtilis</i> (UFPEDA-16), • <i>E. coli</i> (ATCC-25922). 	Antimicrobial assay using a solid medium (Ichikawa et al. 1971)
<i>Phomopsis</i> sp. (internal strain no. 8966)	<i>Notobasis syriaca</i> (Asteraceae)	ns	<ul style="list-style-type: none"> • Phomosine K • Phomosine A • Phenylalanine amide • 2-Hydroxymethyl-4β,5α,6β-trihydroxycyclohex-2-en • (-)-Phyllostine • (+)-Epiepoxydon • (+)-Epoxydon monoacetate 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> • <i>B. megaterium</i> 	Agar diffusion assays; Microdilution method in a 96-well microplate
24 endophytic fungi; <i>Microdiplodia hawaiiensis</i> CZ315 (most active isolated strain RGM-02)	<i>Garcinia mangostana</i> L. (Clusiaceae); leaf and small branch	Bogor Botanical Gardens, Indonesia	<ul style="list-style-type: none"> • Crude ethyl acetate extracts 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) • <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633) • <i>E. coli</i> (ATCC 25922) • <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853) • <i>S. typhi</i> (ATCC 14028) • <i>M. luteus</i> (ATCC 10240) 	Disc diffusion method; twofold micro titer broth dilution method
<i>Phomopsis</i> sp.	<i>Cistus salvifolius</i> (internal strain 7852) (Cistaceae)	ns	<ul style="list-style-type: none"> • Pyrenocines J-M 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i>, • <i>B. megaterium</i> 	Agar diffusion method

2.2 Resistencia bacteriana

Em 2017, a OMS publicou a sua primeira lista das superbactérias consideradas mais letais e que ameaçam a saúde humana, no qual a seção “crítica” se refere a bactérias como *Acinetobacter baumannii* KPC e Enterobacterales resistente aos carbapenêmicos que inclui *Klebsiella pneumoniae* KPC e *Escherichia coli* KPC (OMS, 2017) conforme a tabela 2.

Tabela 2: Patógenos prioritários resistente aos antimicrobianos (OMS, 2017)

<p>PRIORIDADE 1 CRÍTICA:</p> <p><i>Acinetobacter baumannii</i>, resistente a carbapenema <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, resistente a carbapenema <i>Enterobacteriaceae</i>, resistente a carbapenema, produtoras de ESBL</p>
<p>PRIORIDADE 2 ALTA:</p> <p><i>Enterococcus faecium</i>, resistente à vancomicina <i>Staphylococcus aureus</i>, resistente à meticilina, com sensibilidade intermediária e resistência à vancomicina <i>Helicobacter pylori</i>, resistente à claritromicina <i>Campylobacter spp.</i>, resistente às fluoroquinolonas <i>Salmonellae</i>, resistentes às fluoroquinolonas <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, resistente a cefalosporina, resistente às fluoroquinolonas</p>
<p>PRIORIDADE 3 MÉDIA:</p> <p><i>Streptococcus pneumoniae</i>, sem sensibilidade à penicilina <i>Haemophilus influenzae</i>, resistente à ampicilina <i>Shigella spp.</i>, resistente às fluoroquinolonas</p>

O perfil de resistência demonstrado por uma espécie bacteriana específica tem origem em categorias interpretativas que incluem a multirresistência (MDR), resistência extrema (XDR) e pan-resistência (PDR). A multirresistência (MDR) é caracterizada quando uma espécie bacteriana apresenta resistência a antibióticos de três ou mais classes diferentes. Por outro lado, a resistência extrema (XDR) é observada quando uma espécie bacteriana ainda mostra sensibilidade a antibióticos de, no máximo, duas classes. Por fim, a pan-resistência (PDR) é definida quando uma espécie bacteriana desenvolve resistência a todos os antibióticos disponíveis,

independentemente de suas classes(*Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde*", 2020).

A resistência aos antibióticos é reconhecida como uma das mais graves ameaças globais à saúde humana no século XXI. Em 2019, os pesquisadores descobriram que 1,27 milhão de pessoas morreram diretamente por causa da resistência bacteriana, de acordo com análises de casos relacionados a antibióticos e resistência em 204 países e regiões em todo o mundo, e outros 4,95 milhões de pessoas morreram por causas associadas à resistência aos antibióticos (Roope et al., 2019).

As gerações de antibióticos são uma forma de classificar os diferentes tipos de antibióticos com base em sua estrutura química e espectro de atividade. Os antibióticos de primeira geração são geralmente mais antigos e têm um espectro de atividade mais estreito, enquanto os antibióticos de gerações posteriores são mais recentes e têm um espectro de atividade mais amplo. Por exemplo, as cefalosporinas de primeira geração são eficazes contra bactérias Gram-positivas, enquanto as cefalosporinas de terceira e quarta geração têm um espectro de atividade mais amplo e são eficazes contra bactérias Gram-negativas resistentes a antibióticos de gerações anteriores (*Global antimicrobial resistance _WHO*, 2022).

A pandemia exerceu uma sobrecarga significativa sobre os sistemas de saúde, resultando na alocação de recursos, equipes e foco predominantemente para o diagnóstico e tratamento da COVID-19, em detrimento das atividades relacionadas à identificação e administração da resistência antimicrobiana. Essa situação provocou problemas substanciais na condução de pesquisas sobre a resistência antimicrobiana e levou à redução de prioridade e, em alguns casos, à interrupção dos programas de monitoramento e gestão de antimicrobianos (Rodríguez-Baño et al., 2021).

O uso excessivo e inadequado de antibióticos é um fator chave na evolução da resistência bacteriana e é fundamental reduzir seu uso para controlar essa tendência. A prescrição de antibióticos, o uso de doses inadequadas e a interrupção prematura do tratamento são a principal causa para a seleção de bactérias resistentes. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos em animais de produção também desempenha um papel importante na disseminação da resistência bacteriana (Liu et al., 2020).

O aumento de bactérias Gram-negativas que desenvolvem resistência às carbapenemases é considerado uma questão de saúde pública de grande urgência, especificamente a *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) pois

está ligada a um aumento significativo na mortalidade por resistência bacteriana. Além de apresentar resistência, a antibióticos habituais, como polimixinas, tigeciclina e aminoglicosídeos (Karaiskos et al., 2022).

A bactéria gram negativa *Klebsiella pneumoniae* é a principal causa de infecções nosocomiais (Nordmann & Poirel, 2014). É relatado que ela é responsável por 18% a 31% de todas as infecções nosocomiais do mundo e por 3% a 17% das infecções adquiridas na comunidade. Em vários estudos, a mortalidade por *K. pneumoniae* é relatada entre 30% a 54% em unidades de terapia intensiva (Stefaniuk et al., 2016).

A colibacilose é uma doença causada pela bactéria *Escherichia coli*, ocasionando numerosos prejuízos no âmbito econômico para os frigoríficos devido a condenação de carcaça e também mortalidade e perda de desempenho das aves. (Santos & Maristela, 2018)

Cerca de 80% das Infecções urinárias são causadas pela bactéria *E. Coli* (Marks et al., 2020). Em uma amostra de 679 uroculturas positivas constatou-se que a *E. coli* foi o microrganismo prevalente (58,9%) a infecção foi predominante em pessoas entre 13 e 59 anos, com prevalência no sexo feminino (Masson et al., 2020).

Acinetobacter baumannii foi documentado como causa significativa de Infecções de corrente sanguínea adquiridas em hospitais em pacientes com neoplasias hematológicas (Shargian-Alon et al., 2019). Foi demonstrado em um estudo que entre as infecções por microorganismos multirresistentes associados a mortalidade de pacientes criticamente enfermos, *Acinetobacter baumannii* está entre as bactérias mais prevalentes (Gandra et al., 2019).

Um estudo apontou que a superabundância de *S. epidermidis* encontrada em alguns pacientes atópicos pode danificar e causar graves problemas a pele através da expressão de uma cisteína protease, sendo assim um grande problema pra saúde pública (Cau et al., 2021).

Durante a última década, o *Staphylococcus epidermidis* tornou-se um dos maiores desafios em todo o mundo, não apenas por sua notável capacidade de disseminação dentro e entre hospitais e sistemas de saúde, mas porque essas infecções causam alta mortalidade e a resistência a quase todos os medicamentos usados atualmente antibióticos, incluindo vancomicina. É fundamental buscar maneiras de controlar sua disseminação (Cong et al., 2020)

As bactérias têm a capacidade de formar biofilmes como um mecanismo intrínseco de sobrevivência, o que resulta na disseminação ubíqua dessas estruturas na natureza. Atualmente, essa ocorrência tem implicações significativas tanto do ponto de vista econômico quanto da saúde pública, uma vez que há um corpo crescente de evidências que sugerem que os biofilmes desempenham um papel substancial na patogênese de diversas infecções (Høiby, 2017).

Há uma ampla variedade de doenças atribuídas ou relacionadas a infecções por biofilmes, e alguns exemplos comuns incluem vaginite (Machado et al., 2016), colite (von Rosenvinge et al., 2013), conjuntivite (Behlau e Gilmore, 2008), gengivite (Vieira Colombo et al., 2016), uretrite (Delcaru et al., 2016), otite (como indicado em Post, 2001) entre outras.

Nos Estados Unidos, anualmente, ocorrem mais de 14 milhões de infecções associadas a biofilmes, resultando em um número que excede 350.000 óbitos, uma taxa de mortalidade semelhante à do câncer (Cowan, 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Tendo isso em vista esse contexto, o objetivo geral do presente trabalho é avaliar o potencial dos metabólitos secundários dos fungos endófitos isolados da planta *Aspilia grazielae* Santos em inibir o crescimento de bactérias multiresistentes e formadora de biofilme.

3.2 Específicos

- Cultivar os fungos endófitos isolados da planta *Aspilia grazielae* em meios sólido e fermentá-los em meio líquido.
- Isolar e recuperar os metabólitos secundários presentes nesses fungos endófitos.
- Determinar o IC 90 e IC 50 dos extratos brutos recuperados.
- Purificar o extrato mais bioativo em cromatografia de coluna em sílica.
- Caracterizar as frações em uma Cromatografia de camada delgada.
- Identificar os compostos por RMN 500 MHz (Ressonância magnética nuclear) e Espectrometria de Massas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Geral

Os solventes utilizados foram da marca Merck, Acros, Vetec, Dinâmica, Simth foram tratados conforme descrito na literatura [PERRIN & AMAREGO, 1988].

Para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio – Sílica Gel 60 F₂₅₄ da Merck e Macherey-Nagel.

As revelações cromatográficas foram feitas com os reveladores: Câmara de UV (254 nm e 365 nm) Vapor de iodo e/ou solução de vanilina/ ácido sulfúrico/ metanol.

Para o fracionamento em coluna foi utilizada, como fase estacionária, sílica gel 60 (230-400 mesh ASTM) da Merck e sílica gel 60 (70-230 mesh ASTM) da Acros.

Os solventes foram evaporados à pressão reduzida em rotaevaporador Fisaton 802D.

Os espectros de RMN foram realizados no aparelho Bruker Avance DPX-300 e Bruker e Bruker Avance Neo 500. A referência interna foi ajustada a partir do sinal de TMS e dos sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente (CDCl₃).

Cultivo, inoculação e coleta das amostras fermentadas foram feitas em câmara de fluxo laminar da Labconco, previamente esterilizada com álcool 70% e incidência de luz UV. Para esterilização dos materiais e meios de cultura foi utilizado a autoclave da marca Phoenix modelo AV 50.

As fermentações foram realizadas em incubadora refrigerada com agitação, marca Marconi, modelo MA 830/A e incubadora orbital da Tecnal modelo Incubadora Te-420.

4.2 Microrganismos

Os fungos endofíticos filamentosos dos gêneros *Fusarium* e *Acremonium* são provenientes da coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. Os fungos endofíticos foram derivados de uma pesquisa de isolamento de fungos endofíticos da espécie *Aspilia grazielae santos*, que é endêmica das Morrarias do Urucum, Corumbá, MS. As coletas foram realizadas nos meses de outubro de 2015 e março de 2016 (Weirich, 2020)

4.3 Fermentação

4.3.1 Meio de Cultura e Cultivo

Os fungos endofíticos selecionados para a fermentação foram três espécies de *Acremonium spp* e três espécies de *Fusarium spp*. Eles foram denominados de acordo com a região e o ambiente da planta (Weirich, 2020).

Cada amostra recebeu um código, onde:

L/I = Ambiente Natural

T/N = Ambiente de reflorestação

R = Isolados da Raiz

F = Isolados da Folha

Sendo as amostras denominadas conforme a Tabela 3.

Tabela 3: Código dos fungos endofíticos provenientes do pantanal.

<i>Fusarium spp</i>	<i>Acremonium spp</i>
LR4-11	NF-14
LR3-10	TR8-12
FI9-92	LF-17

4.3.2 Fermentação dos microorganismos

O meio de cultura BHI (*Brain heart infusion*) foi utilizado para a fermentação, com 1% de Ciprofloxacina como antibiótico. Foi adicionado 350 mL de meio em enlemayers de fermentação de 500 mL. Foram utilizados um enlemayer para cada réplica biológica. Foram fermentadas três réplicas biológicas para cada fungo totalizando 1,05 litros de fermentação final por espécie.

Os fungos selecionados foram inoculados no meio BHI durante 10 dias em placas de Petri para o crescimento em meio sólido. A partir desse meio sólido com o fungo já desenvolvido foi retirado um bloco do Agar do meio de 1cm x 1cm com auxílio de uma haste esterilizada, e esse bloco foi inoculado em cada frasco de de BHI (*Brain heart infusion*). Os frascos de fermentação foram colocados em uma câmara rotativa a 29 °C e 140 RPM por 15 dias, permitindo o crescimento e a fermentação dos fungos (Figura 1).

Figura 1 : Metodologia da fermentação dos microorganismos

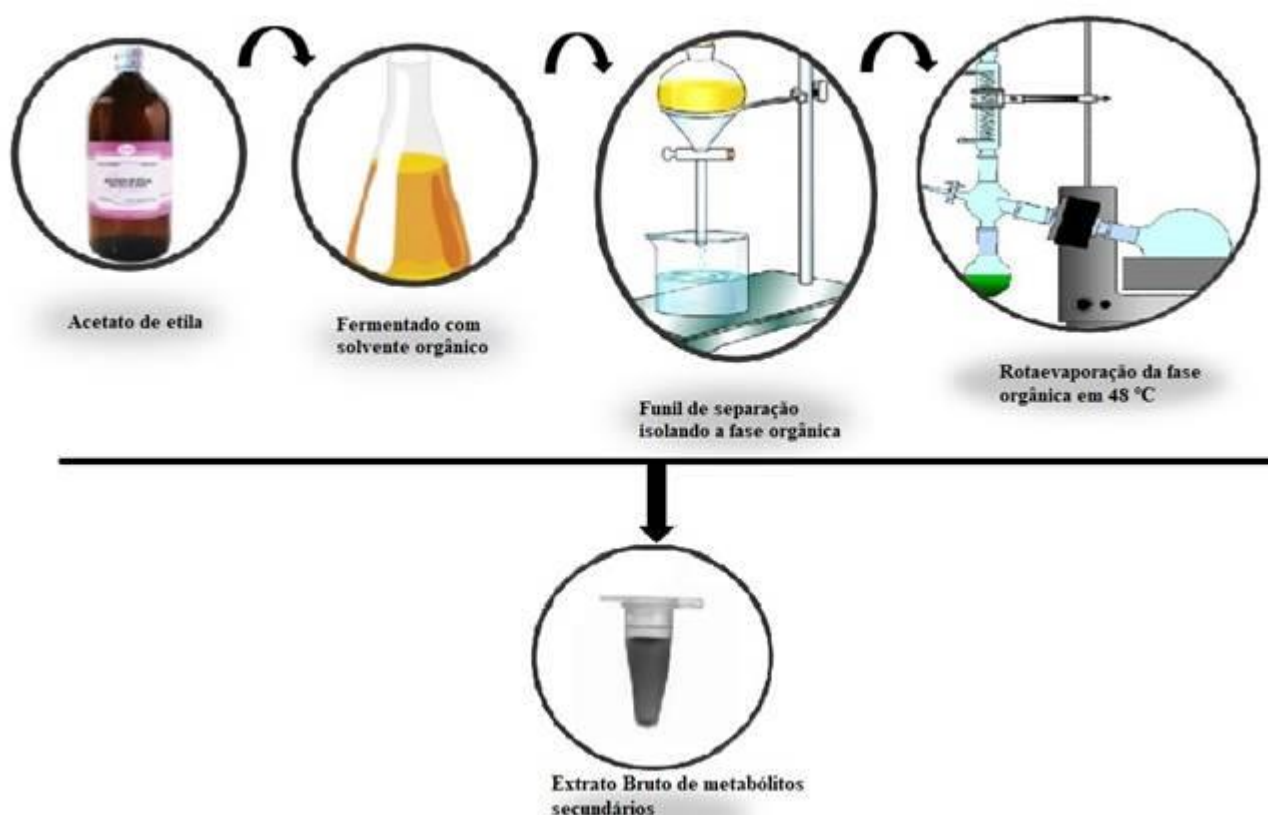


4.3.3 Extração de metabólitos secundários

Após 15 dias, os frascos foram homogeneizados e os compostos de interesse foram extraídos utilizando o solvente orgânico Acetato de etila. Foi adicionado 150 mL de Acetato de etila e homogeneizados com o fermentado por pelo menos 5 min, para obtenção dos compostos de interesse. Esse fermentado foi filtrado em papel de filtro de 44 μm . Foi repetido 3 vezes essa etapa, tendo 450 mL de fase orgânica e 350 mL de fase aquosa totalizando 800 mL de líquido total.

