



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

DANIELLE FERREIRA LIMA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Euphorbia tirucalli***

**SUMÉ – PB
2023**

DANIELLE FERREIRA LIMA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Euphorbia tirucalli***

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz.

**SUMÉ – PB
2023**



S729a Souza, Danielle Ferreira Lima de.
Avaliação da atividade antibiótica de metabólitos secundários de fungos endofíticos da Euphorbia tirucalli. / Danielle Ferreira Lima de Souza. - 2023.

48 f.

Orientador: Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Fungos endofíticos. 2. Avelós. 3. Euphorbia tirucalli. 4. Compostos bioativos - produtos naturais. 5. Atividade antibacteriana. 6. Endófitos. 7. Resazurina. 8. Resistência aos antibióticos. 9. Cultura de fungos endofíticos. 10. Metabólitos secundários. 11. Micologia. I. Queiroz, Jean César Farias de. II. Título.

CDU: 60(043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

DANIELLE FERREIRA LIMA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA *Euphorbia tirucalli***

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharela em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:

**Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz
Orientador – UAEB/CDSA/UFCG**

**Professor Dr. Bruno Rafael Pereira Nunes
Examinador I – UAEB/CDSA/UFCG**

**Professor Dr. José George Ferreira Medeiros
Examinador II – UATEC/CDSA/UFCG**

Trabalho Aprovado em: 20 de novembro de 2023.

Aos meus pais, Jailton e Nailde, pelo incomensurável esforço na minha formação e por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois todas as graças que vêm a mim provêm do Senhor. Pois, Ele já me deu todas as ferramentas para que eu conseguisse superar todos os obstáculos postos diante de mim, por cada Anjo que veio em meu auxílio quando precisei, por ser meu refúgio e minha proteção.

Aos meus pais, razão dos meus esforços para concluir esta etapa, por todo o empenho e zelo durante a minha criação e formação e por não permitirem que eu desistisse facilmente.

Aos meus familiares, irmão, avó, tios, primos e à minha madrinha, por todas as palavras de força e incentivo, por me apoiarem de todas as formas possíveis e vibrarem a cada conquista minha.

Aos meus professores da graduação, por todos os ensinamentos que contribuíram com a minha formação, por toda dedicação e auxílio.

À Prof. Dra. Glauciane Coelho por todo carinho, amparo e auxílio nos momentos mais difíceis da graduação, pela oportunidade de ser monitora da disciplina de microbiologia, a qual tanto aprecio.

Ao Prof. Dr. Bruno Nunes, por toda disposição e suporte quanto professor e enquanto coordenador do curso, além de toda ajuda desempenhada na elaboração do presente trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jean Queiroz, também orientador da monitoria de Cultura de Células Animais e do estágio supervisionado, a quem tenho carinho, admiração e respeito, por todas as oportunidades, ensinamentos e orientações, paciência, zelo, amizade, momentos de descontração e por todas as contribuições durante a elaboração deste trabalho.

Ao técnico Adriano Marques, por todo suporte durante as atividades de laboratório e a todos os terceirizados que direta ou indiretamente ajudaram na construção do meu trabalho de conclusão de curso.

À minha querida amiga, parceira de laboratório e de casa, Graciele Santana, a qual faz parte da minha história há nove anos, por me apoiar durante vários momentos difíceis e vibrar a cada dificuldade superada e por toda ajuda durante a execução das atividades que resultaram no presente trabalho.

À minha amiga, Jéssica Freitas, por me aproximar de Deus, por me amparar em diversos momentos e me ajudar no meu processo de evolução, além de participar

das etapas de coleta e isolamentos dos fungos endofíticos, objeto de estudo deste trabalho.

À Elayane Medeiros, por todo o carinho, zelo e pelo auxílio na contagem de conídios.

À Gheorgia Medeiros e Matheus Beltrão, pela amizade e suporte em várias situações da vida e da graduação.

Aos meus amigos, Anderson Rodrigues e Pedro Florêncio por toda a atenção e por sempre estarem dispostos a me ajudar com o que fosse necessário.

Aos meus amigos de Sumé, Roberta Farias, Marcello Carvalho e Renan Oliveira pela amizade e pelos momentos compartilhados, sempre muito felizes e agradáveis.

Aos egressos Andreza Larissa e Caio Lima, por serem inspiração e por todos os conhecimentos passados a mim.

Aos colegas e amigos da graduação, em especial Pedro Victor, Antenor Linhares e Alisson Clementino por toda a ajuda e momentos compartilhados no decorrer do curso.

Aos amigos baianos, Graciele Santana, Jéssica Freitas e Osmar Junior, por todas as idas e vindas da Bahia que fizemos juntos ao longo do curso e pelos momentos de confraternização.

Aos amigos, Daniela Carvalho, Luiz Neto, Ellen Freitas, Gilberto Junior, Alexia Linhares e Jandira Muniz por me ouvirem nos momentos de dúvidas e sempre me apoiarem e torcerem por mim.

À Adriana Correia, pela acolhida nos finais de semana durante o estágio supervisionado.

Às amigas criadas no estágio supervisionado, Luany Carvalho e Juliana Samara, pelo incentivo nesta etapa final.

À todas as pessoas não citadas, mas que contribuíram de alguma forma com o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Obrigada!

*Entregue suas preocupações ao senhor e ele o
sustará; jamais permitirá que o justo venha a cair.*

Salmo 55:22

RESUMO

O mundo vive, atualmente, uma crise de resistência aos antibióticos. Muitos dos fármacos utilizados no tratamento de infecções foram descobertos nos anos 50 e já não são mais eficazes contra as superbactérias. Sendo assim, o investimento na busca por novos antimicrobianos é indispensável. Os fungos endofíticos da *Euphorbia tirucalli* constituem-se como fontes promissoras na produção de substâncias bioativas e conseqüentemente, possíveis novos medicamentos que sejam eficazes contra as cepas de bactérias resistentes. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo produzir e avaliar a atividade antibiótica dos metabólitos secundários dos endófitos isolados da Avelós sobre a bactéria *Escherichia coli*. A atividade antibacteriana foi realizada por meio de teste de diluição em caldo em microplaca de 96 poços. A leitura dos dados foi realizada com adição de resazurina a 0,01% mediante análise no software ImageJ, utilizando o *plugin* ReadPlate3.0. Os dados amostrais foram submetidos ao teste de normalidade, bem como de significância e obteve-se que 28,3% dos fungos testados apresentaram atividade antimicrobiana sobre *E. coli*. Sendo que, 18,5% mostraram-se mais potentes em relação ao controle com antibiótico utilizando 100 µg de amoxicilina e 5,43% apresentaram-se mais potentes em comparação com o controle aplicando 1000 µg de amoxicilina. O fungo Et068 destacou-se manifestando um maior potencial, dentre os fungos testados. Assim, os metabólitos secundários dos fungos endofíticos isolados da *E. tirucalli* configuram-se como biomoléculas promissoras para a produção de antibióticos de novo espectro.

Palavras-chave: Avelós. Compostos Bioativos. Atividade Antibacteriana. Endófitos. Resazurina.

ABSTRACT

The world is currently experiencing a crisis of antibiotic resistance. Many of the drugs used to treat infections were discovered in the 1950s and are no longer effective against superbugs. Investment in the search for new antimicrobials is therefore essential. The endophytic fungi of *Euphorbia tirucalli* are promising sources to produce bioactive substances and, consequently, possible new drugs that are effective against resistant strains of bacteria. The aim of this study was therefore to produce and evaluate the antibiotic activity of the secondary metabolites of the endophytes isolated from Aveloz on *Escherichia coli* bacteria. The antibacterial activity was measured using a broth dilution test in a 96-well microplate. The data was read with the addition of 0.01% resazurin and analyzed using ImageJ software, using the ReadPlate3.0 plugin. The sample data was tested for normality and significance and 28.3% of the fungi tested showed antimicrobial activity against *E. coli*. Of these, 18.5% were more potent than the antibiotic control using 100 µg of amoxicillin and 5.43% were more potent than the control using 1000 µg of amoxicillin. The fungus Et068 stood out, showing greater potential among the fungi tested. Thus, the secondary metabolites of endophytic fungi isolated from *E. tirucalli* are promising biomolecules to produce new spectrum antibiotics.