O fermentado obtido foi separado em um funil de separação de 1L, foi formada duas fases; Orgânica e Aquosa. A fase orgânica foi isolada e concentrada em um rotaevaporador. O concentrado foi armazenado em micro tubos *Eppendorfs*, e filtrados em um filtro de 22 μm , a fim de tirar os resquícios de micélios presentes ainda na amostra. Esse concentrado foi submetido a câmara a vácuo durante 4 horas a fim de tirar todo resquício de solvente, e foi pesado identificado e armazenado em micro tubo de plástico sob refrigeração ilustrada pela figura 2 (Clementino et al., 2015).

Figura 2 : Metodologia de extração de metabólitos secundários



4.4 Ensaios biológicos

Os extratos brutos foram diluídos em 1 mL de Água autoclava com DMSO (Dimetilsulfóxido) a 2%, para a avaliação da atividade inibitória dos extratos frente as bactérias patogênicas.

4.4.1 Determinação dos IC's 90 e 50

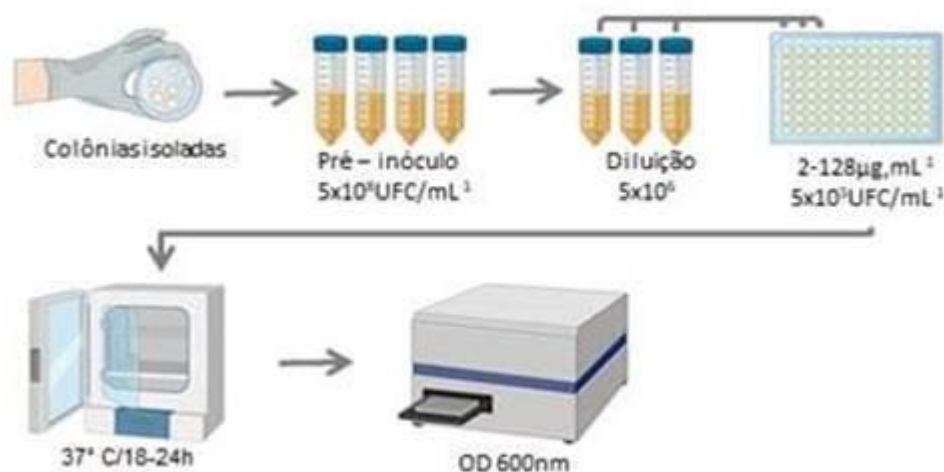
Cepas de *Acinetobacter baumannii* MDR (Multidrug-resistant) formadora de biofilme, *Staphylococcus epidermidis* MDR (Multidrug-resistant), , *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase KPC, , *Escherichia coli* carbapenemase KPC e isolados clínicos de *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* foram utilizados para a realização dos testes antimicrobianos. As bactérias foram plaqueadas em meio Mueller-Hinton-ágar (MHA) e incubadas a 37 °C durante aproximadamente 18h. Após este período foram selecionadas três colônias isoladas

de cada bactéria e inoculadas em 5 mL de caldo Mueller-Hinton (MHB) e incubadas em agitador sob rotação de 200 rpm a 37 °C, overnight. As leituras para análise de crescimento bacteriano foram lidas em um espectrômetro a 600 nm utilizando 1 mL de cada réplica e diluídas para 5×10^5

A determinação dos IC's 90 e 50 foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido pelo CLSI (Wayne, 2012) por meio do método de diluição em microplacas de 96 poços. Três réplicas técnicas foram organizadas nas microplacas a uma concentração bacteriana final de 5×10^5 ufc.mL⁻¹. O extrato bruto foi testado em concentrações que variam de 35 a 0,3 mg. mL⁻¹.

Como controle positivo foi utilizado ciprofloxacina e Gentamicina nas concentrações de 128 ug. mL⁻¹ enquanto que a suspensão bacteriana em MHB foi utilizada como controle de crescimento. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 18h e as leituras foram realizadas em leitor de microplacas sob a densidade óptica (D.O) de 600 nm após o tempo de incubação. Todos os experimentos foram desenvolvidos em triplicata e expressos com desvio padrão (Figura 3).

Figura 3: Metodologia da determinação dos IC's 90 e IC's 50.



4.4.2 Biofilme

Diluições 1:100 da cultura bacteriana crescida durante 18h em meio Luria Bertani, incubadas em meio BM2 [62 mg de tampão fosfato de potássio (pH 7), 7 mg

de (NH₄2SO₄), 2 mg de MgSO₄, 10 mg de FeSO₄ e 0,4% de glucose] em microplacas de 96 poços por 24 h a 37 °C.

Em seguida, as células planctônicas foram removidas e os poços da microplaca foram lavados duas vezes com água desionizada. As bactérias aderidas aos poços da microplaca foram coradas com 100mL de cristal violeta a 0,1% durante 20 minutos. As microplacas foram lavadas duas vezes com água desionizada, secas ao ar e ressolubilizadas com 110 mL de etanol a 70%.

O conteúdo da microplaca será transferido para uma nova microplaca e o controle inibitório do extrato bruto contra os biofilmes foi acessado a 595 nm em um leitor de microplacas.

4.4.3 Análise química dos extratos

Alíquotas do extrato com melhor atividade antibiótica (extrato bruto acetato de etila do líquido metabólico) foi analisada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em cromatofolhas de alumínio TLC contendo Sílica Gel 60 F254 (Merck), 60mm x 100mm. Visando a separação em coluna cromatográfica, e identificação de metabólitos secundários no extrato mais bioativo, foram utilizados diversos eluentes em diversas proporções. O melhor sistema de eluente foi a mistura Hexano/Acetato de Etila. Os cromatogramas migraram em cubas previamente saturadas e as placas de cromatografia foram reveladas em câmara de UV, iodo e solução metanólica de vanilina sulfúrica.

O extrato bruto foi eluído em coluna cromatográfica de sílica gel com uma mistura eluente de Hexano e Acetato de etila, em um gradiente de 100% Hexano à 15% Hexano/ 85% de Acetato de etila. As frações foram coletadas em tubos de ensaio. Algumas frações que se mostraram mais puras foram reunidas para análise em RMN de ¹H e de ¹³C.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fermentação

Foi realizada a fermentação de seis amostras de fungos dos gêneros *Fusarium spp* e *Acremonium sp*.

Foi determinado 15 dias sob 29 C° em 140 RPM (Rotação por minuto) pois são condições favoráveis para obtenção de metabólitos bioativos na fermentação como já foi observado em estudos de fermentações de fungos endofíticos (Maria, *et al.*, 2005; Agostini, 2016; Alberto, *et al.*, 2009).

Foram obtidos os respectivos extratos brutos, cujas massas estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Biomassa dos extratos brutos após a fermentação.

Fungo	Código	Massa do extrato bruto(mg)
<i>Fusarium spp.</i>	LR4-11	452
	LR3-10	425
	FI9-92	655
<i>Acremonium spp.</i>	NF-14	303
	TR8-12	199
	LF-17	256

5.2 Determinação da concentração inibitória de 90% e 50% (IC's 90 e IC's 50)

5.2.1 Bactérias planctônicas

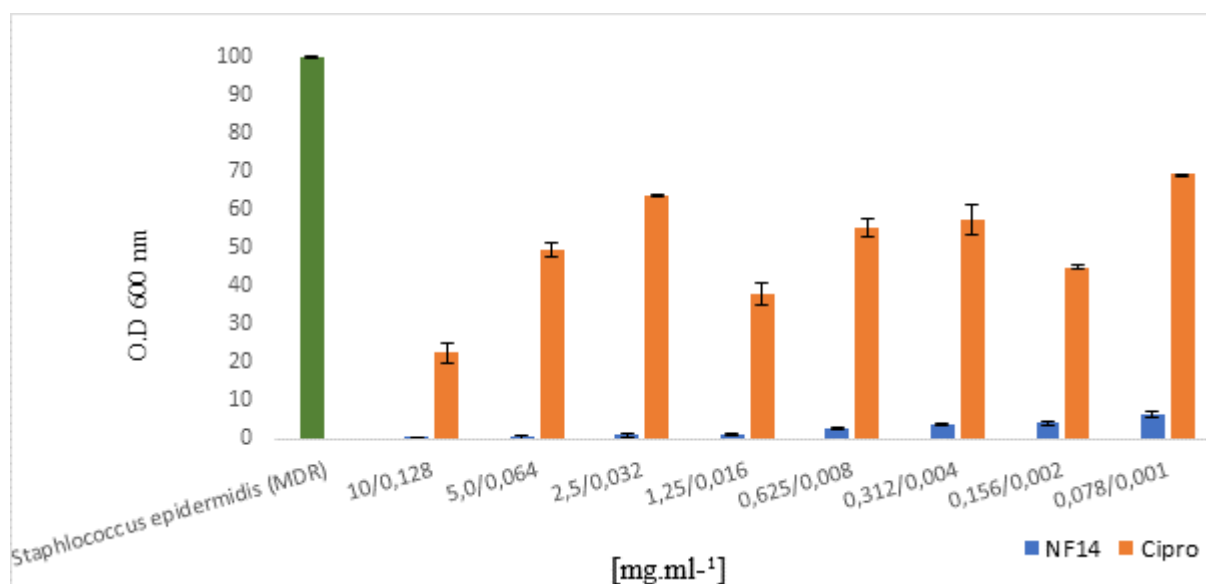
A concentração mínima inibitória foi determinada de acordo com a disponibilidade de cada extrato bruto após a fermentação, as concentrações dos extratos variam entre 35, 25, 15 e 10 mg.mL⁻¹. Os antibióticos escolhidos para os ensaios foi o Gentamicina e Ciproflaxina, e foram usados de acordo com a concentração já estabelecida para sua atividade inibitória a 128 µg.mL⁻¹. Os ensaios biológicos foram lidos no Leitor de Microplaca da KASVI sob uma D.O (Densidade óptica) de 600 nm.

Tabela 5: IC's 90 e 50 dos extratos brutos.

Cepas bacterianas	IC 90 e IC 50 (mg.mL ⁻¹)					
	<i>Fusarium spp.</i>			<i>Acremonium spp.</i>		
	LR4-11	LR3- 10	FI9-92	NF-14	TR8-12	LF-17
<i>Escherichia coli</i>	15 ± 3,75 IC 90	15±3,75 IC 50	30±3,75 IC 50	35±4,37 IC 90	35±8,75 IC 50	S/I
<i>Escherichia coli</i> MDR	15± 3,75 IC 90	S/I	30 ± 15 IC 50	10±2,5 IC 90	S/I	S/I
<i>Staphylococcus epidermidis</i> MDR	15±3,75 IC 50	15 ± 7,5 IC 50	30 ± 7,5 IC 50	10±0,156 IC 90	35±8,75 IC 90	35±8,75 IC 90
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15± 0,93 IC 50	15 ± 1,87 IC 50	30 ± 1,87 IC 50	10±1,56 IC 90	35±8,75 IC 50	35±2,18 IC 50
<i>Acinotobacter baumannii</i> MDR	S/I	S/I	30 ± 7,5 IC 50	10±1,56 IC 50	30±0,93 IC 90	35±17,5 IC 50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15 ± 3,75 IC 90	15 IC 90	15 IC 90	10±0,078 IC 50	S/I	S/I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	15 ± 7,5 IC 90	S/I	15 IC 90	10±0,312 IC 90	30±0,93 IC 50	S/I

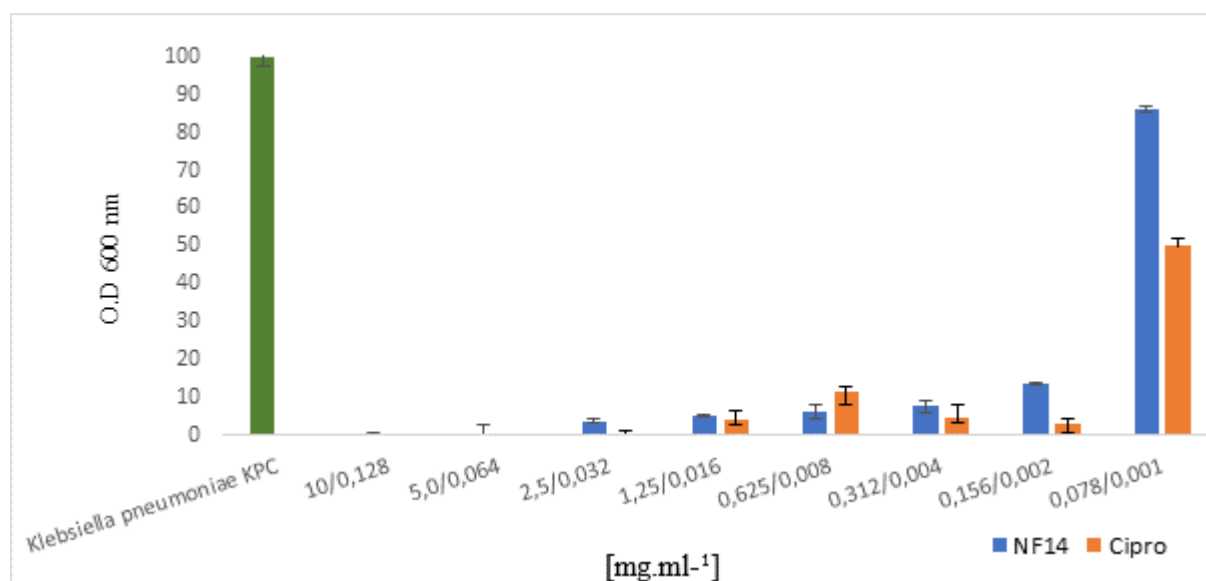
As figuras 4 ao 20 podem ser interpretadas da seguinte forma, a primeira coluna verde é o controle de crescimento, apenas o crescimento bacteriano. As colunas em laranja representam o controle positivo, sendo o crescimento bacteriano frente ao antibiótico. E as colunas azuis representa o crescimento bacteriano frente aos metabólitos secundários dos fungos. A legenda embaixo representa a concentração dos metabólitos secundários e dos antibióticos (mg.mL⁻¹).

Figura 4: Crescimento bacteriano da *Staphylococcus epidermidis* MDR frente ao extrato bruto do fungo NF14.



O extrato bruto do fungo *Acremonium sp* (NF14) teve um ensaio na concentração de $10 \pm 0,078$ mg.mL⁻¹, contra *Staphylococcus epidermidis* MDR. Seu IC 90 foi em 0,156 mg.mL⁻¹, e em até 0,078 mg.mL⁻¹ o extrato teve um controle de mais de 85% do crescimento bacteriano. Ciproflaxicina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de 128 µg.mL⁻¹ (Figura 4).

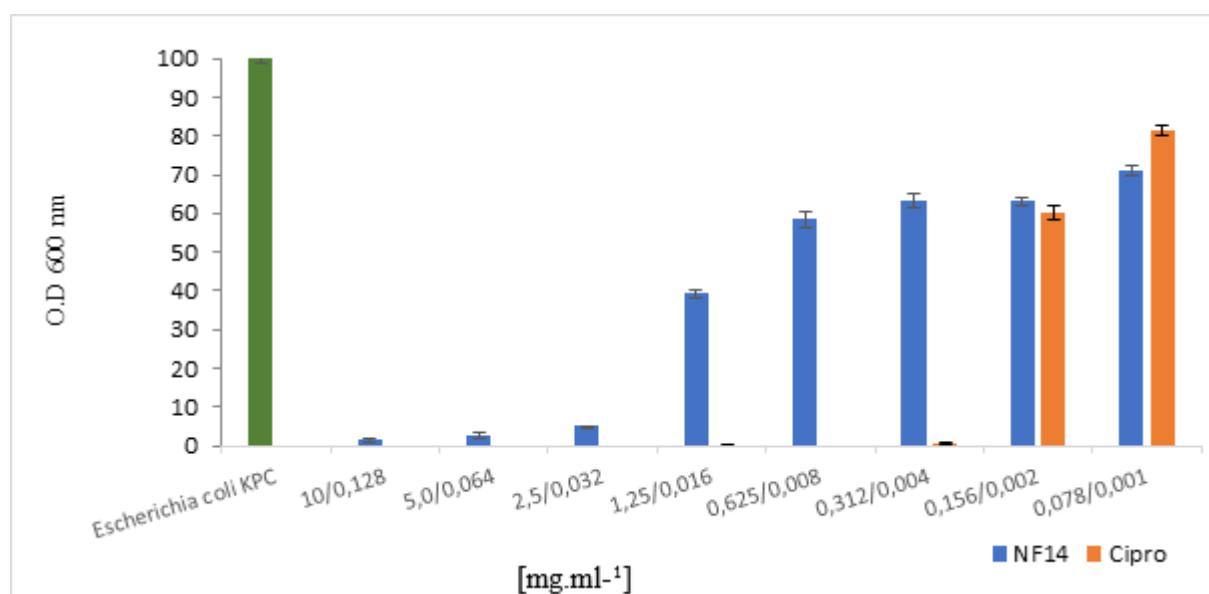
Figura 5: Crescimento bacteriano da *Klebsiella pneumoniae* KPC frente ao extrato bruto do fungo NF14.



O extrato bruto do fungo do *Acremonium sp* (NF14) teve um ensaio na concentração de $10 \pm 0,078$ mg.mL⁻¹, contra *Klebsiella pneumoniae* KPC. Seu IC 90 foi em 0,312

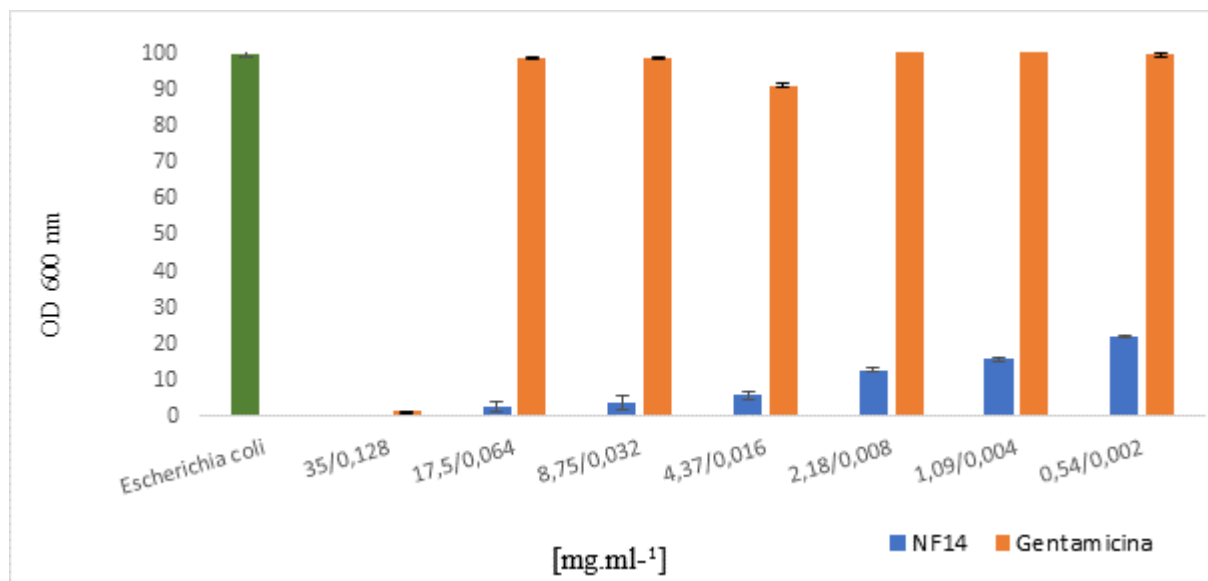
mg.mL⁻¹, e em até 0,156 mg.mL⁻¹ o extrato teve um controle de mais de 85% do crescimento bacteriano. Ciproflaxina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de 128 µg.mL⁻¹ (Figura 5).

Figura 6: Crescimento bacteriano da *Escherichia coli* KPC frente ao extrato bruto do fungo NF14



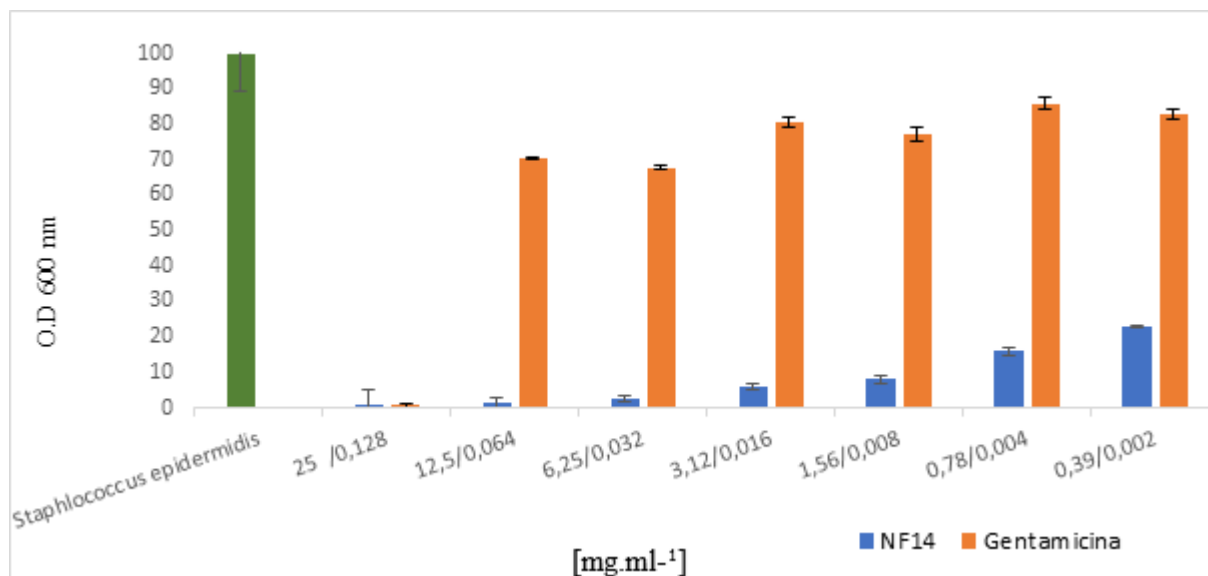
O extrato bruto do fungo *Acremonium sp.* (NF14) teve um ensaio na concentração de 10±0,078 mg.mL⁻¹, contra *Escherichia coli* KPC. Seu IC 90 foi em 2,5 mg.mL⁻¹, e em até 1,25 mg.mL⁻¹ o extrato teve um controle de mais de 50% do crescimento bacteriano. Ciproflaxina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de 128 µg.mL⁻¹ (Figura 6.).

Figura 7: Crescimento bacteriano da *Escherichia coli* frente ao extrato bruto do fungo NF14.



O extrato bruto do fungo *Acremonium sp.* (NF14) teve um ensaio na concentração de $35 \pm 0,54 \text{ mg.mL}^{-1}$, contra *Escherichia coli*. Seu IC 90 foi em $4,37 \text{ mg.mL}^{-1}$, e em até $0,54 \text{ mg.mL}^{-1}$ o extrato teve um controle de mais de 75% do crescimento bacteriano. Gentamicina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de $128 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 7).

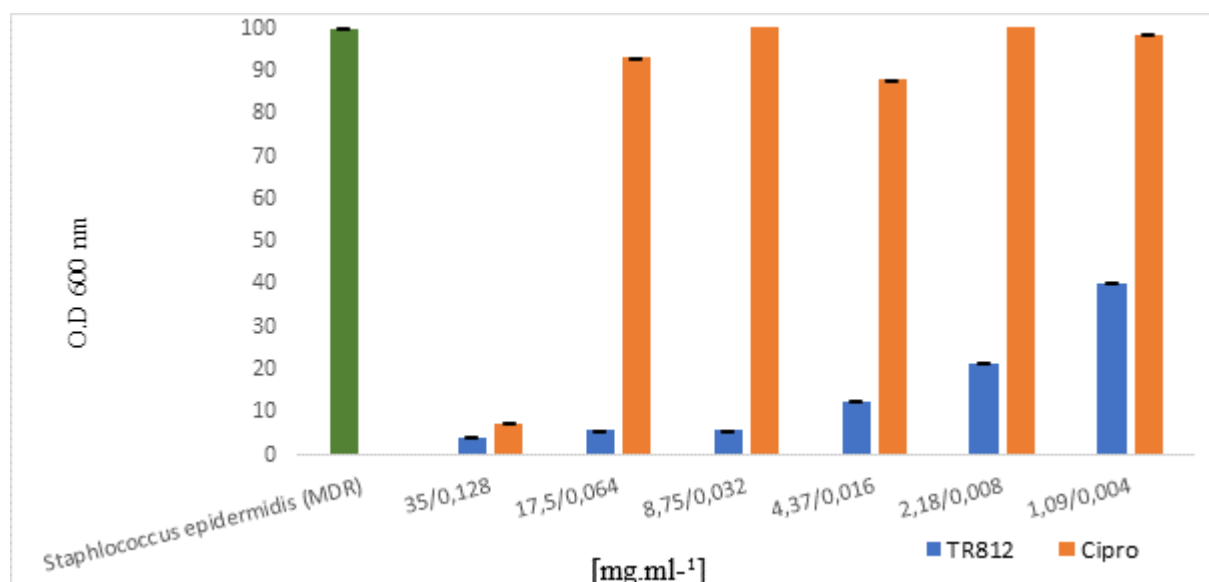
Figura 8: Crescimento bacteriano da *Staphylococcus epidermidis* frente ao extrato bruto do fungo NF14.



O extrato bruto do fungo *Acremonium sp.* (NF14) teve um ensaio na concentração de $25 \pm 0,39 \text{ mg.mL}^{-1}$, contra *Staphylococcus epidermidis*. Seu IC 90 foi em $1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$

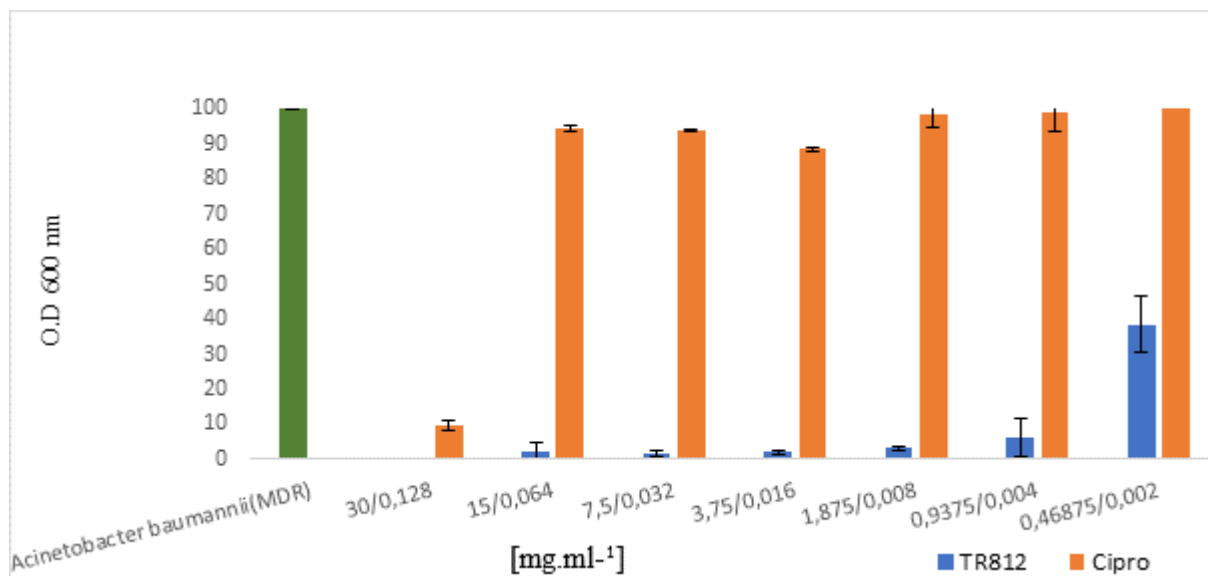
¹, e em até 0,39 mg.mL⁻¹ o extrato teve um controle de mais de 75% do crescimento bacteriano. Gentamicina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de 128 µg.mL⁻¹ (Figura 8).

Figura 9: Crescimento bacteriano da *Staphylococcus epidermidis* MDR frente ao extrato bruto do fungo TR812.



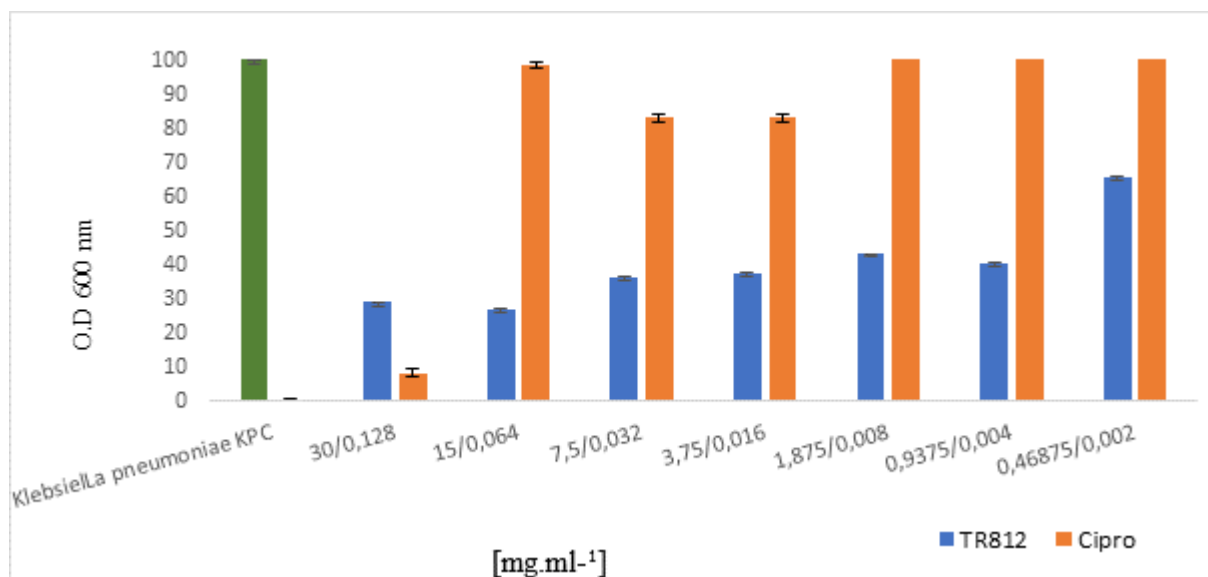
O extrato bruto do fungo *Acremonium* sp. (TR812) teve um ensaio na concentração de 35±1,09 mg.mL⁻¹, contra *Staphylococcus epidermidis* MDR. Seu IC 90 foi em 8,75 mg.mL⁻¹, e em até 2,18 mg.mL⁻¹ o extrato teve um controle de mais de 75% do crescimento bacteriano. Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de 128 µg.mL⁻¹ (Figura 9).