Keywords: Aveloz. Bioactive Compounds. Antibacterial Activity. Endophytes. Resazurin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Árvores da espécie Euphorbia tirucalli no local de coleta situado em Santa Luzia do Cariri – PB.....</i>	19
Figura 2 -	<i>Placa de Petri com explantes dos galhos do Avelós em meio BSA</i>	20
Figura 3 -	<i>Placas de Petri (A, B e C) com explantes dos galhos do Avelós em meio BSA, nas quais os fungos presentes nos tecidos internos da planta migraram para o meio de cultura.....</i>	21
Figura 4 -	<i>Esquema da 1ª placa de 96 poços para o teste de sensibilidade aos extratos fúngicos.....</i>	24
Figura 5 -	<i>Esquema da 2ª placa de 96 poços para o teste de sensibilidade aos extratos fúngicos.....</i>	25
Figura 6 -	<i>Esquema da 3ª placa de 96 poços para o teste de sensibilidade aos extratos fúngicos.....</i>	25
Figura 7 -	<i>Placas de Petri contendo colônias puras de fungos endófitos isolados da E. tirucalli com diferentes fenótipos e características morfológicas. (A) Colônia com coloração marrom e apresentando superfície verrucosa, (B) Colônia de cor verde e aveludada, (C) Colônia marrom, (D) Colônia com coloração rósea, (E) Colônia com coloração laranja e conídios pretos no centro, (F) Colônia marrom, (G) Colônia Branca com tonalidade marrom no centro, (H) Colônia com micélio branco e (I) Colônia branca e cinza no centro.....</i>	30
Figura 8 -	<i>Cultivo de um dos fungos em meio de aveia após 7 dias de incubação.....</i>	36
Figura 9 -	<i>Teste de normalidade referente aos dados amostrais dos 53 fungos selecionados como potenciais produtores de metabólitos secundários com ação antibiótica.....</i>	40
Figura 10 -	<i>Atividade antibacteriana dos extratos fúngicos sobre E. coli. Gráfico de barras com linhas de desvio-padrão. (*) Médias diferentes em relação ao controle negativo; (#) Médias diferentes em relação ao controle positivo (100 µg); (§) Médias diferentes em relação ao controle positivo (1000 µg).....</i>	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Reagentes adicionados em cada poço de acordo com o tratamento aplicado.....</i>	26
Tabela 2 - <i>Quantidade dos reagentes utilizados no teste de sensibilidade antimicrobiana.....</i>	27
Tabela 3 - <i>Contagem de conídios dos fungos endofíticos da E. tirucalli testados de Et001 a Et027, bem como a classificação quanto a coloração.....</i>	32
Tabela 4 - <i>Contagem de conídios dos fungos endofíticos da E. tirucalli testados de Et028 a Et056, bem como a classificação quanto a coloração.....</i>	33
Tabela 5 - <i>Contagem de conídios dos fungos endofíticos da E. tirucalli testados de Et057 a Et093, bem como a classificação quanto a coloração.....</i>	34
Tabela 6 - <i>Contagem de conídios dos fungos endofíticos da E. tirucalli testados de Et094 a Et106, bem como a classificação quanto a coloração.....</i>	35
Tabela 7 - <i>Médias e desvios-padrões relativos aos controles e aos fungos selecionados no ensaio de atividade antibiótica sobre E. coli de Et002 a Et043.....</i>	38
Tabela 8 - <i>Médias e desvios-padrões relativos aos fungos selecionados no ensaio de atividade antibiótica sobre E. coli de Et044 a Et099.....</i>	39
Tabela 9 - <i>Médias e desvios-padrões relativos aos fungos selecionados no ensaio de atividade antibiótica sobre E. coli de Et102 a Et106.....</i>	40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
Atm	Atmosfera
BSA	Batata-sacarose-ágar
CDSA	Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. tirucalli</i>	<i>Euphorbia tirucalli</i>
g	Grama
g/L	Grama por litro
h	Hora
Km	Quilometro
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama por mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
PB	Paraíba
q.s.p	Quantidade suficiente para
RGB	Vermelho, verde e azul
RN	Rio Grande do Norte
Rpm	Rotações por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UAEB	Unidade Acadêmica de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos
UATEC	Unidade Acadêmica de Tecnologia do Desenvolvimento
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	OBJETIVO GERAL.....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	16
3.1	CRISE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS.....	16
3.2	PRODUTOS NATURAIS COMO FONTES DE COMPOSTOS BIOATIVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.....	17
3.3	AVELÓS (<i>EUPHORBIA TIRUCALLI</i>).....	18
3.4	FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	18
4	METODOLOGIA.....	19
4.1	COLETA E DESINFECÇÃO DAS PARTES AÉREAS DA ESPÉCIE VEGETAL.....	19
4.2	CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	20
4.3	ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS EM MEIO BSA.....	21
4.4	PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	21
4.5	PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM MEIO DE AVEIA.....	22
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	22
4.6.1	Preparo do meio de cultura líquido.....	23
4.6.2	Preparo do inóculo bacteriano.....	23
4.6.3	Padronização dos extratos de metabólitos secundários.....	23
4.6.4	Diluição do antibiótico.....	24
4.6.5	Montagem das microplacas.....	24
4.6.6	Preparo e adição da solução corante.....	27
4.6.7	Leitura das microplacas.....	27
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1	ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDÓFITOS DA <i>E. TIRUCALLI</i>	30
5.2	PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	35
5.3	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS EXTRATOS FÚNGICOS E LEITURA DAS PLACAS.....	36
5.4	POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS SOBRE <i>E. COLI</i>	37
6	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários são substâncias não essenciais produzidas durante o metabolismo secundário de plantas e microrganismos, são mecanismos de diferenciação e sintetizados a fim de garantir a sobrevivência do indivíduo diante de condições inóspitas. Tais compostos são utilizados há décadas para o desenvolvimento de medicamentos devido às atividades farmacológicas que apresentam.

Os fungos constituem uma fonte primordial para a descoberta dessas substâncias, dada a sua capacidade de secretar uma ampla variedade de moléculas de interesse biotecnológico. Além disso, são facilmente renováveis e reprodutíveis quando comparados com outras fontes naturais, sendo possível a produção em escala ampliada por meio das técnicas de fermentação e biotransformação microbiana. Dos fármacos utilizados rotineiramente, mais de 100 são de origem microbiana, entre os quais, estão os antibacterianos como: penicilinas, cefalosporinas, ácido clavulânico, carbapeninas, monobactamas, tetraciclinas e aminoglicosídeos (SPECIAN, 2014).

Os fungos endofíticos, aqueles que habitam no interior dos tecidos vegetais, têm se sobressaído como fontes para a descoberta de novas substâncias bioativas.

A *Euphobia tirucalli*, espécie conhecida como avelós apresenta uso reconhecido na medicina popular e em estudos farmacológicos, por suas propriedades diuréticas, na eliminação de cálculos renais; no tratamento da hepatite-B e, principalmente, o câncer (NASCIMENTO *et al.*, 2020).

Porém, a planta também é reconhecida devido a sua toxicidade. A seiva do avelós é descrita como irritante, cáustica e tóxica, podendo causar sérios danos às córneas quando em contato com os olhos, não se restringindo apenas ao látex, mas todas as partes da planta são tóxicas (RIBEIRO, *et al.* 2019). Sob essas condições não é esperado o crescimento de muitos microrganismos endofíticos.

Contudo, em ambientes inóspitos os organismos sobreviventes precisam desenvolver estratégias de defesa e com isso muitos metabólitos secundários são produzidos, inclusive antibióticos (SILVA, 2017).

Dada a imprescindibilidade de novos antibióticos que sejam eficazes no combate às infecções causadas por cepas de bactérias resistentes e do potencial latente da biodiversidade, ainda pouco conhecida, na produção de moléculas bioativas de interesse farmacêutico e que possam mitigar as consequências atreladas à

resistência aos antibióticos, a qual atualmente é considerada uma ameaça a saúde pública a nível global, justifica-se e torna-se relevante a produção e o estudo dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos endofíticos da *Euphobia tirucalli*, uma vez que a biodiversidade microbiana é responsável por diversas substâncias industriais como as vacinas, enzimas e os antibióticos, gerando bilhões de dólares em todo o mundo, como também oferece benefícios na descoberta e comercialização de novos antibióticos e anticancerígenos, sendo imperativa a exploração de microrganismos novos em ecossistemas especiais, como mares profundos, solos de regiões semiáridas e endófitos (MELO, 2021).

Destacando-se aqueles endófitos isolados de plantas com propriedades medicinais como a avelós, reconhecida, por exemplo, pela sua atividade anticancerígena e antibiótica, e utilizada na cultura popular no tratamento de diversas infecções (SANTOS, 2016).

Ressalta-se que na interação entre os fungos endofíticos e a planta existe a possibilidade de ter ocorrido uma transferência horizontal de genes, de forma que o endófito passa realizar as mesmas reações biossintéticas e adquirir a capacidade de produzir o mesmo bioativo que a planta hospedeira. Sendo assim, é possível por meio das técnicas já consolidadas na indústria, produzir medicamentos oriundos de microrganismos em larga escala e garantindo que a biodiversidade seja usada de maneira sustentável (THEODORO, 2022).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana dos metabólitos secundários dos fungos endofíticos isolados da *Euphorbia tirucalli*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos endofíticos do Avelós;
- Produzir metabólitos secundários a partir dos fungos endofíticos isolados;
- Avaliar o potencial antibacteriano de extratos de metabólitos secundários produzidos pelos endófitos sobre *Escherichia coli* utilizando o método da resazurina;
- Identificar, por meio de análise estatística, os isolados que produzem maior potencial antibiótico.

3 REFERÊNCIAL TEÓRICO

3.1 CRISE DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

As bactérias possuem a capacidade de desenvolver naturalmente mecanismos que inutilizem a ação bactericida e/ou bacteriostática dos fármacos comercializados no mundo. O uso indiscriminado desses fármacos vem contribuindo para o aumento acelerado de cepas resistentes o que acarreta um problema de saúde pública mundial (ABRANTES; NOGUEIRA, 2021).

A penicilina foi uma substância pioneira na utilização para o tratamento das infecções por *Staphylococcus aureus*. Algum tempo após o início da sua administração, foi relatada a presença de um gene plasmidial que confere resistência ao microrganismo. A partir disso e conforme foram surgindo outros antimicrobianos, as bactérias também desenvolveram mecanismos de sobrevivência à ação antibiótica desses medicamentos (ABRANTES; NOGUEIRA, 2021).

O uso negligente dos antibióticos é decorrente da prescrição excessiva e inadequada na prática clínica presuntiva comentada por Prates e colaboradores (2020), bem como da indicação de dosagem e tempo de tratamento incorretos (LIMA, 2017). Além de outros fatores como o mal uso por parte do paciente. Dessa forma, o consumo de antibióticos tem aumentado e colaborado a resistência bacteriana.