Figura 10: Crescimento bacteriano da *Acinetobacter baumannii* (MDR) frente ao extrato bruto do fungo TR812.



O extrato bruto do fungo *Acremonium sp.* (TR812) teve um ensaio na concentração de $30 \pm 0,46$ mg.mL⁻¹, contra *Acinetobacter baumannii* (MDR). Seu IC 90 foi em 0,93 mg.mL⁻¹, e em até 0,46 mg.mL⁻¹ o extrato teve um controle de mais de 60% do crescimento bacteriano. Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de 128 µg.mL⁻¹ (Figura 10).

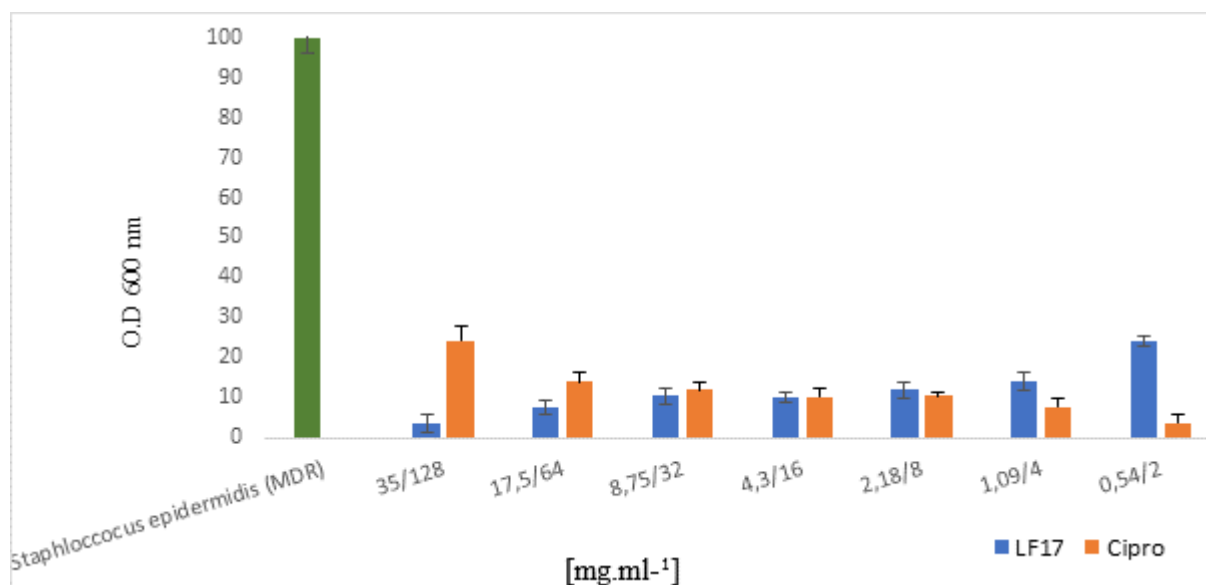
Figura 11: Crescimento bacteriano da *Klebsiella pneumoniae* KPC frente ao extrato bruto do fungo TR812.



O extrato bruto do fungo *Acremonium sp.* (TR812) teve um ensaio na concentração de $30 \pm 0,46$ mg.mL⁻¹, contra *Klebsiella pneumoniae* KPC. O extrato apresentou um IC

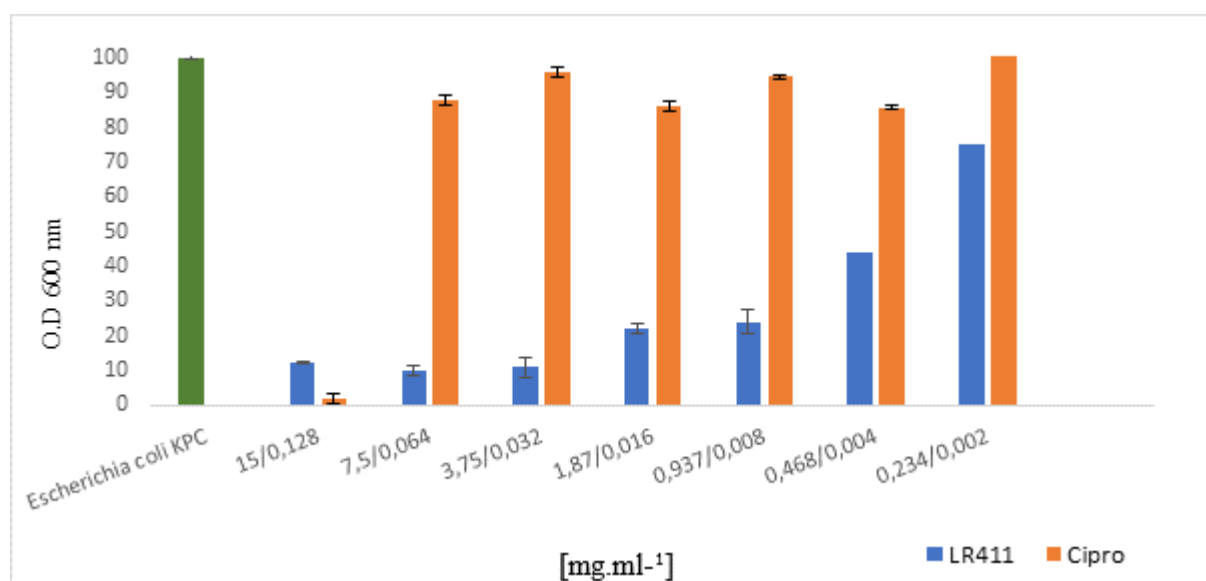
50, em 0,93 mg.mL⁻¹. Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de 128 µg.mL⁻¹ (Figura 11).

Figura 12: Crescimento bacteriano da *Staphylococcus epidermidis* MDR frente ao extrato bruto do fungo LF17.



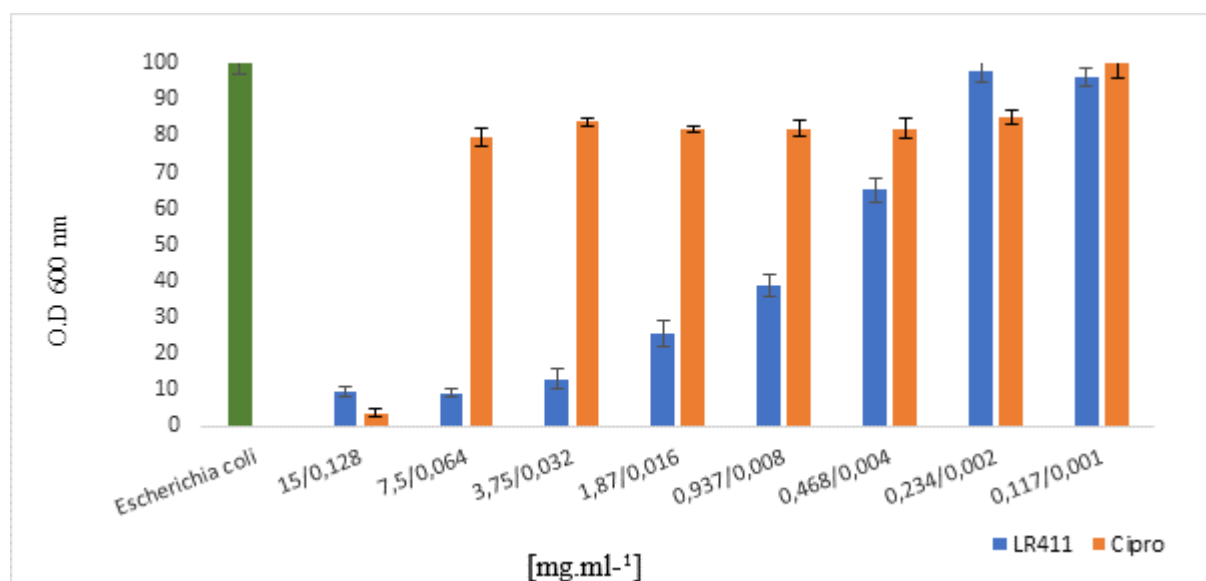
O extrato bruto do fungo *Acremonium sp.* (LF17) teve um ensaio na concentração de 35±0,54 mg.mL⁻¹, contra *Staphylococcus epidermidis* MDR. Seu IC 90 foi em 8,75 mg.mL⁻¹, e em até 1,09 mg.mL⁻¹ o extrato teve um controle de mais de 80% do crescimento bacteriano. Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de 128 µg.mL⁻¹ (Figura 12).

Figura 13: Crescimento bacteriano da *Escherichia coli* KPC frente ao extrato bruto do fungo LR411.



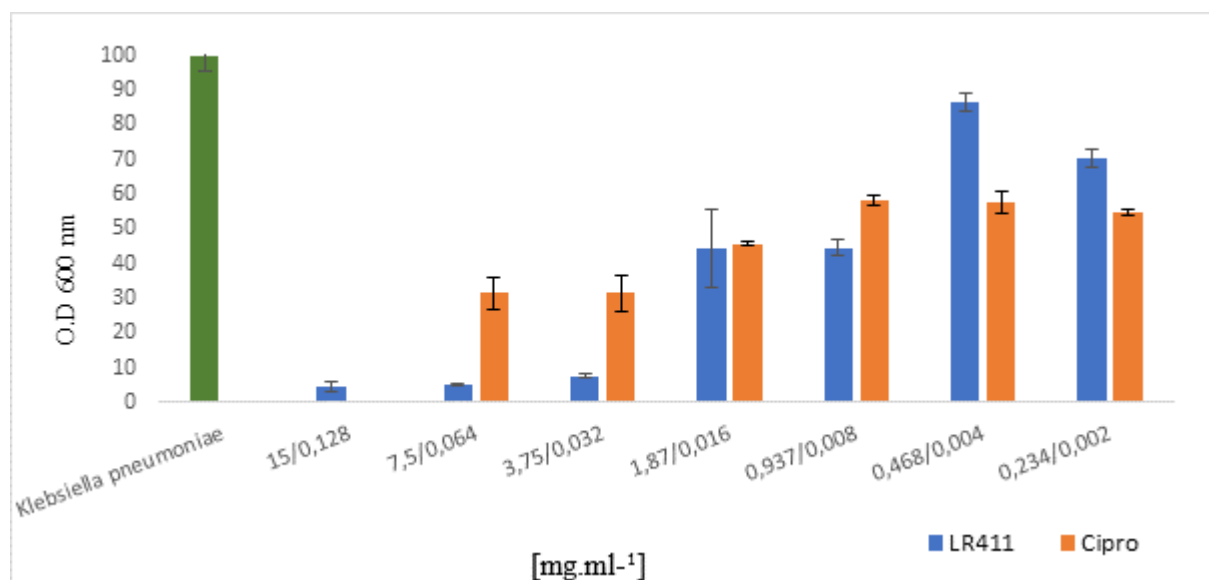
O extrato bruto do fungo *Fusarium sp.* (LR411) teve um ensaio na concentração de $15 \pm 0,23 \text{ mg.mL}^{-1}$, contra *Escherichia coli* KPC. Seu IC 90 foi em $3,75 \text{ mg.mL}^{-1}$, e em até $0,93 \text{ mg.mL}^{-1}$ o extrato teve um controle de mais de 70% do crescimento bacteriano. Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 13).

Figura 14: Crescimento bacteriano da *Escherichia coli* frente ao extrato bruto do fungo LR411.



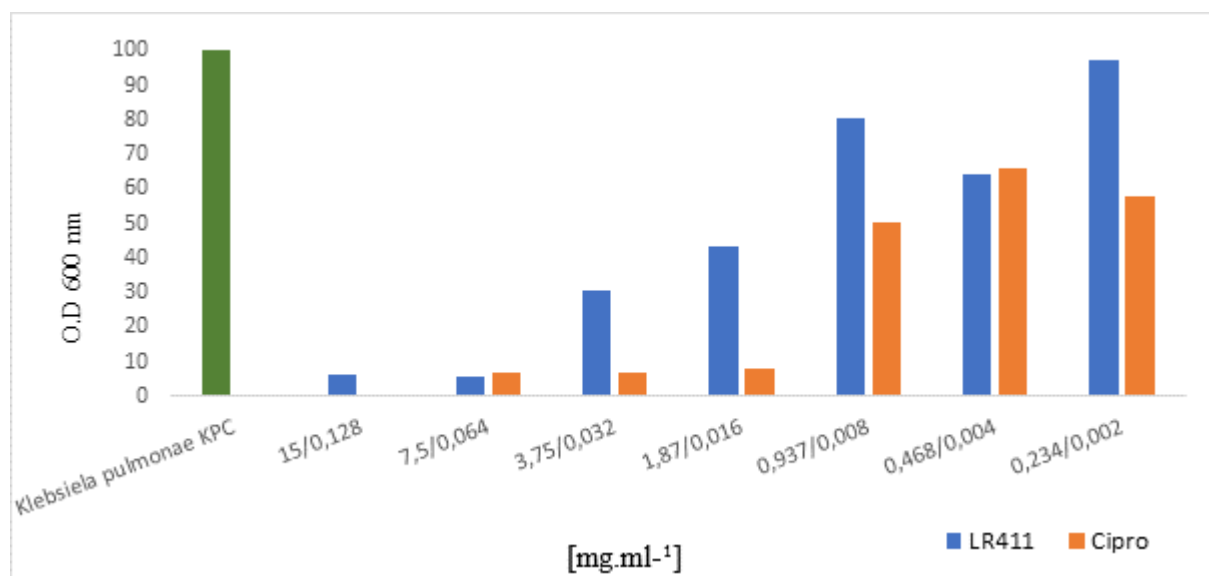
O extrato bruto do fungo *Fusarium sp.* (LR411) teve um ensaio na concentração de $15 \pm 0,11 \text{ mg.mL}^{-1}$, contra *Escherichia coli*. Seu IC 90 foi em $3,75 \text{ mg.mL}^{-1}$,. Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 14).

Figura 15: Crescimento bacteriano da *Klebsiella pneumoniae* frente ao extrato bruto do fungo LR411.



O extrato bruto do fungo *Fusarium sp.* (LR411) teve um ensaio na concentração de $15 \pm 0,23 \text{ mg.mL}^{-1}$, contra *Klebsiella pneumoniae*. Seu IC 90 foi em $3,75 \text{ mg.mL}^{-1}$, e em até $0,9 \text{ mg.mL}^{-1}$ o extrato teve um controle de mais de 50% do crescimento bacteriano. Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de $128 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 15).

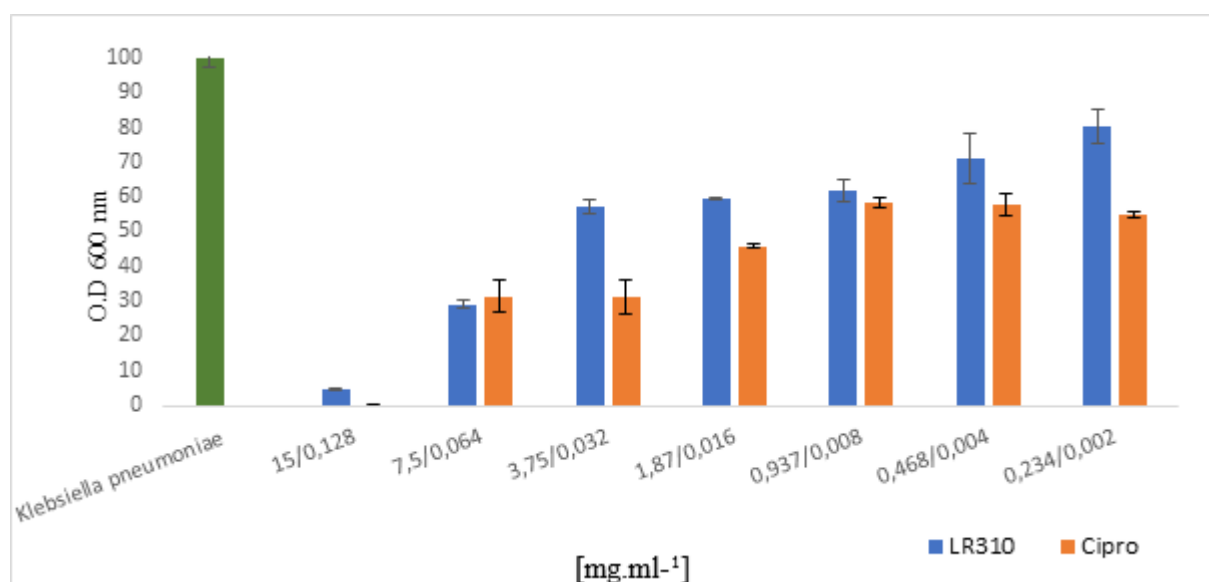
Figura 16: Crescimento bacteriano da *Klebsiella pneumoniae* KPC frente ao extrato bruto do fungo LR411.



O extrato bruto do fungo *Fusarium sp.* (LR411) teve um ensaio na concentração de $15 \pm 0,23 \text{ mg.mL}^{-1}$, contra *Klebsiella pneumoniae* KPC. Seu IC 90 foi em $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$,

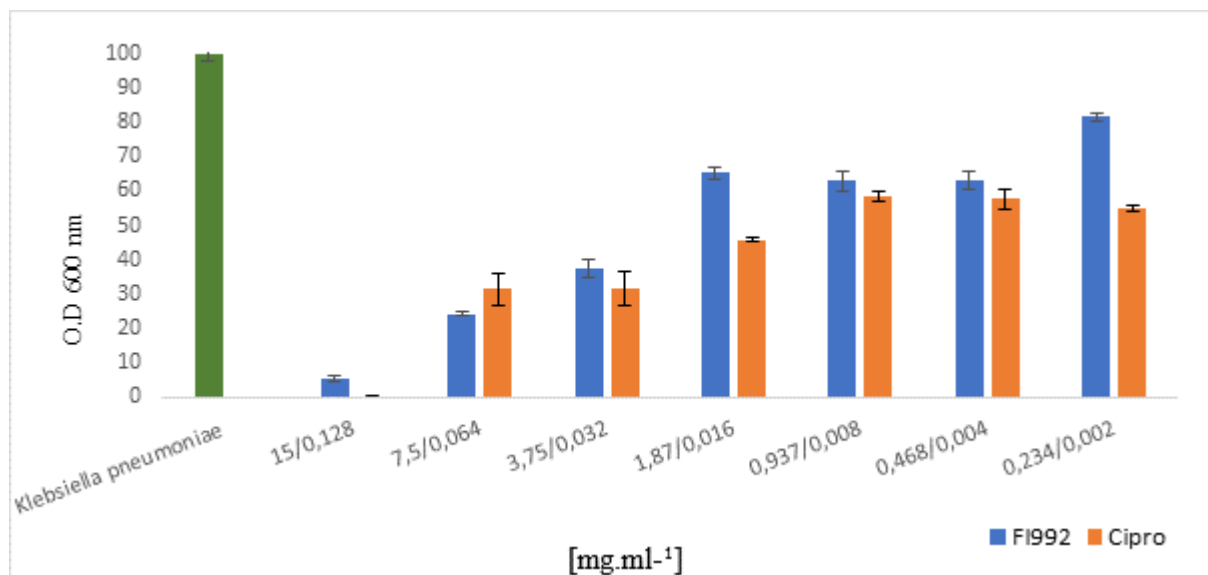
e em até $1,8 \text{ mg.mL}^{-1}$ o extrato teve um controle de mais de 50% do crescimento bacteriano. Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de $128 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 16).

Figura 17: Crescimento bacteriano da *Klebsiella pneumoniae* frente ao extrato bruto do fungo LR310.



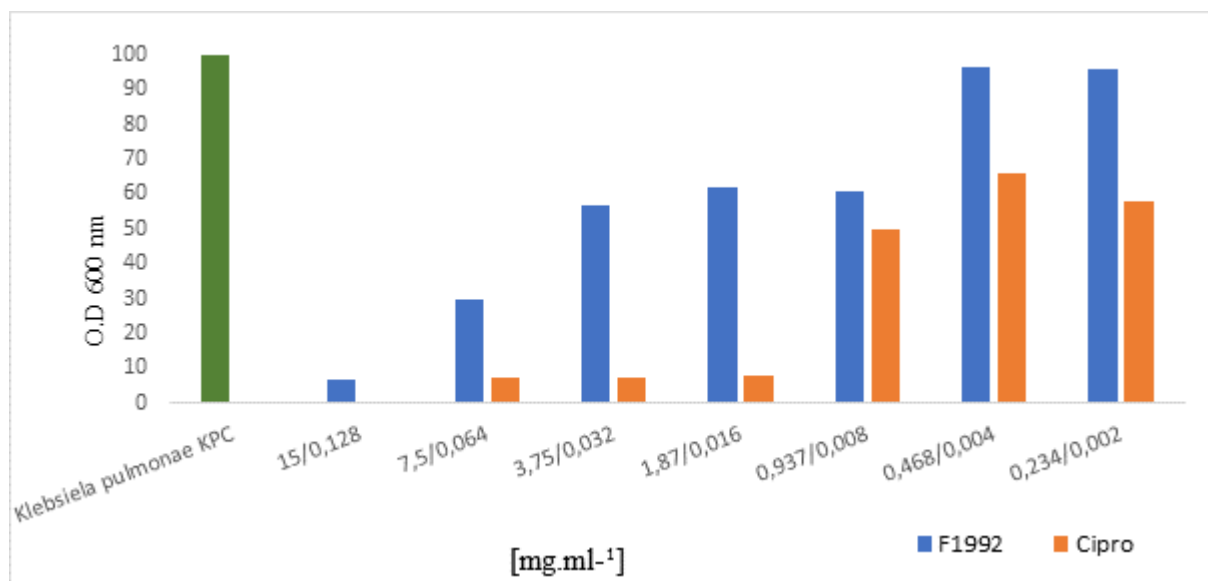
O extrato bruto do fungo *Fusarium sp.* (LR310) teve um ensaio na concentração de $15 \pm 0,23 \text{ mg.mL}^{-1}$, contra *Klebsiella pneumoniae*. Seu IC 90 foi em 15 mg.mL^{-1} . Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de $128 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 17).

Figura 18: Crescimento bacteriano da *Klebsiella pneumoniae* frente ao extrato bruto do fungo FI992.



O extrato bruto do fungo *Fusarium sp.* (FI992) teve um ensaio na concentração de $15 \pm 0,23$ mg.mL⁻¹, contra *Klebsiella pneumoniae*. Seu IC 90 foi em 15 mg.mL⁻¹, e em até 3,75 mg.mL⁻¹ o extrato teve um controle de mais de 50% do crescimento bacteriano. Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de 128 μ g.mL⁻¹ (Figura 18).

Figura 19: Crescimento bacteriano da *Klebsiella pneumoniae* KPC frente ao extrato bruto do fungo FI992.

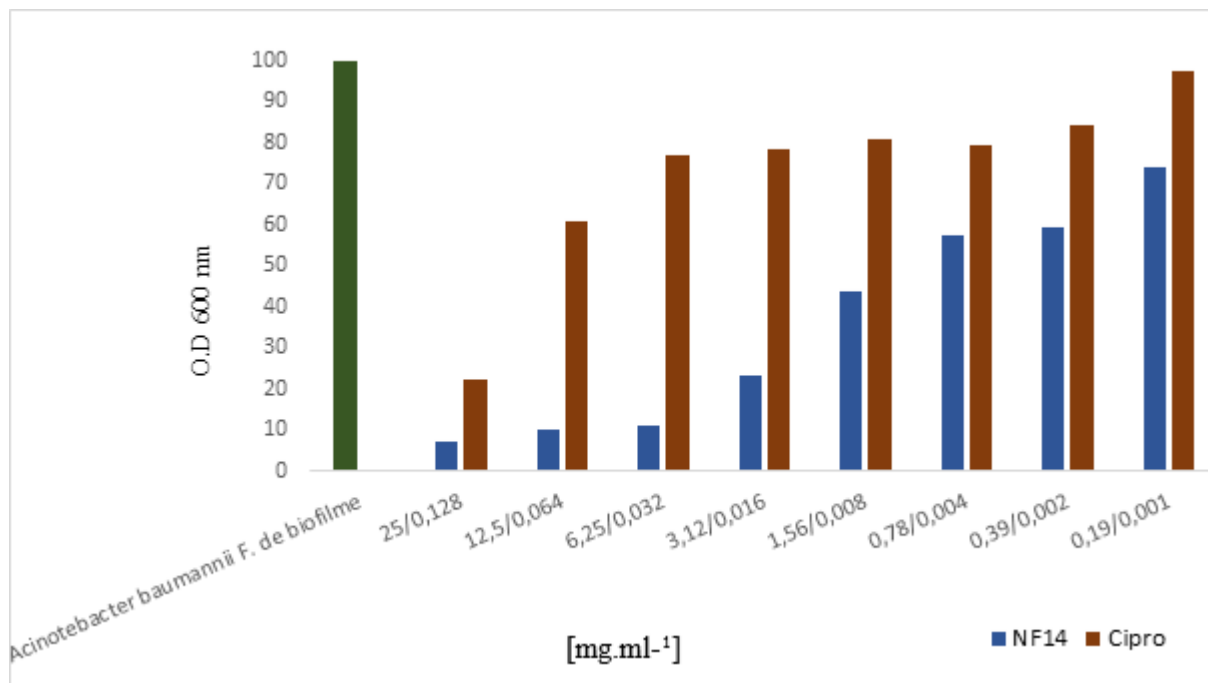


O extrato bruto do fungo *Fusarium sp.* (FI992) teve um ensaio na concentração de $15 \pm 0,23 \text{ mg.mL}^{-1}$, contra *Klebsiella pneumoniae* KPC. Seu IC 90 foi em 15 mg.mL^{-1} , e em até $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ o extrato teve um controle de mais de 60% do crescimento bacteriano. Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de $128 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 19).

5.2.2. Biofilme

A bactéria utilizada no ensaio de biofilme foi a *Acinotobacter baumannii* (MDR) Formadora de biofilme. O extrato bruto do fungo do gênero *Acremonium sp.* NF14 teve um ensaio na concentração de $25 \pm 0,19 \text{ mg.mL}^{-1}$, contra *Acinotobacter baumannii* (MDR) Formadora de biofilme. Seu IC 90 foi em $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, e em até $1,56 \text{ mg.mL}^{-1}$ o extrato teve um controle de mais de 50% da formação de biofilme. Ciprofloxacina foi o antibiótico utilizado como controle positivo na concentração de $128 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 20).

Figura 20: Formação de biofilme da *Acinotobacter baumannii* MDR frente ao extrato bruto do fungo NF14.



A etapa inicial no processo de encontrar um novo antibiótico a partir de um fungo endofítico é a identificação de um efeito antibacteriano presente em um extrato bruto do caldo de cultura ou do micélio de um fungo endofítico. Muitas vezes acontece que as substâncias que compõem um extrato bruto não têm uma atividade antibacteriana potente por si mesmas, mas atuam sinergicamente em uma mistura. É crucial, portanto, a experiência e análise da estrutura do metabólito mais potente, o que desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de um novo antibiótico com potencial terapêutico (Radić & Štrukelj, 2012).

Os resultados do IC's 90 e 50 dos isolados do fungo endofítico *Fusarium sp.* e *Acremonium sp.* contra a *Escherichia coli* já foram observados em outros estudos, como o de Widjajanti *et al.*, 2021. Nesse estudo foram investigadas as atividades antibacterianas dos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos de *Paederia foetida L.*, contra bactérias patogênicas, incluindo *Escherichia coli* ATCC8739.

Dos sete isolados obtidos, o *Fusarium sp.* (isolado denominado SL1) e *Acremonium sp.* (isolado denominado SL6) se destacou por apresentar atividades inibitórias contra a *E. coli* ATCC8739. Os metabólitos secundários extraídos desses isolados demonstraram atividades antibacterianas com valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 250 µg/mL do SL1 e 125 µg/mL para o extrato de SL6. Corroborando com os resultados dos fungos do gênero *Fusarium* contra *Escherichia coli* e *Escherichia coli* KPC (Widjajanti *et al.*, 2021).

Outro estudo que mostrou o potencial de um fungo endofítico do gênero *Fusarium* contra *Escherichia coli*, foi o de Xu *et al.*, 2008. Nesse estudo extratos de fungos endofíticos isolados dos rizomas da planta medicinal tradicional chinesa *Dioscorea zingiberensis* apresentaram atividade antibacteriana. Um dos isolados, identificado como *Fusarium redolens*, demonstrou uma atividade antibacteriana mais potente entre os fungos isolados. Corroborando com os extratos do *Fusarium sp.* que exibiu atividade inibitória contra a bactéria *Escherichia coli*, com concentrações inibitórias mínimas (MIC) variando de 31,25 µg/mL a 125 µg/mL. (Xu *et al.*, 2008).

A pesquisa conduzida por (Ibrahim *et al.*, 2018) revelou uma descoberta promissora isolando uma molécula do *Fusarium chlamydosporium*, denominada Fusarithioamide B, onde ela apresentou uma notável atividade inibitória contra *Escherichia coli*. Os resultados os do diâmetro da zona de inibição (IZD) foi de 25,1 ± 0,60 mm, e os valores

da Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi de $3,7 \pm 0,08$ mg.mL contra a *E. coli* mostrando ótimos parâmetros. Os resultados deste estudo estão alinhados com a atividade inibitória demonstrada pelos extratos brutos desta pesquisa com os fungos da *Aspilia grazielae* pois os 3 *Fusarium spp.* testados, apresentaram controle contra o crescimento de *E.coli* (Ibrahim et al., 2018).

Duas espécies de fungos endofíticos *Acremonium sp.*, isolados da planta argelina *Salicornia arabicaand*, também mostraram potencial inibitório contra *Escherichia coli* nos estudos de Sadrati et al., 2022. Essas duas espécies de fungos *Acremonium sp.* apresentaram uma atividade contra cinco bactérias patogênicas incluindo principalmente a *Escherichia coli*, no qual as duas espécies apresentaram halos de inibição com mais de 22 mm, também foi a única espécie que inibiu quatro das cinco bactérias testadas, demonstrando assim o potencial do gênero de fungos endofíticos *Acremonium* contra cepas de *Escherichia coli* (Sadrati et al., 2022).