Como resultado, os antibióticos tornam-se ineficazes, há uma maior prevalência das doenças infecciosas de origem bacteriana, aumento de internações hospitalares e número de óbitos, como também de custos financeiros (GARDP, 2022).

De acordo com dados da OMS citados por Prates e colaboradores (2020), o número de gêneros de bactérias consideradas resistentes passou de 7 para 12 entre os anos de 2014 e 2017. Dentre os grupos de microrganismos associados às infecções resistentes pode-se citar: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina e à vancomicina, *Enterococcus* spp. resistentes a diferentes classes de antimicrobianos, *Streptococcus pneumoniae* resistente a penicilina, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos e ainda as enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (LÓCIO, 2019).

No Brasil, a espécie *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, provocou surtos de infecções hospitalares que resultaram em óbitos em vários estados brasileiros na última década e em 2017 especialistas relataram que bactérias

resistentes são responsáveis por aproximadamente 23 mil óbitos por ano no país (PRATES *et al.*, 2020).

A falta de novos antimicrobianos de amplo espectro é um fator que sustenta a crise de resistência, uma vez que os medicamentos que foram disponibilizados recentemente são insuficientes para conter a rapidez com que as superbactérias se propagam no mundo. Além disso, boa parte dos antibióticos utilizados atualmente foram descobertos na década de 50 e a maioria das empresas no ramo farmacêutico não estão investindo no desenvolvimento de novos antibióticos (GARDP, 2022). Sendo assim, o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos tem reduzido de forma significativa nos últimos 30 anos (PRATES *et al.*, 2020).

Dessa forma, existe a necessidade crescente de buscar alternativas que auxiliem no controle da problemática acerca da resistência bacteriana.

3.2 PRODUTOS NATURAIS COMO FONTES DE COMPOSTOS BIOATIVOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Historicamente, os produtos naturais sempre foram utilizados para o tratamento de feridas e doenças, e esse conhecimento foi difundido desde os povos tradicionais até as gerações atuais. A biodiversidade composta por espécies vegetais, fungos, bactérias, insetos e organismos marinhos é rica em compostos bioativos que podem ser utilizados para o desenvolvimento de medicamentos.

Referindo-se aos compostos com propriedades terapêuticas provenientes de plantas, tem-se a morfina com potente ação analgésica, a vincristina com ação antitumoral e a atropina que possui efeito anticolinérgico. Essas substâncias foram algumas das primeiras drogas a serem desenvolvidas a partir de produtos vegetais (VIANA *et al.*, 2017). Tal como a penicilina, primeiro antibiótico, isolado de um fungo, utilizado no combate a infecção causada por bactéria (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Os compostos bioativos são originados no metabolismo secundário das espécies, portanto apresentam grande variabilidade química estrutural (RODRIGUES, 2018) tendo sido agrupados em classes. Os alcaloides, terpenos, compostos fenólicos, cumarinas e taninos são as principais classes de moléculas com atividade biológica de interesse para a indústria farmacêutica (OLIVEIRA, 2021).

3.3 AVELÓS (*EUPHORBIA TIRUCALLI*)

A *Euphorbia tirucalli*, popularmente conhecida como avelós, é uma espécie oriunda da África que pertence à família *Euphorbiaceae*. Foi trazida ao Brasil com o intuito de ser utilizada para ornamentação e teve sua utilização difundida, principalmente no Nordeste, para fins medicinais, apesar da elevada toxicidade de seu látex (VALE; ORLANDA, 2011; ALVES; NEPOMUCENO, 2012). A espécie configura-se por apresentar galhos duros, cilíndricos e verticulados podendo crescer até atingir 7 metros de altura (COSTA, 2011).

A avelós apresenta diversas propriedades farmacológicas descritas na literatura, como: anticarcinogênica, antiasmática, antiespasmódica, antibiótica (VALE; ORLANDA, 2011), larvicida e moluscida (SANTOS, 2016). Essas atividades frequentemente são relacionadas a presença de fitoesteróis e triterpenos (SANTOS, 2016). Dentre as quais, destaca-se o potencial da planta como antitumoral e de forma específica para alguns tipos de câncer como: de mama, pulmão, colo e esôfago (COSTA, 2011).

3.4 FUNGOS ENDOFÍTICOS DE PLANTAS MEDICINAIS

Conforme Bacon e White (2000), os microrganismos endofíticos tratam-se daqueles que colonizam os tecidos internos das plantas sem causar danos imediatos ao hospedeiro. A ocorrência desta relação entre microrganismos e espécies vegetais (maioria das plantas vasculares, algas marinhas, musgos e samambaias) é bastante comum, de forma que podem ser isolados centenas de espécies de fungos e bactérias de uma única planta (CHAPLA; BIASETTO; ARAÚJO, 2013).

Os fungos endofíticos são importantes produtores de metabólitos secundários de interesse farmacêutico, destacando-se aqueles isolados de plantas medicinais, em virtude de que atividade farmacológica de algumas espécies vegetais poderia estar relacionada às substâncias produzidas por fungos endofíticos ou pela planta em resposta à infecção fúngica. Pode-se concluir que as plantas medicinais contenham microrganismos que mimetizam a química do hospedeiro e que sejam capazes de produzir o mesmo produto natural bioativo ou, até mesmo, derivados com maior bioatividade (FERRARA, 2006).

Devido ao potencial atrelado à relação endófito-planta, os metabólitos secundários dos fungos endofíticos da *E. tirucalli* podem agregar na descoberta de novos compostos bioativos que podem vir a resultar na síntese de novos fármacos, em especial, antibióticos.

4 METODOLOGIA

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (CDSA) situado na cidade de Sumé no estado da Paraíba.

As etapas para a construção da coleção de fungos endofíticos isolados da *E. tirucalli*, bem como para a realização do ensaio de atividade antibacteriana com o método de diluição em microplaca estão descritas nos itens a seguir.

4.1 COLETA E DESINFECÇÃO DAS PARTES AÉREAS DA ESPÉCIE VEGETAL

As amostras do caule do avelós foram coletadas em Santa Luzia do Cariri, distrito da cidade de Serra Branca, coordenadas geográficas 7°35'32,3" S 36°49'43,0" W. Situada no Cariri paraibano, a 10 km da cidade de Sumé – PB. Essa região se caracteriza por apresentar clima semiárido e está inserida no bioma Caatinga. Após a coleta, houve a desinfecção do material coletado com álcool 70%, a fim de eliminar formas vegetativas de microrganismos presentes na superfície das amostras. A Figura 1 mostra as árvores das quais os galhos foram retirados, visando a obtenção de fungos endófitos.

Figura 1 – Árvores da espécie *Euphorbia tirucalli* no local de coleta situado em Santa Luzia do Cariri – PB



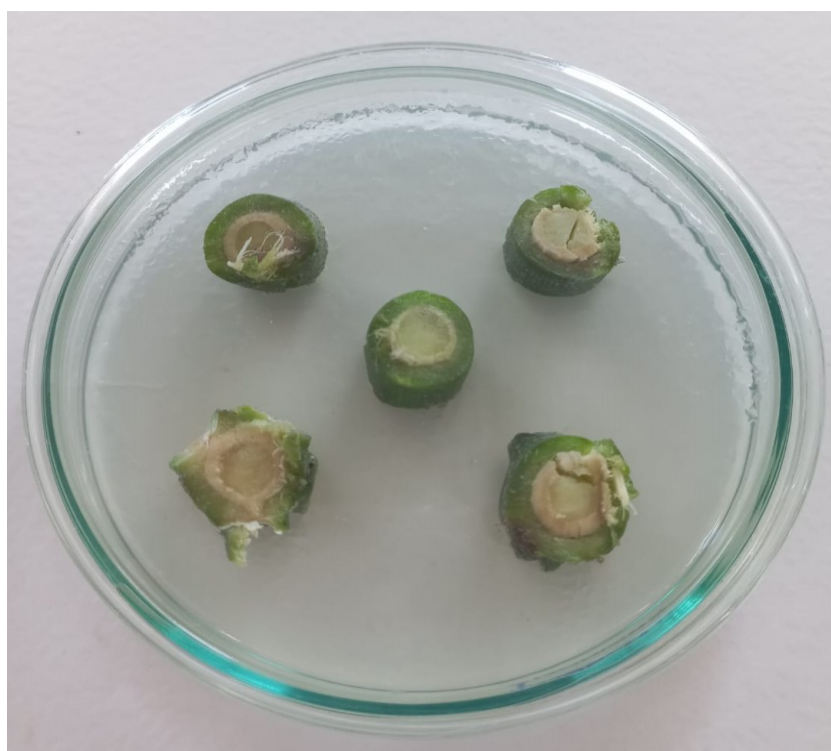
Fonte: Acervo próprio (2023).

4.2 CULTIVO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS

Para o cultivo dos endófitos da *Euphorbia tirucalli*, foi utilizado meio contendo batata, sacarose e ágar (BSA) nas concentrações de 100 g/L, 20 g/L e 6 g/L, respectivamente. Para o preparo do meio, a batata foi descascada e triturada em um liquidificador com água destilada, em sequência, filtrou-se a solução e completou-se o volume com água destilada (q.s.p. 1000 mL). A solução foi transferida para um Erlenmeyer, já acrescido de ágar, e seguiu para a etapa de esterilização em autoclave nas condições de 121°C a 1 atm, por 15 minutos. Após esse procedimento o meio de cultura acrescido de 1 g/L de Amoxicilina foi vertido em placas de petri, previamente autoclavadas, em câmara de fluxo laminar. A adição de antibiótico no meio de cultura é importante para garantir a ausência de bactérias no meio, uma vez que a microbiota endofítica também é composta por bactérias.

Para realizar a inoculação, o caule foi cortado em pequenos fragmentos com o objetivo de facilitar a passagem dos fungos endofíticos para o meio de cultivo, dessa forma os fragmentos foram dispostos nas placas de Petri contendo o meio BSA, como apresentado na Figura 2, e incubadas a 37°C em estufa.

Figura 2 – Placa de Petri com explantes dos galhos do Avelós em meio BSA

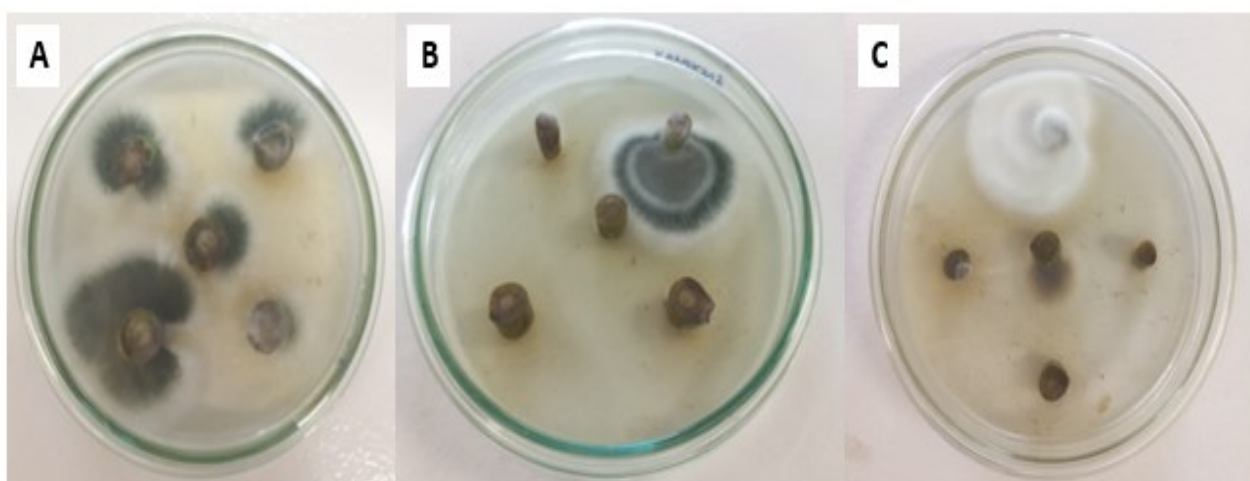


Fonte: Acervo próprio (2023).

4.3 ISOLAMENTO DAS COLÔNIAS EM MEIO BSA

Decorrido alguns dias após a incubação, os fungos passaram do látex para o meio de cultivo, como exibido na Figura 3. As colônias crescidas foram recultivadas de forma a obter-se colônias puras, as quais foram consideradas fungos endofíticos e a partir das mesmas realizou-se a coleta dos conídios.

Figura 3 – Placas de Petri (A, B e C) com explantes dos galhos do Avelós em meio BSA, nas quais os fungos presentes nos tecidos internos da planta migraram para o meio de cultura



Fonte: Acervo próprio (2023).

4.4 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS E CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER

A extração dos conídios foi realizada quando as colônias puras já estavam crescidas e ocupando toda circunferência das placas. Com a utilização de uma solução composta por cloreto de sódio (4,5 g/L), detergente aniônico puro (500 μ L) e água (500 mL), com o auxílio de um bastão de vidro, foi realizada uma raspagem sutil a fim de desprender os conídios, em seguida a solução obtida com os conídios foi transferida para tubos esterilizados previamente e contendo as devidas identificações.

Após o procedimento descrito acima, a solução contendo os conídios foi diluída nas proporções de 1:10 μ L a 1:10⁴ μ L de solução salina a 0,9% a fim de realizar a contagem de conídios em câmara de Neubauer.

Com o auxílio de um contador automático, foram contabilizados os conídios presentes nos quatro quadrantes laterais da câmara de Neubauer, em cada quadrante a contagem foi realizada em zigue-zague e para não contabilizar a mesma célula mais de uma vez, adotou-se como padrão, contar os conídios que tocavam a parte inferior

e direita (Regra do L). Posteriormente foram realizados os cálculos a fim de obter o número total de conídios por mL.

4.5 PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM MEIO DE AVEIA

Para estimular a produção de metabólitos secundários foi necessário o preparo do meio de aveia. Foram misturados 5 g de aveia Quaker® para 15 mL de água destilada para cada recipiente a ser utilizado. O meio de cultivo foi distribuído em potes de vidro de 40 mL e autoclavado a 121°C a 1 atm, por 1 hora. Dessa forma, foi semeado 1 mL da solução de conídios, contendo 1×10^7 conídios, no meio de cultura a base de aveia e incubou-se em estufa a 37°C por 7 dias.

Com o objetivo de extrair os metabólitos secundários, foram adicionados 10 mL de solvente, sendo utilizados clorofórmio 99,8% e acetonitrila, nos recipientes contendo a cultura em aveia. O material resultante foi coletado e depositado em tubos cônicos com tampa rosqueada de 50 mL e centrifugado a 3000 rpm por 5 min. Os extratos contendo os metabólitos secundários extraídos com clorofórmio 99,8% foram filtrados com o objetivo de separar a porção contendo as biomoléculas de interesse e transferidos para tubos cônicos com tampa rosqueada de 15 mL. Reservou-se os tubos com extratos em temperatura ambiente até evaporação do solvente. Os extratos recuperados com acetonitrila, tiveram a fase de topo transferida com uma micropipeta para os tubos de 15 mL e foram postos em estufa de secagem, sendo mantidos a 30°C, com o intuito de promover a evaporação do solvente.

Após a secagem, os recipientes que continham os extratos deviam ser mudados para tubos cônicos de polipropileno de 1,5 mL, para isso adicionou-se 50 mL de álcool 99,3% nos extratos e transferiu-se apenas as substâncias solúveis em etanol.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A atividade antibiótica foi avaliada por meio de um rastreamento utilizando o método de diluição em caldo em microplaca de 96 poços, no qual testou-se a atividade dos extratos sobre *Escherichia coli*. Os procedimentos realizados decorreram de adaptações do protocolo de Wiegand, Hilpert e Hancock (2008).

4.6.1 Preparo do meio de cultura líquido

O meio de cultura utilizado para o ensaio de atividade antibiótica foi um caldo de batata enriquecido com peptona e extrato de levedura. Para o preparo utilizou-se 100 g de batata inglesa. Em um béquer (1000 mL) adicionou-se a batata cortada e 500 mL de água destilada e cozinhou-se a batata em micro-ondas por 10 min. O caldo de batata foi transferido para um Erlenmeyer já acrescido de 5 g/L de peptona e 2 g/L de extrato de levedura, ajustou-se o volume para 1000 mL e em seguida o meio de cultivo foi autoclavado a 121°C e 1 atm, por 15 min.

4.6.2 Preparo do inóculo bacteriano

A cepa de *E. coli* foi cedida pela Prof. Dra. Mabel Calina de França Paz do Laboratório de Microbiologia da UFCG, Campus de Campina Grande. Em câmara de fluxo laminar, as bactérias foram repicadas em meio ágar Muller-Hinton e incubadas em estufa a 35°C por 24 h. Posteriormente, as bactérias foram suspensas em solução salina 0,9% (previamente autoclavada) e transferidas para tubo cônico de 1,5 mL. Em sequência, realizou-se a padronização do inóculo.

Em tubos de ensaio com tampa rosqueada, adicionou-se 5 mL de solução salina 0,9% e acrescentou-se uma pequena quantidade de inóculo, realizou-se o ajuste do volume para 15 mL com solução salina de forma a atingir turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland ($1-5 \times 10^8$ UFC/mL).

A escala de McFarland é uma escala de turbidez frequentemente utilizada para determinar o número de células presentes em uma suspensão. Trata-se de uma série de 11 tubos com diferentes graus de turvação, numerados de 0,5 a 10, cujo quantitativo de células em uma suspensão bacteriana pode ser estimado por comparação, a olho nu, com os padrões desta escala (SOUZA, 2018). O padrão de 0,5 de McFarland é usualmente aplicado na padronização de inóculos bacterianos para realização de teste de susceptibilidade a antibióticos.

4.6.3 Padronização dos extratos de metabólitos secundários

Para padronizar o volume dos extratos de metabólitos secundários, diluiu-se os extratos com álcool 99,3% de forma a obter um volume final de 50 µL.