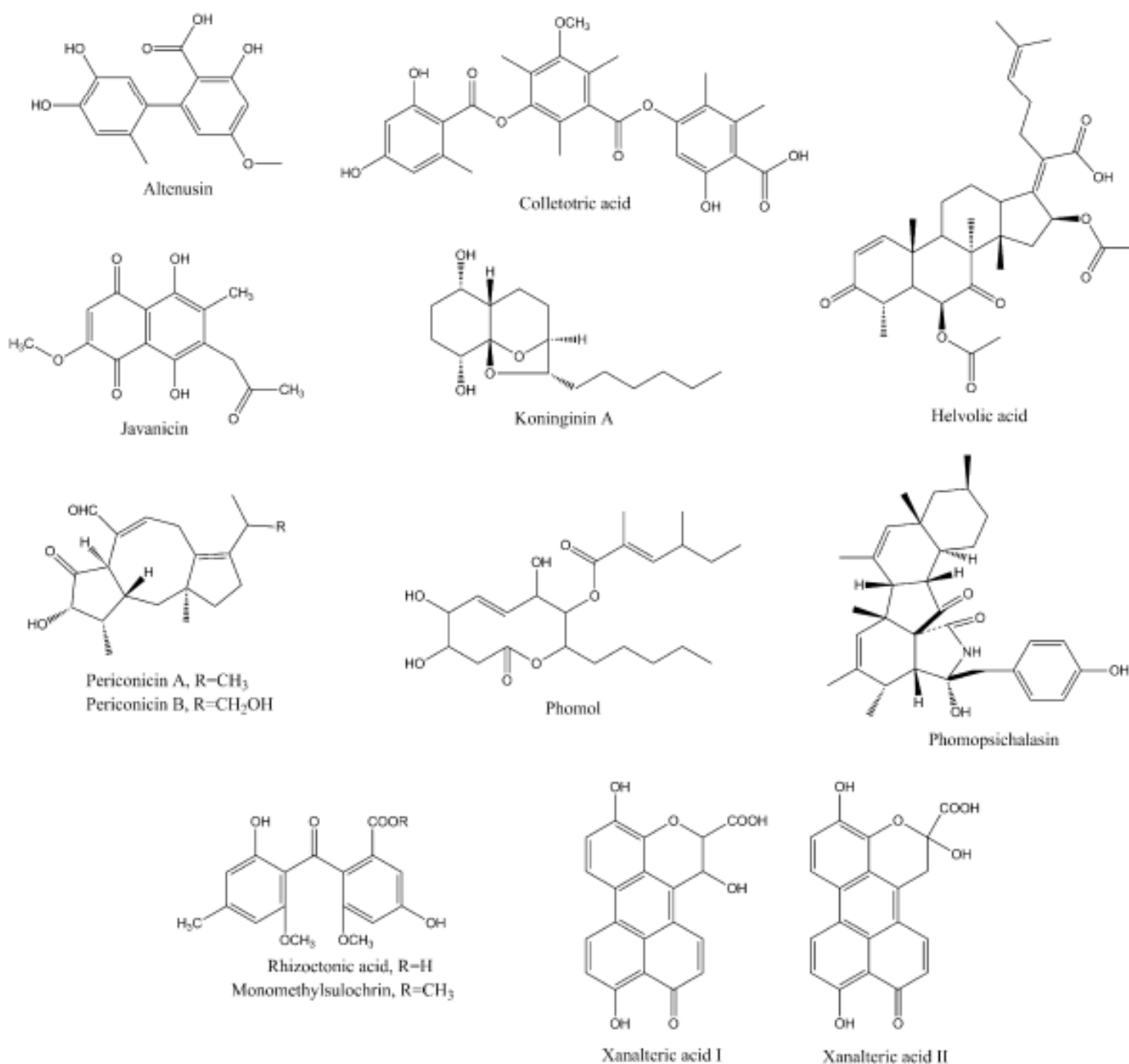
Dois isolados de fungos endofíticos *Acremonium sp.*, e *Fusarium sp.* provenientes de Citrus macroptera da Índia, foram utilizados para extrair metabólitos secundários no qual exibiram atividade inibitória contra cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* e *Klebsiella pneumoniae*. As zonas de inibição dos metabólitos do *Acremonium sp* foram de $11,23 \pm 0,22$ mm para *E. coli*, $13,2 \pm 0,49$ mm para *S. epidermidis* e $8,17 \pm 0,76$ mm para *K. pneumoniae*. Já o do *Fusarium sp.* foi de $12,05 \pm 0,35$ mm para *E. coli*, e $10,3 \pm 0,29$ mm para *S. epidermidis*. Isso reforça os resultados deste presente estudo, uma vez que seis fungos isolados da *Aspilia grazielae*, também pertencentes ao gênero *Acremonium* e *Fusarium*, demonstraram atividade antimicrobiana contra as mesmas cepas: *E. coli*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae* (Deka & Jha, 2020).

Fungos endofíticos isolados de cascas de caules e folhas de *Alstonia boonei* De Wild e *Greenwayodendron suaveolens* do gênero *Acremonium*, apresentaram extratos brutos que inibiram o crescimento de cepas bacterianas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Seus extratos metanólicos apresentaram um MIC de $30,00 \pm 5,77$ ($\mu\text{g/mL}$) para *K. pneumoniae* e $08,57 \pm 5,77$ para ($\mu\text{g/mL}$) *E. coli*(Demeni et al., 2021). Enquanto os endófitos do gênero *Fusarium* isolados da planta *Cissus quadrangularis* L. demonstrou inibição contra as mesmas bactérias com valores de MIC de $16,67 \pm 5,77$ ($\mu\text{g/mL}$) para *E. coli* e $40,00 \pm 5,77$ ($\mu\text{g/mL}$) para *K. pneumoniae*, corroborando com os resultados obtidos aqui nesse estudo contra as mesmas espécies de bactérias (Singh et al., 2021)

Foi isolado dez compostos de um fungo endofítico do gênero *Fusarium* derivado da raiz da planta *Dendrobium officinale* que apresentou atividade contra *Acinetobacter baumannii*, todos os compostos demonstram inibir o crescimento bacteriano com valores de MIC que variam entre 128 e 64 µg/mL (Shi et al., 2018). Enquanto metabólitos secundários de um fungo endofítico do gênero *Fusarium* isolado de uma importante planta medicinal indiana *Sesbania grandiflora* L. apresentou zona de inibição de 12.3±0.50 mm contra *Staphylococcus epidermidis* e 2±0.25 mm contra *Klebsiella pneumoniae* (Deka, D. & Jha D.K., 2018).

Foram identificados dois ácidos carboxílicos, denominados ácidos xanaltericos I e II juntamente com onze metabólitos secundários já conhecidos (Figura 1), a partir de extratos obtidos do fungo endofítico *Alternaria* sp. Este fungo foi isolado de exemplares da planta de mangue *Sonneratia alba*, encontrado na região da China. Os ácidos xanálticos I e II demonstraram atividade antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus*, apresentando valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) de 250 e 125 g/mL, respectivamente. Vale ressaltar que a altenusina exibe amplo espectro de atividade antimicrobiana contra diversos patógenos resistentes, com valores de MIC variando entre 31,25 e 125 g/mL (Kjer et al., 2009).

Figura 21: Fórmulas estruturais de algumas das substâncias antibacterianas produzidas por fungos endofíticos



5.3 Estudos de separação dos metabólitos secundários por coluna cromatográfica de sílica gel

O extrato bruto do fungo *Acremonium spp.* (NF14) foi o escolhido para a cromatografia de sílica em gel pois foi o que apresentou maior inibição no controle do crescimento bacteriano.

Em uma avaliação preliminar em cromatografia de camada delgada (CCD) dos seis extratos de fungos pertencentes aos gêneros *Fusarium sp.* e *Acremonium sp.*, os perfis característicos de todos os extratos apresentaram compostos identificados como cumarinas através da emissão de fluorescência azul, confirmada pela visualização sob radiação ultravioleta de 365 nm, observados nas placas de CCD ao utilizar hexano:acetato de etila como eluente, em gradiente de concentração, conforme a Tabela 5.

A presença de cumarinas foi corroborada por meio de espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da fração isolada (fração 0, Tabela 6) através da cromatografia em coluna de sílica gel, entretanto, em concentrações bastante reduzidas. Na Figura 22, podemos observar que em todas as frações do extrato NF14 aparece os compostos fluorescentes, sendo mais concentrado na fração 0.

Na figura 23, podemos observar o extrato bruto do lado das 8 frações obtidas revelados em solução metanólica de vanilina na presença de ácido sulfúrico.

Tabela 6. Fracionamento do extrato de NF14 em coluna de cromatografia de sílica gel.

Fração	Hexano	Acetato de etila	Massa produto (mg)
0	100%	0%	16,7
1	85%	15%	28,7
2	75%	25%	16,3
3	65%	35%	11,3
4	55%	45%	12,5
5	45%	55%	7,5
6	35%	65%	16,4
7	25%	75%	17,4
8	15%	85%	15,5

Figura 22. Fracionamento do extrato acetato de etila de NF14 (8 frações). (A) Revelado em UV 256 nm. (B) Revelado em UV 365 nm.

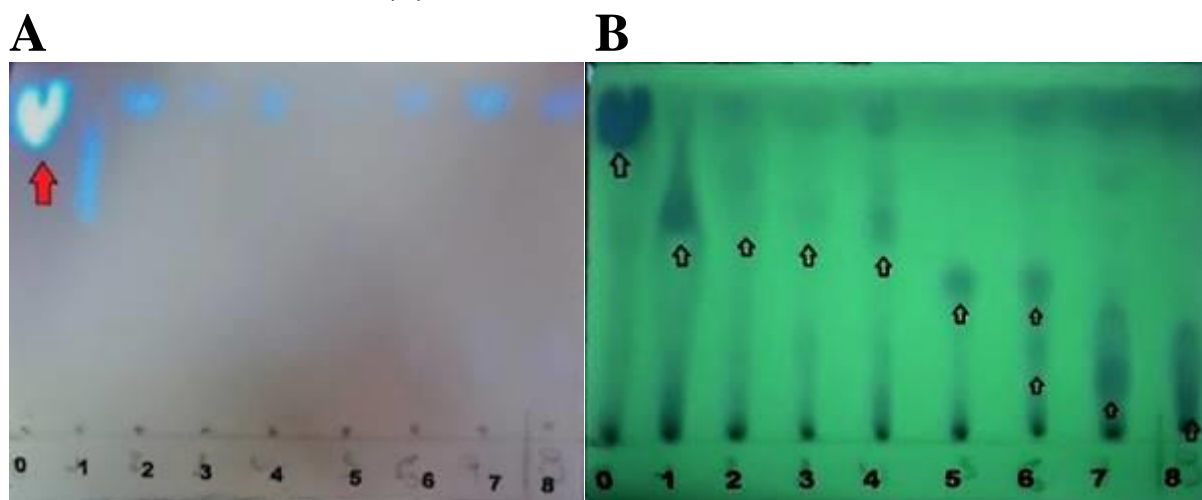
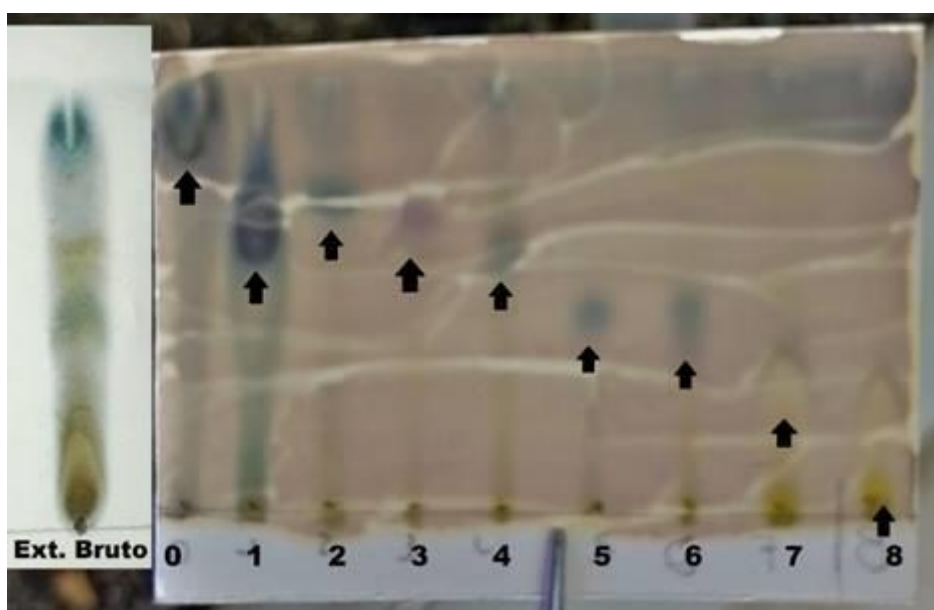


Figura 23. Fracionamento do extrato acetato de etila do NF14 (8 frações). Revelados em solução metanólica de vanilina na presença de ácido sulfúrico.



O extrato bruto de acetato de etila do fungo *Acremonium spp.* (NF14) foi submetido a fracionamento por meio de cromatografia em coluna de sílica gel, empregando hexano e acetato de etila como eluente. Dentre as frações obtidas, foi isolada uma mistura contendo ácidos graxos saturados e insaturados, comprovado por espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Figuras 25 e 26).

A composição da mistura de ácidos graxos foi convertida em seus ésteres metílicos correspondentes através de uma reação com metanol e uma quantidade catalítica de

ácido *p*-toluenossulfônico (conforme ilustrado na Figura 24). Esse procedimento foi realizado com o propósito de conduzir experimentos de cromatografia gasosa/espectrometria de massas. Os resultados revelaram que a mistura majoritariamente consiste em ácido oleico (C18:1, 32%), ácido linoleico (C18:2, 18%), ácido palmitoleico (C16:1, 6,1%), juntamente com ácidos graxos saturados, tais como o ácido pentadecanoico (C15:0, 4,5%), o ácido palmítico (C16:0, 20,5%), e o ácido esteárico (C18:0, 15%), como indicado na Tabela 7.

Figura 24. Preparação de derivados metílicos de ácidos graxo.

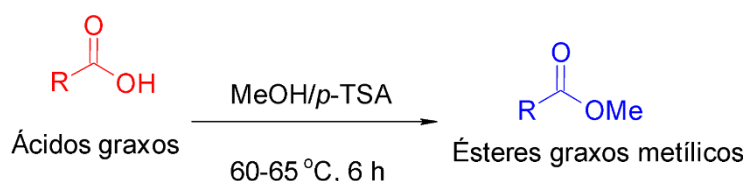


Tabela 7. Principais ácidos graxos presentes na Fração 1 de *Acremonium sp.* (NF14).

Ácido	m/z ^a	Área%
Ácido pentadecanoico (C15:0)	242	4,5
Ácido palmitoleico (C16:1)	254	6,1
Ácido palmítico (C16:0)	256	20,5
Ácido oleico (C18:1)	282	32,0
Ácido linoleico (C18:2)	280	18,0
Ácido esteárico (C18:0)	284	15,0

^aCalculado a partir da massa do éster metílico correspondente

Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da mistura de ácidos graxos monoinsaturados e saturados, contendo principalmente ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2) presentes no extrato de NF14.

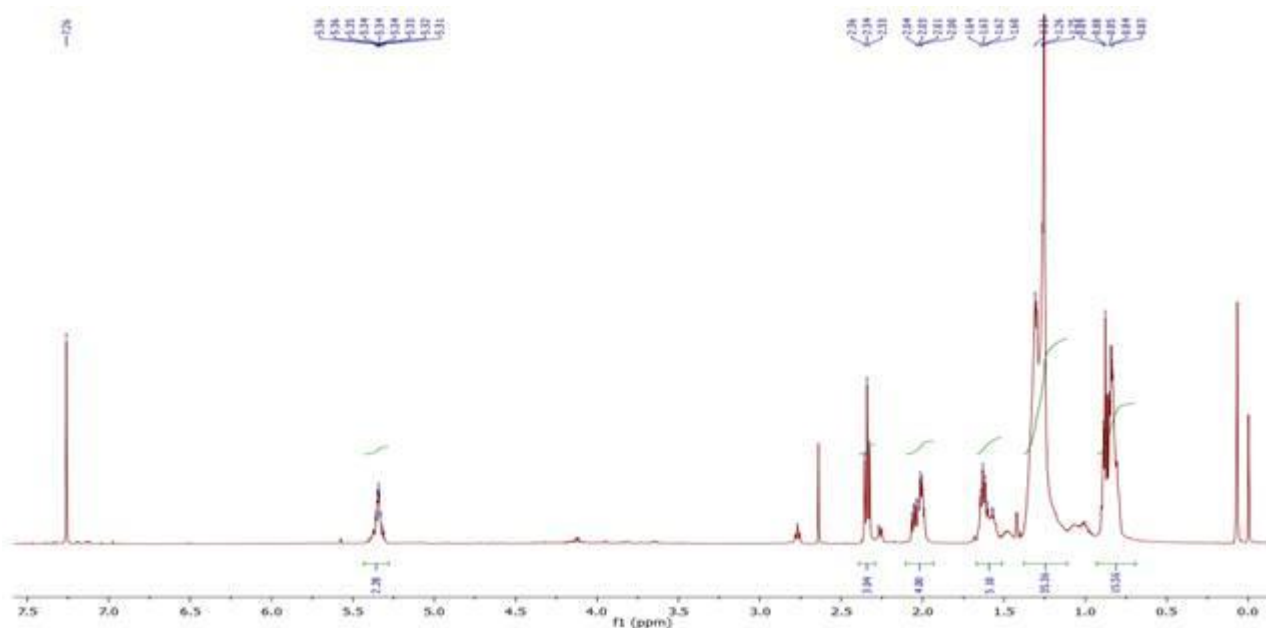


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) da mistura de ácidos graxos monoinsaturados e saturados, contendo principalmente ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2) presentes no extrato de NF14.