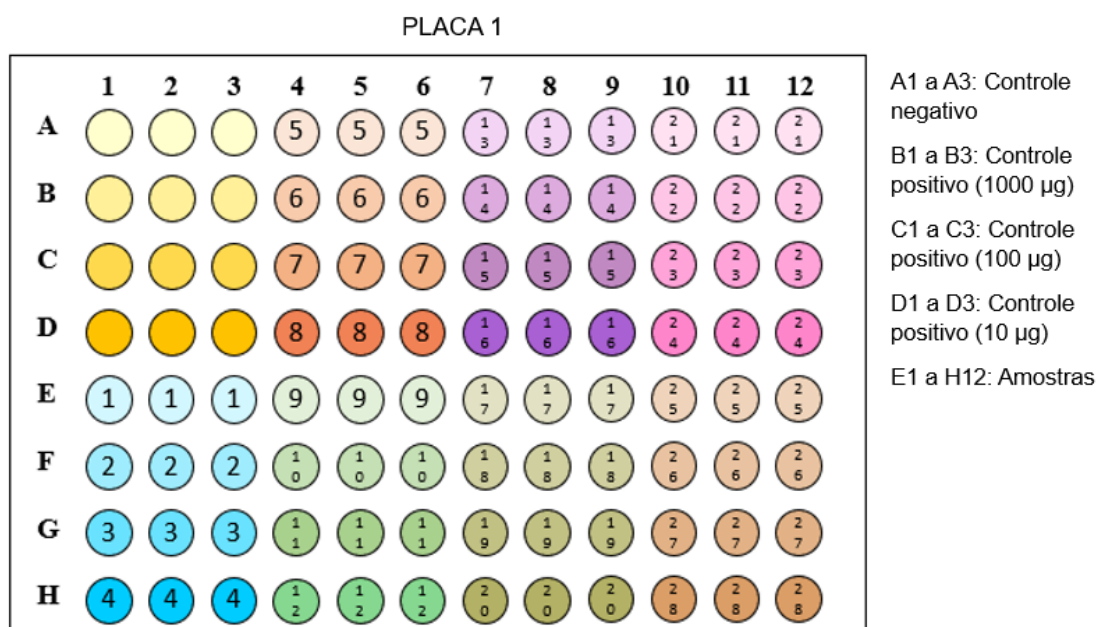
4.6.4 Diluição do antibiótico

Para o ensaio de atividade antibacteriana, foram utilizados controles positivos com antibiótico. Utilizou-se a amoxicilina, por ser um antibiótico de amplo espectro, com eficácia reconhecida, prescrito para o tratamento de diversas infecções. Sendo assim, foram pesados 100 mg do antibiótico proveniente de uma cápsula com 500 mg e em um tubo de polipropileno, foram diluídos os 100 mg de amoxicilina em 1 mL de etanol 99,3%. Em seguida realizou-se a diluição seriada de 1:10 μ L e 1:100 μ L em tubos cônicos de 1,5 mL, resultando em 3 tubos com diferentes concentrações do antibiótico para serem aplicados como controles positivos. Sendo, Tubo 1 (100 mg/mL), Tubo 2 (10 mg/mL) e o Tubo 3 (1 mg/mL). As quantidades finais de amoxicilina administradas de cada tubo por poço foram: 1000 μ g, 100 μ g e 10 μ g, respectivamente.

4.6.5 Montagem das microplacas

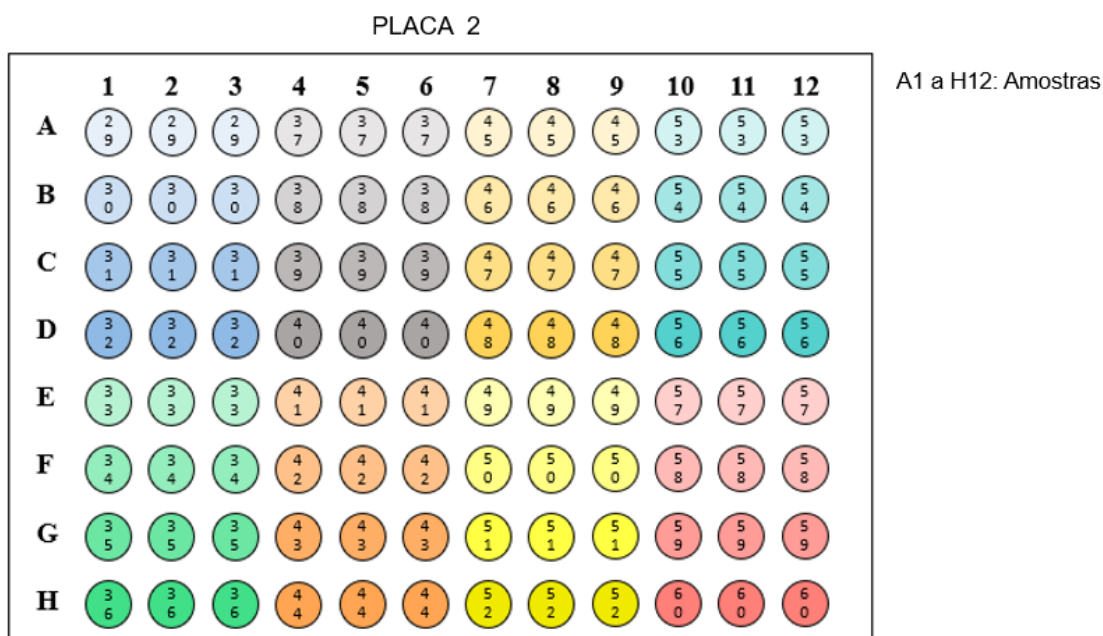
O ensaio foi realizado em triplicata, sendo assim foram utilizadas 3 microplacas com 96 poços, como o esquema mostrado nas Figuras 4, 5 e 6.

Figura 4 – Esquema da 1ª placa de 96 poços para o teste de sensibilidade aos extratos fúngicos



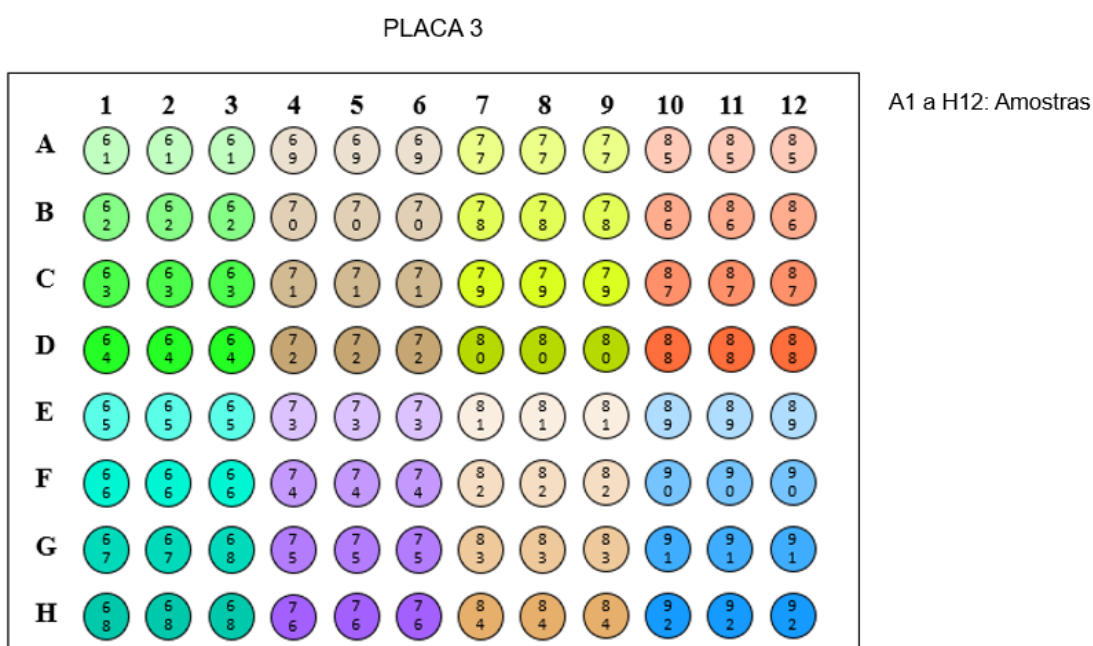
Fonte: Autora (2023).

Figura 5 – Esquema da 2ª placa de 96 poços para o teste de sensibilidade aos extratos fúngicos



Fonte: Autora (2023).

Figura 6 – Esquema da 3ª placa de 96 poços para o teste de sensibilidade aos extratos fúngicos



Fonte: Autora (2023).

O experimento foi montado incluindo o controle negativo, controles positivos com diluições seriadas de antibiótico e os tratamentos com 92 amostras de extratos fúngicos. O controle negativo, consistiu em poços que não receberam o tratamento experimental, tendo sido aplicado 10 µL de etanol 99,3%, uma vez que os extratos, como também o antibiótico, haviam sido diluídos em etanol. Dessa forma, utilizando-o como controle negativo pode-se avaliar e afirmar que a inibição do crescimento bacteriano não é decorrente da presença de álcool nas amostras, mas da ação dos tratamentos aplicados.

Para o controle negativo utilizou-se o caldo de batata, etanol e inóculo, já para os controles positivos foram utilizados o caldo, amoxicilina em diluição seriada e inóculo. Os poços nos quais foram testados os extratos fúngicos, foram adicionados o caldo, extratos fúngicos e o inóculo como especificado na Tabela 1.

Tabela 1 – Reagentes adicionados em cada poço de acordo com o tratamento aplicado

Tratamento	Placa/Poços	Reagentes Adicionados
Controle negativo	Placa 1/A1 a A3	Caldo de batata, álcool 99,3%, inóculo e resazurina 0,01%
Controles positivos	Placa 1/B1 a B3; C1 a C3; D1a D3	Caldo de batata, antibiótico em diluição seriada, inóculo e resazurina 0,01%
Extratos fúngicos	Placa 1/E1 a H12 Placa 2/ A1 a H12 Placa 3/ A1 a H12	Caldo de batata, extrato fúngico, inóculo e resazurina 0,01%

Fonte: Autora (2023).

Em câmara de fluxo laminar, as microplacas foram identificadas e logo após, preenchidas simultaneamente. A ordem de distribuição dos reagentes seguiu-se primeiro com a adição dos extratos contendo os metabólitos secundários, em sequência o meio de cultura, etanol, antibiótico em diluição seriada e subsequente ao preparo de todos os tratamentos foi adicionado o inóculo, essa distribuição ocorreu

respeitando as especificações da Tabela 1. As quantidades dos reagentes depositadas por poço constam na Tabela 2.

Tabela 2 – Quantidade dos reagentes utilizados no teste de sensibilidade antimicrobiana

Volume (µL)	Reagente
100	Caldo de batata
10	Extrato fúngico
10	Antibiótico
10	Álcool 99,3%
50	Inóculo
40	Resazurina 0,01%

Fonte: Autora (2023).

Após o preenchimento de todos os poços das placas, as mesmas foram envolvidas com plástico filme e incubadas na estufa a 35°C, por 20 h.

4.6.6 Preparo e adição da solução corante

Foi preparada 12 mL da solução corante com resazurina 0,01% diluída em solução salina a 0,9%.

Após o período de incubação, adicionou-se o revelador resazurina, de acordo com a Tabela 1, em todos os poços das microplacas e incubou-as novamente a 35°C, por 30 min (WIEGAND; HILPERT; HANCOCK, 2008).

4.6.7 Leitura das microplacas

A leitura das placas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Silva e colaboradores (2023) com adaptações. Após o período de reação do revelador, realizou-se a captura das imagens das microplacas utilizando um iPhone XR com sistema operacional iOS16.2 da Apple Inc., com câmera de 12 MP com abertura de $f/1,8$.

Foram utilizadas as mesmas configurações da câmera para captura das imagens das três placas. Os dados das imagens digitais foram convertidos em dados numéricos. Assim, foram obtidas estimativas colorimétricas da redução de revelador

para cada um dos poços das microplacas por meio do software ImageJ, aplicando o *plugin* ReadPlate3.0. Dessa maneira, pode-se analisar as imagens das microplacas automaticamente, pois esta ferramenta consegue medir a intensidade da cor nas imagens da microplaca de 96 poços e retornar os valores de absorvância corrigidos pelo branco de cada poço, com a aplicação dos filtros, vermelho, verde ou azul (RGB) (ANGELANI, 2018). Sendo que, para este ensaio foi utilizado filtro azul.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Considerando que o ensaio foi realizado em triplicata e em posse dos dados numéricos, foram efetuados os cálculos das médias aritméticas e desvios-padrões e variância das amostras no Excel®. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, por meio do software Statistica® e foi realizado teste de significância, a partir do teste de hipóteses no Excel®.

O teste de significância consistiu na comparação de duas médias por meio da equação da distribuição de Student, Equação 1, representada abaixo:

$$(\mu_A - \mu_B) = (\bar{x}_A - \bar{x}_B) \pm t_v s \sqrt{\frac{1}{N_A} + \frac{1}{N_B}} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo: μ_A = a média populacional do tratamento com o controle;

μ_B = média populacional do tratamento com o extrato;

\bar{x}_A = média amostral do controle;

\bar{x}_B = média amostral do extrato;

t_v = valor de t da distribuição de Student;

s = desvio-padrão obtido da estimativa conjunta para variância;

N_A = número de ensaios do tratamento com o controle;

N_B = número de ensaios do tratamento com os extratos.

A estimativa conjunta do desvio padrão de uma observação, s , foi obtida por meio do cálculo da média das variâncias das duas amostras, ponderadas pelos respectivos graus de liberdade por meio das Equações 2 e 3.

$$s^2 = \frac{(N_A - 1)s_A^2 + (N_B - 1)s_B^2}{(N_A - 1) + (N_B - 1)} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo: s^2 = variância amostral;

s_A^2 = variância do controle;

s_B^2 = variância do extrato.

$$v = (N_A - 1) + (N_B - 1) = N_A + N_B - 2 \quad (\text{Equação 3})$$

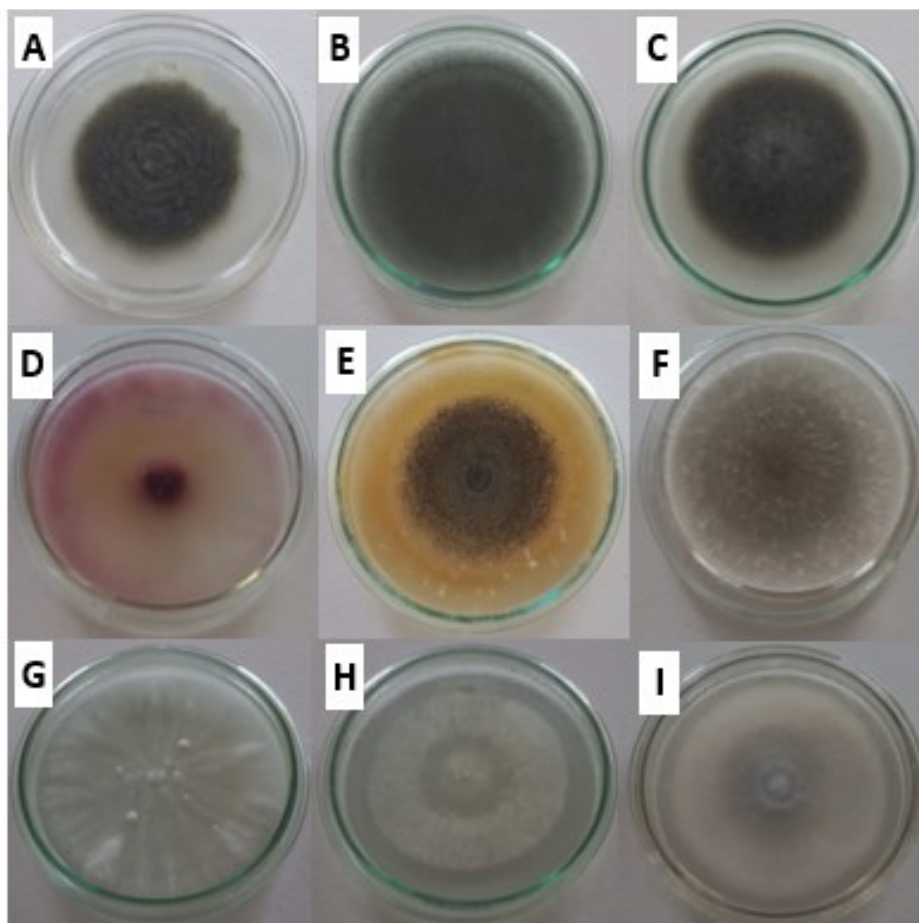
Sendo: v = número de graus de liberdade.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento dos Fungos Endófitos da *E. Tirucalli*

A coleção de fungos endofíticos isolados da *E. tirucalli* foi criada e constituída com 107 colônias puras obtidas a partir da inoculação dos galhos da espécie em meio de cultura BSA. A coleção é composta por fungos com diferentes fenótipos, como fungos com conídios de coloração branca, rosa, laranja, mas em sua maioria por colônias com conídios cor verde. Na Figura 7 estão representados diferentes fenótipos de fungos endofíticos encontrados no Avelós.

Figura 7 – Placas de Petri contendo colônias puras de fungos endófitos isolados da *E. tirucalli* com diferentes fenótipos e características morfológicas. (A) Colônia com coloração marrom e apresentando superfície verrucosa, (B) Colônia de cor verde e aveludada, (C) Colônia marrom, (D) Colônia com coloração rósea, (E) Colônia com coloração laranja e conídios pretos no centro, (F) Colônia marrom, (G) Colônia Branca com tonalidade marrom no centro, (H) Colônia com micélio branco e (I) Colônia branca e cinza no centro



Fonte: Acervo próprio (2023).

Figueiredo e colaboradores (2019) realizou o isolamento de 10 fungos endofíticos de espécimes de Avelós na cidade de Mossoró – RN, os quais foram submetidos a testes de atividade enzimática e revelou-se a capacidade de 8 fungos endófitos para a produção de amilase, destacando o potencial desses microrganismos, pouco explorados, como produtores de moléculas bioativas de interesse industrial.

Após a obtenção das colônias puras, houve a produção de conídios em meio BSA e posterior contagem em câmara de Neubauer. Os fungos apresentaram alta produção de conídios, sendo os fungos Et003, Et008, Et009, Et014 os melhores produtores. Apenas o fungo Et071, apresentou contagem de conídios abaixo de $1,0 \times 10^7$ em 1 mL de solução salina.

Dentre as 107 colônias isoladas, 92 foram submetidas ao teste de atividade antibacteriana, uma vez que a ocorrência de contaminações inviabilizou a utilização de alguns endófitos. Além disso, testar esse número de extratos fúngicos permitiu uma melhor adequação na montagem do ensaio de atividade antibiótica.

Nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 constam a média de conídios contabilizados nos quadrantes da câmara de Neubauer, a quantidade de conídios obtida para cada um dos fungos testados, bem como algumas características referentes a morfologia das colônias. Os resultados apresentados foram positivos e dentro do esperado, sendo assim possível aplicação nas etapas posteriores.