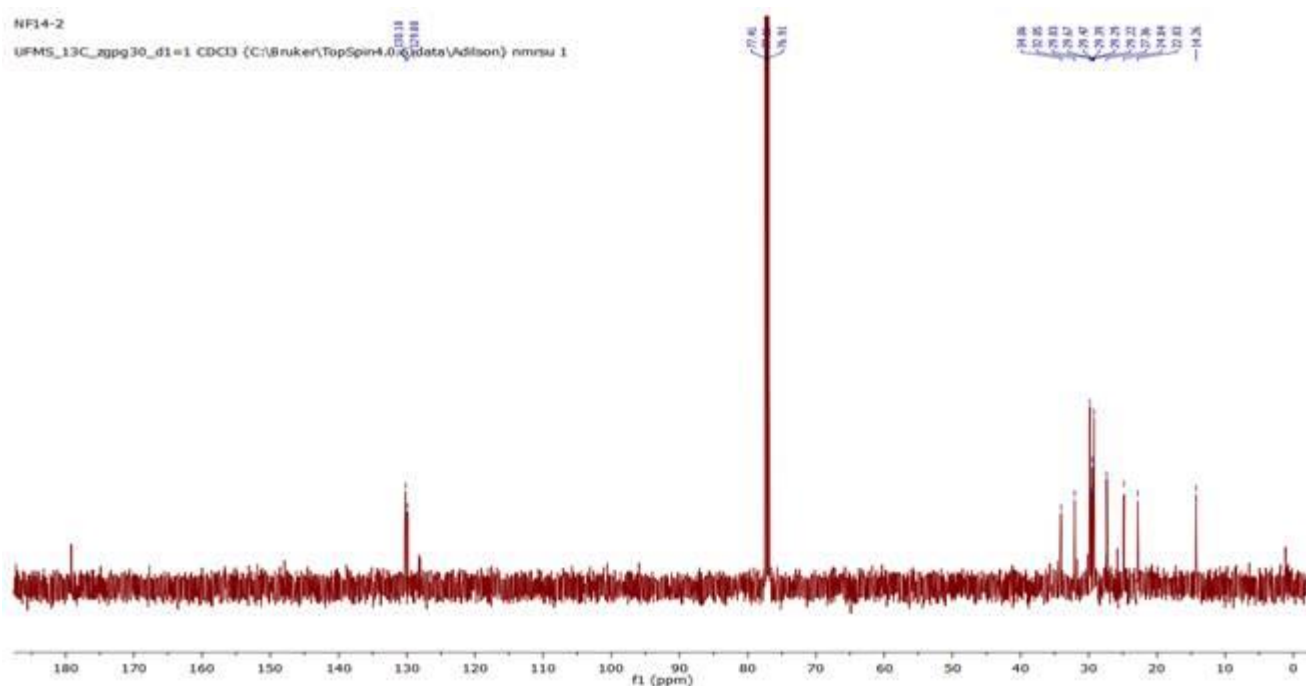
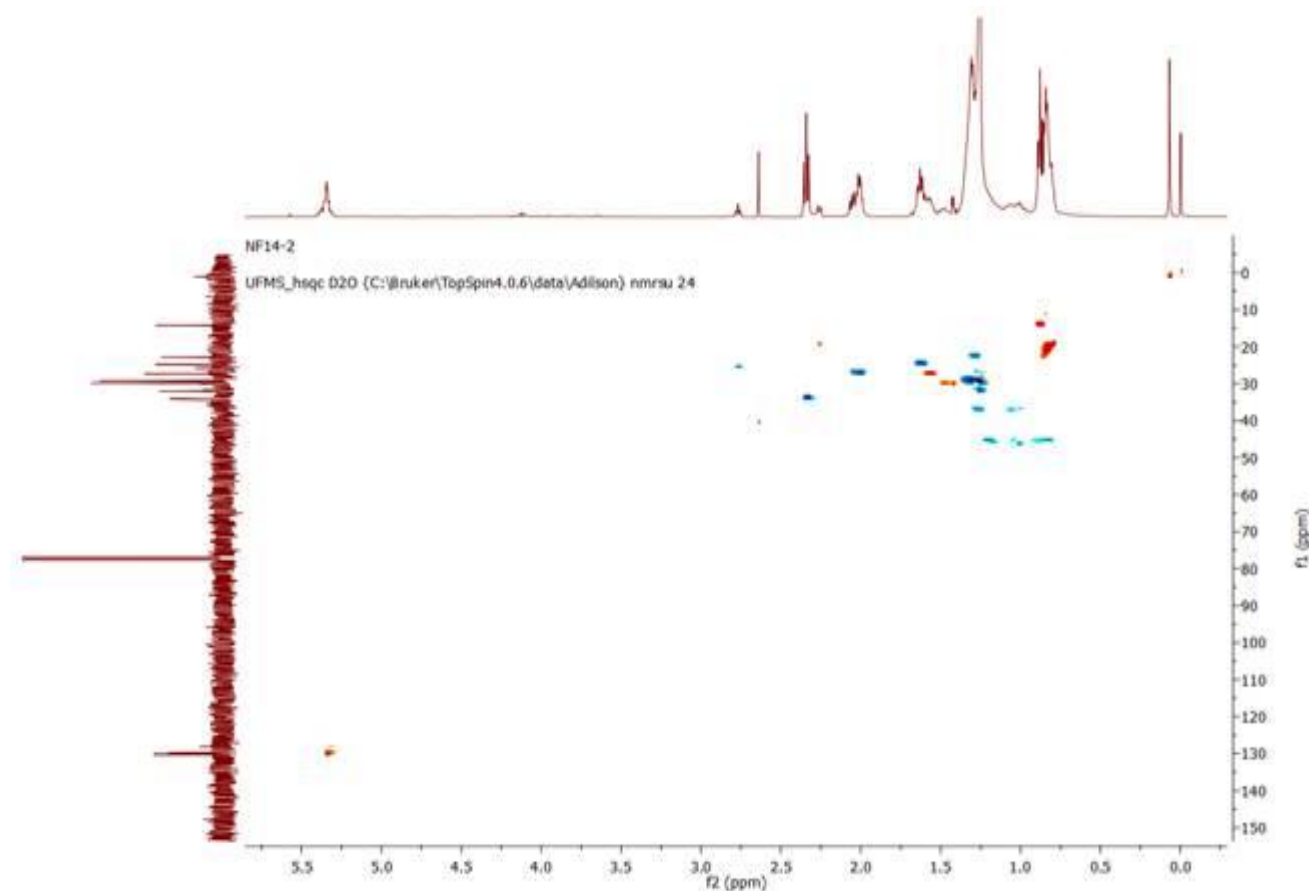


Figura 27. Espectro de correlação heteronuclear HSQC para a mistura de ácidos graxos monoinsaturados e saturados, contendo principalmente ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2) presentes no extrato de NF14.



É altamente provável que o ácido oleico seja um dos compostos responsáveis pela atividade antibiofilme observada no extrato de NF14, uma vez que essa característica foi documentada por Khadke *et al.* (2021). Nesse estudo, os autores evidenciaram que o ácido oleico, quando presente a uma concentração de 20 µg/mL, apresentou uma notável capacidade de inibir a formação de biofilme por *A. baumannii*, sem afetar o crescimento de suas células planctônicas (a concentração inibitória mínima foi superior a 500 µg/mL) e causou uma marcante redução na motilidade de *A. baumannii*. De forma interessante, simulações de dinâmica molecular revelaram que o ácido graxo se liga à enzima sintase de acil-homoserina lactona, que desempenha um papel crucial na comunicação quorum (Abal), e exibiu uma estabilidade conformacional significativa nas interações entre o ácido graxo e Abal. Esses resultados indicam que o ácido oleico possui a capacidade de inibir a formação de biofilme por diferentes cepas de *A. baumannii* e, portanto, pode ser considerado como uma molécula promissora para o controle de infecções persistentes causadas por *A.*

baumannii. Ácidos graxos monoinsaturados têm demonstrado inibir a expressão de genes relacionados à virulência e podem afetar a adesão e motilidade bacteriana. Portanto, o ácido oleico pode ser uma opção promissora para o desenvolvimento de estratégias antibiofilme contra o *A. baumannii* (Nicol et al., 2018).

Em contrapartida, o ácido linoleico (C18:2), um ácido graxo ômega-6, demonstrou ter propriedades antimicrobianas, conforme observado por Feldlaufer *et al.* (1993), e também efeitos antiproliferativos, como documentado por Lee et al. (2022). No estudo mais recente, os pesquisadores descreveram que o ácido linoleico, assim como o ácido oleico exibiram valores de IC₅₀ de 50,3 e 90,4 µM, respectivamente, quando testados em células de câncer cervical humano (HeLa). É digno de nota que Namikoshi et al. (2002) já haviam previamente destacado que tanto o ácido oleico quanto o ácido linoleico têm a capacidade de inibir a automontagem de microtúbulos, sugerindo seu potencial como agentes antitumorais.

Dentro dos ácidos graxos saturados encontrados no extrato do fungo NF14, merecem destaque o ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0). Recentemente, Prasath et al. (2022) conduziram uma pesquisa sobre o potencial antifúngico e a capacidade de reduzir a virulência do ácido palmítico (PA) em relação ao biofilme maduro da *Candida tropicalis* e seus fatores de virulência associados. Os resultados obtidos in vitro demonstraram uma significativa inibição do biofilme da *C. tropicalis* quando tratado com PA, em comparação com as espécies *C. albicans* e *C. glabrata*. Adicionalmente, o PA foi capaz de reduzir o biofilme maduro da *C. tropicalis* em diferentes momentos. O tratamento com PA também desencadeou o processo de apoptose na *C. tropicalis* através da disfunção mitocondrial mediada por ROS.

Além disso, após 48 horas de tratamento, o PA demonstrou influência sobre outros fatores de virulência, incluindo a hidrofobicidade da superfície celular, a biossíntese de ergosterol, proteases e lipases. Essa pesquisa enfatiza a eficácia do PA em combater o biofilme e reduzir a virulência da *C. tropicalis*. Portanto, de acordo com os autores, o PA poderia ser aplicado em conjunto com outros agentes antifúngicos para melhorar a eficácia no controle de infecções causadas por espécies de *Candida* que não a *Candida albicans* (CNCA).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na pesquisa evidenciam que os seis fungos endêmicos do Pantanal, pertencentes aos gêneros *Fusarium* e *Acremonium*, produzem metabólitos secundários com notável atividade inibitória em relação a cepas de bactérias como *Klebsiella pneumoniae* KPC, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* MDR, *Escherichia coli* KPC, *Escherichia coli* e *Acinetobacter baumannii* MDR. A concentração desses metabólitos variou entre 35 mg/mL e 0,23 mg/mL, resultando em inibição total ou parcial do crescimento bacteriano.

Além disso, o extrato bruto do fungo do gênero *Acremonium sp.* (NF14) demonstrou atividade contra a formação de biofilme por *Acinetobacter baumannii* (MDR) em concentrações de $25 \pm 0,19$ mg/mL, com um IC₉₀ de 12,5 mg/mL e uma capacidade de controle de mais de 50% da formação de biofilme em concentrações tão baixas quanto 1,56 mg/mL.

É relevante destacar que a análise do extrato metabólitos secundários de *Acremonium sp.* (NF14) revelou uma mistura de pelo menos seis ácidos graxos: ácido oleico, ácido linoleico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido palmitoleico e ácido pentadecanoico. Esses resultados sugerem que tanto ácidos graxos saturados quanto monoinsaturados têm potencial terapêutico na luta contra infecções microbianas, formação de biofilmes e até mesmo no tratamento de câncer.

Essas descobertas abrem novas perspectivas para pesquisas futuras e o desenvolvimento de terapias que explorem as propriedades benéficas dos ácidos graxos na área médica e de saúde, oferecendo novas abordagens para o tratamento de doenças e infecções.

7. REFERÊNCIAS

AGOSTINI, SBN (2016). Prospecção de compostos bioativos no produto de fermentação de fungos endofíticos isolados de *Handroanthus impetiginosus*.

Alberto, R. N., Orlandelli, R. C., Garcia, A., & Pamphile, J. A. (2009). AVALIAÇÃO DE METABÓLITOS DE ISOLADO ENDOFÍTICO DE *Sapindus saponaria* NO CONTROLE DE PATÓGENOS..

Cau, L., Williams, M. R., Butcher, A. M., Nakatsuji, T., Kavanaugh, J. S., Cheng, J. Y., Shafiq, F., Higbee, K., Hata, T. R., Horswill, A. R., & Gallo, R. L. (2021). Staphylococcus epidermidis protease EcpA can be a deleterious component of the skin microbiome in atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 147(3), 955-966.e16. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.06.024>

Chen Y, Wang G, Yuan Y, Zou G, Yang W, Tan Q, Kang W, & She Z (2022). Metabolites with cytotoxic activities of the mangrove endophytic fungus *Fusarium sp.* 2ST2. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2022.842405> .

Choi, YK, Kang, J.-I., Hyun, JW, Koh, YS, Kang, J.-H., Hyun, C.-G., Yoon, K.-S., Lee, KS, Lee, CM, Kim, TY, Yoo, E.-S., & Kang, H.-K. (2021). Myristoleic acid promotes anagen signaling by autophagy through activation of Wnt/ β -catenin and ERK pathways in dermal papilla cells. *Biomolecules & Therapeutics*, 29(2), 211–219. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2020.169>

Cong, Y., Yang, S., & Rao, X. (2020). Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus infections: a review of case updates and clinical features. *Journal of Advanced Research*, 21, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.10.005>

COWAN, T., et al. 2010. Biofilms and their management: implications for the future of wound care. *Journal of Wound Care*, v. 19, n. 3, p. 117-120, 2010.

Cardenas A., Esposito F., Bonelli R., Sampaio J., Lincopan N. (2020). MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE: Microrganismos multirresistentes de importância clínica e suas resistências intrínsecas e adquiridas (p. 31–86).

Deka, D., & Jha, D. K. (2020). Bioactivity assessment of endophytic fungi associated with *Citrus macroptera* Montr.: An endangered ethnomedicinal plant used in folk medicines in North-East India. *Indian Phytopathology*, 73(1), 21–33. <https://doi.org/10.1007/s42360-019-00179-w>

Deka, D., & Jha, DK (2018). Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos de folhas e cascas de *Litsea cubeba* Pers., uma planta medicinal tradicionalmente importante do Nordeste da Índia. *Jordan J Biol Science* , 11 (1), 73-79.