Tabela 3 – Contagem de conídios dos fungos endofíticos da *E. tirucalli* testados de Et001 a Et027, bem como a classificação quanto a coloração

Fungo	Coloração/características	Média	Fator de diluição	Nº de Conídios/mL
Et001	Verde, aveludada	431	10 ³	1,1x10 ⁹
Et002	Verde, aveludada	180	10 ⁴	4,5x10 ⁹
Et003	Verde, aveludada	832	10 ⁴	2,1x10 ¹⁰
Et004	Verde, aveludada	330	10 ⁴	8,3x10 ⁹
Et005	Verde, aveludada	788	10 ³	2,0x10 ⁹
Et006	Verde, aveludada	159	10 ⁴	4,0x10 ⁹
Et007	Verde, aveludada	117	10 ⁴	2,9x10 ⁹
Et008	Verde, aveludada	528	10 ⁴	1,3x10 ¹⁰
Et009	Verde, aveludada	953	10 ⁴	2,4x10 ¹⁰
Et010	Verde, aveludada	222	10 ⁴	5,6x10 ⁹
Et011	Verde, aveludada	96	10 ⁴	2,4x10 ⁹
Et012	Verde, aveludada	339	10 ³	8,5x10 ⁸
Et013	Verde, aveludada	200	10 ⁴	5,0x10 ⁹
Et014	Verde, aveludada	583	10 ⁴	1,5x10 ¹⁰
Et015	Verde, aveludada	504	10 ³	1,3x10 ⁹
Et016	Verde, aveludada	108	10 ³	2,7x10 ⁸
Et017	Verde, aveludada	191	10 ⁴	4,8x10 ⁹
Et018	Verde, aveludada	166	10 ⁴	4,2x10 ⁹
Et019	Verde, aveludada	112	10 ⁴	2,8x10 ⁹
Et020	Verde, aveludada	161	10 ⁴	4,0x10 ⁹
Et021	Verde, aveludada	189	10 ⁴	4,7x10 ⁹
Et022	Verde, aveludada	247	10 ⁴	6,2x10 ⁹
Et023	Verde, aveludada	40	10 ⁴	1,0x10 ⁹
Et024	Verde, aveludada	166	10 ⁴	4,2x10 ⁹
Et025	Verde, aveludada	22	10 ⁴	5,5x10 ⁸
Et026	Verde, aveludada	26	10 ⁴	6,5x10 ⁸
Et027	Verde, aveludada	66	10 ⁴	1,7x10 ⁹

Fonte: Autora (2023).

Tabela 4 – Contagem de conídios dos fungos endofíticos da *E. tirucalli* testados de Et028 a Et056, bem como a classificação quanto a coloração

Fungo	Coloração/características	Média	Fator de diluição	Nº de Conídios/mL
Et028	Verde, aveludada	44	10 ⁴	1,1x10 ⁹
Et029	Verde, aveludada	14	10 ⁴	3,5x10 ⁸
Et030	Verde, aveludada	123	10 ⁴	3,1x10 ⁹
Et031	Verde, aveludada	16	10 ⁴	4,0x10 ⁸
Et032	Verde, aveludada	9	10 ⁴	2,3x10 ⁸
Et033	Verde, aveludada	152	10 ⁴	3,8x10 ⁹
Et034	Verde, aveludada	33	10 ⁴	8,3x10 ⁸
Et035	Verde, aveludada	28	10 ⁴	7,0x10 ⁸
Et036	Verde, aveludada	50	10 ⁴	1,3x10 ⁹
Et037	Verde, aveludada	38	10 ⁴	9,5x10 ⁸
Et038	Verde, aveludada	53	10 ⁴	1,3x10 ⁹
Et039	Verde, aveludada	60	10 ⁴	1,5x10 ⁹
Et040	Verde, aveludada	18	10 ⁴	4,5x10 ⁸
Et041	Verde, aveludada	19	10 ⁴	4,8x10 ⁸
Et042	Verde, aveludada	99	10 ⁴	2,5x10 ⁹
Et043	Verde, aveludada	100	10 ⁴	2,5x10 ⁹
Et044	Verde, aveludada	87	10 ⁴	2,2x10 ⁹
Et045	Verde, aveludada	144	10 ⁴	3,6x10 ⁹
Et046	Verde, aveludada	45	10 ⁴	1,1x10 ⁹
Et047	Verde, aveludada	26	10 ⁴	6,5x10 ⁸
Et048	Verde, aveludada	47	10 ⁴	1,2x10 ⁹
Et051	Verde, aveludada	49	10 ⁴	1,2x10 ⁹
Et052	Verde, aveludada	97	10 ³	2,4x10 ⁸
Et053	Verde, aveludada	52	10 ³	1,3x10 ⁸
Et054	Verde, aveludada	16	10 ⁴	4,0x10 ⁸
Et055	Verde, aveludada	27	10 ⁴	6,8x10 ⁸
Et056	Verde, aveludada	50	10 ³	1,3x10 ⁸

Fonte: Autora (2023).

Tabela 5 – Contagem de conídios dos fungos endofíticos da *E. tirucalli* testados de Et057 a Et093, bem como a classificação quanto a coloração

Fungo	Coloração/características	Média	Fator de diluição	Nº de Conídios/mL
Et057	Verde, aveludada	84	10 ⁴	2,1x10 ⁹
Et058	Verde, aveludada	29	10 ⁴	7,3x10 ⁸
Et059	Preto	35	10 ⁴	8,8x10 ⁸
Et063	Verde, aveludada	103	10 ⁴	2,6x10 ⁹
Et066	Branco	5	10 ³	1,3x10 ⁷
Et068	Rosa	88	10 ⁴	2,2x10 ⁹
Et069	Marrom, aveludado	35	10 ⁴	8,8x10 ⁸
Et070	Branco, cinza no centro	167	10 ⁴	4,2x10 ⁹
Et071	Bege, umbilicado	22	10	5,5x10 ⁵
Et072	Verde, aveludado	46	10 ⁴	1,2x10 ⁹
Et073	Verde, aveludado	162	10 ⁴	4,1x10 ⁹
Et074	Branco	6	10 ⁴	1,5x10 ⁸
Et075	Verde, aveludado	11	10 ⁴	2,8x10 ⁸
Et076	Verde, aveludado	38	10 ⁴	9,5x10 ⁸
Et078	Verde, aveludado	23	10 ⁴	5,8x10 ⁸
Et079	Rosa	250	10 ⁴	6,3x10 ⁹
Et080	Verde, aveludado	94	10 ⁴	2,4x10 ⁹
Et081	Verde, aveludado	42	10 ⁴	1,1x10 ⁹
Et082	Verde, aveludado	25	10 ⁴	6,3x10 ⁸
Et084	Verde, aveludado	81	10 ⁴	2,0x10 ⁹
Et085	Branco	67	10 ⁴	1,7x10 ⁹
Et086	Verde, aveludado	301	10 ⁴	7,5x10 ⁹
Et088	Verde, aveludado	221	10 ⁴	5,5x10 ⁹
Et090	Verde, aveludado	364	10 ⁴	9,1x10 ⁹
Et091	Verde aveludada	215	10 ³	5,4x10 ⁸
Et092	Verde, aveludada	13	10 ⁴	3,3x10 ⁸
Et093	Verde, aveludada	71	10 ⁴	1,8x10 ⁹

Fonte: Autora (2023).

Tabela 6 – Contagem de conídios dos fungos endofíticos da *E. tirucalli* testados de Et094 a Et106, bem como a classificação quanto a coloração

Fungo	Coloração/características	Média	Fator de diluição	Nº de Conídios/mL
Et094	Verde, aveludada	70	10 ⁴	1,8x10 ⁹
Et095	Verde, aveludada	86	10 ⁴	2,2x10 ⁹
Et096	Verde, aveludada	191	10 ⁴	4,8x10 ⁹
Et097	Verde, aveludada	118	10 ⁴	3,0x10 ⁹
Et099	Branco	94	10 ⁴	2,4x10 ⁹
Et101	Verde, aveludado	97	10 ⁴	2,4x10 ⁹
Et102	Verde, aveludado	102	10 ⁴	2,6x10 ⁹
Et103	Verde, aveludado	147	10 ⁴	3,7x10 ⁹
Et104	Verde, aveludado	56	10 ⁴	1,4x10 ⁹
Et105	Verde, aveludado	93	10 ⁴	2,3x10 ⁹
Et106	Verde, aveludado	151	10 ⁴	3,8x10 ⁹

Fonte: Autora (2023).

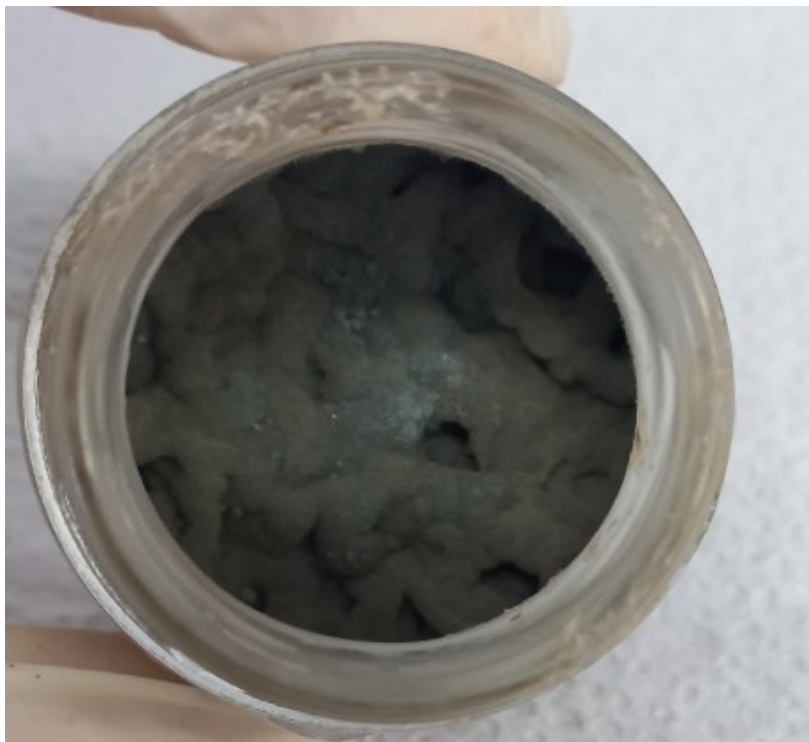
5.2 PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Para a produção dos metabólitos secundários, o inóculo foi padronizado de forma a obter um crescimento uniforme entre os fungos. Dessa maneira, foi possível avaliar e comparar a atividade dos extratos.