Demeni, P. C. E., Betote, P. H. D., Kom, C. W., Tchamgoue, E. N., Ndedi Moni, E. D. F., Foumane Maniepi, J. S., Agbor, G. A., & Nyegue, M. A. (2021). Endophytic Fungi from *Alstonia boonei* De Wild and *Greenwayodendron suaveolens* (Engl. And Diels) Verdc. Subsp. *Suaveolens* Possess Inhibitory Activity against Pneumonia Causing Bacteria. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, e9966323. <https://doi.org/10.1155/2021/9966323>

Du W, Chen H, Xiao S, Tang W, & Shi G (2017). New insight on antimicrobial therapy strategies for gram-negative bacterial infection. *Medicine*, 96(13), 6439. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000006439>

Feldlaufer, M.F.; Lusby, W.R.; Knox, D. A.; Shimanuki, H. Isolation and identification of linoleic acid as an antimicrobial agent from the chalkbrood fungus, *Ascosphaera apis*. *Apidologie*, 24 2 (1993) 89-94. DOI: <https://doi.org/10.1051/apido:19930201>

Hyde, KD, Xu, J., Rapior, S. et al. The Incredible Potential of Fungi: 50 Ways to Exploit Fungi Industrially. *Diversity of fungi* 97, 1–136 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00430-9>

Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Al Haidari, R. A., Zayed, M. F., El-Kholy, A. A., Elkhayat, E. S., & Ross, S. A. (2018). Fusarithioamide B, a new benzamide derivative from the endophytic fungus *Fusarium chlamydosporium* with potent cytotoxic and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(3), 786–790. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.049>

Gupta, S., Chaturvedi, P., Kulkarni, M.G., & Van Staden, J. (2020). A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. *Biotechnology Advances*, 39, 107462. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107462>

Gandra, S., Tseng, K. K., Arora, A., Bhowmik, B., Robinson, M. L., Panigrahi, B., Laxminarayan, R., & Klein, E. Y. (2019). The Mortality Burden of Multidrug-resistant Pathogens in India: A Retrospective, Observational Study. *Clinical Infectious Diseases*, 69(4), 563–570. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy955>

Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 125(4), 272–275. <https://doi.org/10.1111/apm.12686>

Khadke, S. K.; Lee, J.-H.; Kim, Y. -G.; Raj, V.; Lee, J. Assessment of Antibiofilm Potencies of Nervonic and Oleic Acid against *Acinetobacter baumannii* Using In Vitro and Computational Approaches. *Biomedicines* 2021, 9, 1133. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9091133>

Lee, H.X.; Li, W.M.; Khatra, J.; Xia, Z.; Sannikov, O.; Ling, Y.; Zhu, H.; Lee, C.H. Antiproliferative Fatty Acids Isolated from the Polypore Fungus *Onnia tomentosa*. *J. Fungi* 2022, 8, 1163. <https://doi.org/10.3390/jof8111163>

Li J., Ren J., Wang W., Wang G., Gu G., Wu X., Wang Y., Huang M., & Li J. (2018). Risk factors and clinical outcomes of bloodstream infections induced by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(4), 679–689. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3160-z>

Li, J., Bi, Z., Ma, S., Chen, B., Cai, C., He, J., Schwarz, S., Sun, C., Zhou, Y., Yin, J., Hulth, A., Wang, Y., Shen, Z., Wang, S., Wu, C., Nilsson, LE, Walsh, TR, Börjesson, S., Shen, J., Wang, Y. (2019). Host-to-host transmission of carbapenemases-producing *Escherichia coli* between humans and domestic animals. *Environmental Health Perspectives*, 127(10), 107009. <https://doi.org/10.1289/EHP5251>

Lin, X., et al. (2021). Mechanisms of bacterial adaptation to antibiotics. *Current Opinion in Microbiology*, 56, 1-7.

Liu, X.-B., Zheng, N., Liang, L.-Q., Zhao, D.-M., Qin, Y.-Y., Li, J., & Yang, R.-Y. (2019). Secondary Metabolites from the Endophytic Fungus *Fusarium equiseti* and Their Antibacterial Activities. *Chemistry of Natural Compounds*, 55(6), 1141–1144. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02915-0>

Luo Y, Yang Q, Zhang D, Yan W. Mechanisms and strategies for controlling antibiotic resistance in pathological biofilms. *J. Microbiol. Biotechnology*. 2021;31:1-7. <https://doi.org/10.4014/jmb.2010.10021>

Infections in Poland. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(8), 1363–1369. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2673-1>

Karaiskos, I., Galani, I., Papoutsaki, V., Galani, L., & Giamarellou, H. (2022). Carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*: Implication on future therapeutic strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 20(1), 53–69. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1935237>

Masson, L. C., Martins, L. V., Gomes, C. M., & Cardoso, A. M. (2020). Diagnóstico laboratorial das infecções urinárias: Relação entre a urocultura e o EAS. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 52(1). <https://doi.org/10.21877/2448-3877.202000861>

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: a proposal from international experts for definitions of interim standards for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3): 268-81.

Mao Z., Zhang W., Wu C., Feng X., & Feng Y. (2022). Molecular mechanisms of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 820301.

Maria, G. L., Sridhar, K. R., & Raviraja, N. S. (2005). Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural technology*, 1(1), 67-80.

Morillo-Garcia, Y., et al. (2022). Endophytic fungi of the medicinal plant *Scutellaria lateriflora*: a source of bioactive compounds with potential pharmaceutical application. *Journal of Applied Microbiology*, 133(5), 2164-2177.

Muhsin, TM, Na'iem, MA, Al-Kadmy, IMS and Khalaf, MJ (2022). New Bioproducts Isolated from Endophytic Fungi and Their Antimicrobial Effects on Clinically Important Pathogenic Bacteria. *Scientific Reports*, 12(1), 1546.

Munita, JM, & Arias, CA Mechanisms of Antibiotic Resistance. 481-511 . <https://doi.org/10.1128/9781555819286.ch17>

Namikoshi, M.; Suzuki, S.; Meguro, S.; Kobayashi, H.; Mine, Y.; Kasuga, I. Inhibitors of Microtubule Assembly Produced by the Marine Fungus Strain TUF 98FI39 Collected in Palau. *Journal of Tokyo University of Fisheries*, Vol. 88, pp. 1-6, 2002.

Nordmann, P., & Poirel, L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9), 821–830. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12719>

Novelli, PK, Barros, MM, & Fleuri, LF (2016). New inexpensive fungal proteases: production by solid-state fermentation and characterization. *Food Chemistry*, 198, 119-124.

Papon, N., et al. (2022). Exploring fungal resources to combat the antibiotic resistance crisis. *Frontiers in Microbiology*, 13, 858.

Park, SY, Choi, GY, Lee, HR, Park, G., Kim, S., Shin, J., Kim, S., & Kim, J. (2022). Plant-derived natural compounds as potential therapy against antibiotic-resistant pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 2972.

Pereira, A. L., & Pita, J. R. (2018). Alexander Fleming (1881-1955): Da descoberta da penicilina (1928) ao prémio Nobel (1945). *História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto*, 6(0), Artigo 0. <http://aleph.letras.up.pt/index.php/historia/article/view/3787>

Pennings, LJ, Leinders-Zufall, T., & Zufall, F. (2020). Mice detect the stereospecific composition of myristic acid in a natural male chemosignal. *Chemical Senses*, 45(4), 327-335. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjaa003>

Ponomarova O, Gabrielli N, Sévin DC, Mülleder M, Zirngibl K, Bulyha K, Andrejev S, Kafkia E, Typas A, Sauer U, Ralser, M. & Patil, KR (2017). Yeast creates a niche for symbiotic lactic bacteria through excess nitrogen. *Cell Systems*, 5(4), 345-357.e6.

Prasath, K. G.; Tharani, H.; Kumar, M. S.; Pandian, S. K. (2020) Palmitic Acid Inhibits the Virulence Factors of *Candida tropicalis*: Biofilms, Cell Surface Hydrophobicity, Ergosterol Biosynthesis, and Enzymatic Activity. *Front. Microbiol.* 11:864. doi: 10.3389/fmicb.2020.00864

Rana, KL et al. (2019). Endophytic Fungi: Biodiversity, Ecological Significance and Potential Industrial Applications. In: Yadav A., Mishra S., Singh S., Gupta A. (eds) Recent advance in white biotechnology by fungi. *Fungal Biology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_1.

Rapp, R., Reyes-Darias, JA, Helbig, C., & Jung, K. (2013). The McpU chemoreceptor mediates carboxylate chemotaxis in *Azospirillum brasilense*. *PLoS ONE*, 8(10), e75955.

Raveh A, Delekta PC, Dobry CJ, Peng W, Schultz PJ, and Blakely PK (2019). Exploitation of R groups at the C2 position of myristoleic acid for a dual activity profile: exogenous glucocorticoids that inhibit phospholipase A2 activity and leukotriene B4 synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 27(5), 940–949. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.10.040>

Rodríguez-Baño, J., Rossolini, G. M., Schultsz, C., Tacconelli, E., Murthy, S., Ohmagari, N., Holmes, A., Bachmann, T., Goossens, H., Canton, R., Roberts, A. P., Henriques-Normark, B., Clancy, C. J., Huttner, B., Fagerstedt, P., Lahiri, S., Kaushic, C., Hoffman, S. J., Warren, M., ... Plant, L. (2021). Key considerations on the potential impacts of the COVID-19 pandemic on antimicrobial resistance research and surveillance. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 115(10), 1122–1129. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trab048>

Roope, L. S. J., Smith, R. D., Pouwels, K. B., Buchanan, J., Abel, L., Eibich, P., Butler, C. C., Tan, P. S., Walker, A. S., Robotham, J. V., & Wordsworth, S. (2019). The challenge of antimicrobial resistance: What economics can contribute. *Science*, 364(6435), eaau4679. <https://doi.org/10.1126/science.aau4679>

Sadrati, N., Zerroug, A., Nedjemeddine, B., & Sofiane, H. (2022). Isolation of Endophytic Fungi from Algerian Plant *Salicornia arabica* and Screening of their Antimicrobial Activity. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 10(10), Artigo 10. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i10.1934-1943.5388>

SANTOS, Helton Fernandes dos; LOVATO, Maristela. *Doenças das Aves*. LEXINGTON: Kindle Direct Publishing, 2018

Sapp, M., Pfaender, S., Hottenträger, B., Röhle, R., Maurer, K., Börner, K., & Pietschmann, T. (2013). The mannose-specific Msl lectin mediates major interactions in the hepatitis C virus life cycle. *Journal of Virology*, 87(18), 10555-10566.

Stefaniuk, E., Suchocka, U., Bosacka, K., & Hryniewicz, W. (2016). Etiology and antibiotic susceptibility of bacterial pathogens responsible for community-acquired urinary tract

Sessitsch A, Hardoim P, Döring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar M., Hurek, T., Sarkar, A., Bodrossy, L., van Overbeek, L., Brar, D., van Elsas, JD, Reinhold-Hurek, B., & Schulze-Lefert, P. (2012). Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots revealed by metagenomic analysis. *Plant-Microbe Molecular Interactions*, 25(1), 28-36.

Shi, S., Li, Y., Ming, Y., Li, C., Li, Z., Chen, J., & Luo, M. (2018). Atividade biológica e composição química do fungo endofítico *Fusarium sp.* TP-G1 obtido da raiz de *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. *Gravando. Nat. Prod.*, 12, 549-556.

Singh, A., Kumar, J., Sharma, V. K., Singh, D. K., Kumari, P., Nishad, J. H., Gautam, V. S., & Kharwar, R. N. (2021). Phytochemical analysis and antimicrobial activity of an endophytic *Fusarium proliferatum* (ACQR8), isolated from a folk medicinal plant *Cissus quadrangularis* L. *South African Journal of Botany*, 140, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.03.004>

Souza, Cintya de Oliveira, Ramos, Francisco Lúzio de Paula, Mota, Chiara de Melo, Santos, Leiliane Vulcão Souza dos, & Lopes, Maria Luiza. (2010). Antimicrobial resistance of *Salmonella Typhi* identified in the State of Pará, Brazil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(2), 61-65. <https://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000200007>

Spellberg, B., Hansen, G.R., Hansen Consulting, Kar, A., Natural Resources Defense Council, Cordova, C.D., Natural Resources Defense Council, Price, L.B., George Washington University, Johnson, J.R., & University of Minnesota. (2016). Antibiotic Resistance in Humans and Animals. *NAM Perspectives*, 6(6). <https://doi.org/10.31478/201606d>

Stone, J.K., Bacon, C.W., & White, J.F., Jr. (2000). An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined. In C.W. Bacon (Ed.), *Microbial Endophytes* (pp. 1-17). Athens, GA: Marcel Dekker

Organização Mundial da Saúde (OMS). (2022). Resistência antimicrobiana global.

Venieraki A., Dimou M. & Katinakis,P.(3917).Endophytic fungi residing in medicinal plants have the ability to produce the same or similar pharmacologically active secondary metabolites as their hosts. *Hellenic Plant Protection Journal*, 10(2) 51-66. <https://doi.org/10.1515/hppj-2017-0006>

Weir, TL, Park, S.-W., & Vivanco, JM (2004). Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(4), 472–479. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.007>

Wu Y., Chen L., Wu Y., Liu S., & Zhang Y. (2021). Advances in understanding microbial biofilm resistance and approaches to its control and elimination. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 1-16.

Xiong, Z.-Q., Wang, J.-F., Hao, Y.-Y., Wang, Y., Zhao, W., & Xu, L.-H. (2014). Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-82>

Xuan, H., Shao, H., Xiong, X., Zhang, Z., & Li, J. (2019). Characterization and mechanism of inhibition of N-(2-hydroxyethyl) hexadecanamide isolated from the endophytic fungus *Fusarium solani* PFE-12 from Chinese eagle wood. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15), 3611.

Yan L., Yang J., Liu J., Huang X., Wu H., Gao J., Liu H., Wu L., Xu Y., Yang J., Zhou X, Ma L, Chen S, Hu J, Zheng J, & Jiang W (2017). Antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated in China: a national multicenter study. *BMC Infectious Disease s*, 17(1), 1-10.

Yang, HL, et al. (2019). Antimicrobial potential of endophytic fungi derived from three seagrass species: *Cymodocea rotundata*, *Halodule uninervis* and *Thalassia hemprichii*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1437.

Yao Q., Yu H., Li X., Su J., Li X., Yu Z., Xie B., Wang S., & Lan J. (2021). A diversity analysis of fungi isolated from citrus fruits in Yunnan, China, and the biological control of *Penicillium digitatum*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1-17.

Yoo, JH, & Lee, J.-H. (2016). Isolation and characterization of antifungal substances from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Control*, 59, 366-371. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.029>

Yoshida T., Fukuda H., Fukuda K., Nagamitsu T., & Masuo S. (2022). New lipoamino acid: Production and isolation of myristoyltaurine from *Nocardia brasiliensis* NBRC 14402. *Journal of Oleo Science*, 71(2), 177–185. <https://doi.org/10.5650/jos.ess21220>

Zhan J, Burns AM, Liu MX, Faeth SH, and Gunatilaka AAL (2007). Investigation of cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural Products*, 70(2), 227–232. <https://doi.org/10.1021/np060527o>

Zhang H., Zheng X., Cheng Y., He J., Wang Y., Ji R., & Wu Y. (2022). Rhizosphere microbiota and its antifungal properties against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in watermelon in continuous cultivation. *Microbiological Research*, 256, 126991.

Liu, W., Liu, Y., Yang, F., Han, S., Zhang, J., Yang, H., Cheng, Z., & Li, Q. (2021). Asperflaloids A and B from *Aspergillus flavipes* DZ-3, an Endophytic Fungus of *Eucommia ulmoides* Oliver. *Molecules*, 26(12), Artigo 12. <https://doi.org/10.3390/molecules26123514>

Zhao, J., Mou, Y., Shan, T., Li, Y., Zhou, L., & Xiao, X. (2011). Roles of lipase-catalyzed hydrolysis in the production of rhamnolipids from glucose by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(1), 379–389. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9327-6>

Zheng, Z., et al. (2022). Structural characteristics of the effects of EPS and the rhizosphere of the wheat endophytic fungus *Cladosporium sphaerospermum* GCL16 on wheat (*Triticum aestivum* L.) growth and soil nutrients. *Journal of Fungi*, 8(6), 420.

Weirich, CE (2020). Estrutura da Comunidade de Fungos Endofíticos e Bioprospecção de Isolados de *Aspilium grazielae* (Santos), Espécie Vegetal Endêmica de Mato Grosso do Sul.