Foi semeado em meio de aveia 1 mL da solução de conídios, contendo 1x10⁷ conídios, com exceção do fungo Et071, o qual apresentou contagem dos conídios abaixo do esperado, neste caso, semeou-se a solução de conídios contendo 5,5x10⁵ conídios.

Durante o período de incubação os metabólitos secundários foram produzidos e após 7 dias extraídos com solvente orgânico. A Figura 8 apresenta o cultivo em meio de aveia antes da extração dos metabólitos.

Figura 8 – Cultivo de um dos fungos em meio de aveia após 7 dias de incubação



Fonte: Acervo próprio (2023).

5.3 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS EXTRATOS FÚNGICOS E LEITURA DAS PLACAS

As identificações do crescimento da bactéria basearam-se na utilização do revelador resazurina, comumente utilizado na contagem de células microbianas e em testes de susceptibilidade aos antibióticos, em especial quando há a utilização de microplacas com 96 poços.

Foi visto que após a reação da resazurina os poços das microplacas apresentaram coloração, rosa e azul características, mas com algumas variações de cor, fazendo-se necessário a utilização de ferramentas de análise colorimétrica.

Hsieh e colaboradores (2019) utilizaram um método baseado em resazurina para quantificar bactérias *E. coli* e *S. aureus* viáveis, bem como Kao e colaboradores (2019) usaram metodologia baseada em resazurina como indicador de crescimento microbiano para contagem de bactérias e Soriano (2017) realizou ensaios de microdiluição aplicando método colorimétrico com AlamarBlue® (resazurina) para avaliar o potencial antimicrobiano de compostos orgânicos e obteve resultados promissores com taxas de inibição acima de 90% para as bactérias gram-negativas

testadas. Ressaltando, assim, a ampla utilização desses métodos para determinar o crescimento de bactérias pela comunidade científica.

A leitura das placas foi realizada mediante análise de imagens registradas com smartphone, posteriormente analisadas no ImageJ, de forma em que foi possível coletar dados promissores para o ensaio aplicado.

O método utilizado neste trabalho é compartilhado pela comunidade científica, como Needs, Osborn, Edwards (2021) que utilizaram a imagem obtida a partir da câmera de um smartphone para fazer análise de viabilidade celular de bactérias com resazurina, os autores verificaram que as imagens capturadas foram suficientes para detectar o crescimento de bactérias tanto em ensaio colorimétrico quanto de fluorescência, sendo possível obter resultados em concordância com métodos de contagem de colônias em ágar.

As imagens foram submetidas ao ImageJ, que consiste em um programa de processamento de imagens, gratuito e de código aberto, bastante utilizado pela comunidade acadêmica e científica, como destacado por Schindelin e colaboradores (2015).

5.4 POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS SOBRE *E. COLI*

O potencial antibacteriano dos extratos foi testado sobre a *E. coli* por se tratar de uma bactéria gram-negativa e apresentar na estrutura de sua parede celular uma membrana externa que confere proteção contra antibióticos como penicilinas e cefalosporinas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Sendo assim, é possível descobrir novas moléculas com ação antibacteriana de amplo espectro.

Foram testados os extratos de 92 fungos endofíticos, dos quais 53 (57,6%) apresentaram leitura maior ou igual a média do controle com amoxicilina (100 µg) utilizada como limite positivo, ou seja, quase 60% dos extratos possuem atividade antibiótica semelhante a altas doses de amoxicilina, um antibiótico de amplo espectro utilizado em diversos tipos de infecções. Dessa forma, observa-se que quanto maior o valor da absorbância corrigida maior a atividade.

Nas Tabela 3, 4 e 5, encontram-se os valores relativos às médias de absorbância corrigidos dos extratos testados, como também dos controles e os desvios obtidos.

Tabela 7 – Médias e desvios-padrões relativos aos controles e aos fungos selecionados no ensaio de atividade antibiótica sobre *E. coli* de Et002 a Et043

Amostra	Absorbância corrigida	
	Média	Desvio-padrão
Controle Negativo	0,108	0,005
Controle Positivo (1000 µg)	0,162	0,021
Controle Positivo (100 µg)	0,125	0,017
Et002	0,131	0,008
Et003	0,200	0,034
Et004	0,196	0,039
Et005	0,165	0,005
Et008	0,187	0,052
Et009	0,199	0,052
Et010	0,179	0,040
Et011	0,166	0,020
Et012	0,211	0,063
Et013	0,184	0,030
Et014	0,125	0,020
Et016	0,203	0,022
Et018	0,188	0,016
Et020	0,185	0,041
Et024	0,140	0,016
Et025	0,127	0,024
Et032	0,182	0,068
Et033	0,201	0,006
Et034	0,158	0,041
Et036	0,136	0,009
Et041	0,133	0,063
Et042	0,266	0,115
Et043	0,146	0,010

Fonte: Autora (2023).

Tabela 8 – Médias e desvios-padrões relativos aos fungos selecionados no ensaio de atividade antibiótica sobre *E. coli* de Et044 a Et099

Amostra	Absorbância corrigida	
	Média	Desvio-padrão
Et044	0,135	0,028
Et052	0,127	0,019
Et053	0,137	0,014
Et054	0,240	0,002
Et055	0,149	0,014
Et057	0,168	0,011
Et059	0,465	0,351
Et063	0,225	0,033
Et066	0,166	0,042
Et068	0,488	0,057
Et069	0,230	0,046
Et071	0,143	0,026
Et073	0,127	0,020
Et075	0,177	0,014
Et076	0,138	0,013
Et084	0,180	0,026
Et086	0,248	0,078
Et091	0,167	0,045
Et092	0,228	0,075
Et093	0,167	0,040
Et094	0,140	0,050
Et095	0,166	0,066
Et096	0,224	0,019
Et097	0,166	0,024
Et099	0,219	0,021

Fonte: Autora (2023).

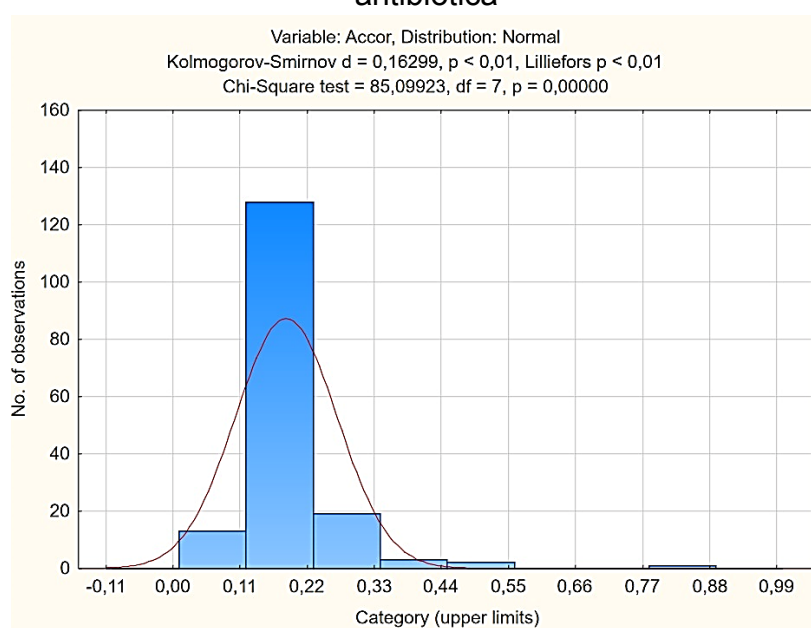
Tabela 9 – Médias e desvios-padrões relativos aos fungos selecionados no ensaio de atividade antibiótica sobre *E. coli* de Et102 a Et106

Amostra	Absorbância corrigida	
	Média	Desvio-padrão
Et102	0,179	0,022
Et103	0,125	0,004
Et104	0,233	0,004
Et105	0,204	0,011
Et106	0,196	0,029

Fonte: Autora (2023).

Desse modo, foi verificado se as médias referentes aos 53 fungos selecionados mostravam uma distribuição normal, ou seja, se a curva formada por este conjunto de dados se apresentava na forma de sino, mediante teste de normalidade realizado no software Statistica®. Ao observar a Figura 9, pode-se notar que os dados amostrais apresentam, com 95% de confiança, uma distribuição normal e, portanto, calculou-se a variância, bem como pôde-se realizar o teste de significância utilizando o Excel®.

Figura 9 – Teste de normalidade referente aos dados amostrais dos 53 fungos selecionados como potenciais produtores de metabólitos secundários com ação antibiótica



Fonte: Dado da pesquisa (2023).

O teste de significância foi realizado, para um nível de confiança de 95%, comparando as médias dos controles negativo, positivo (1000 µg) e positivo (100 µg) com as médias dos extratos fúngicos, visando avaliar se a presença dos extratos gerou um efeito sobre a bactéria.

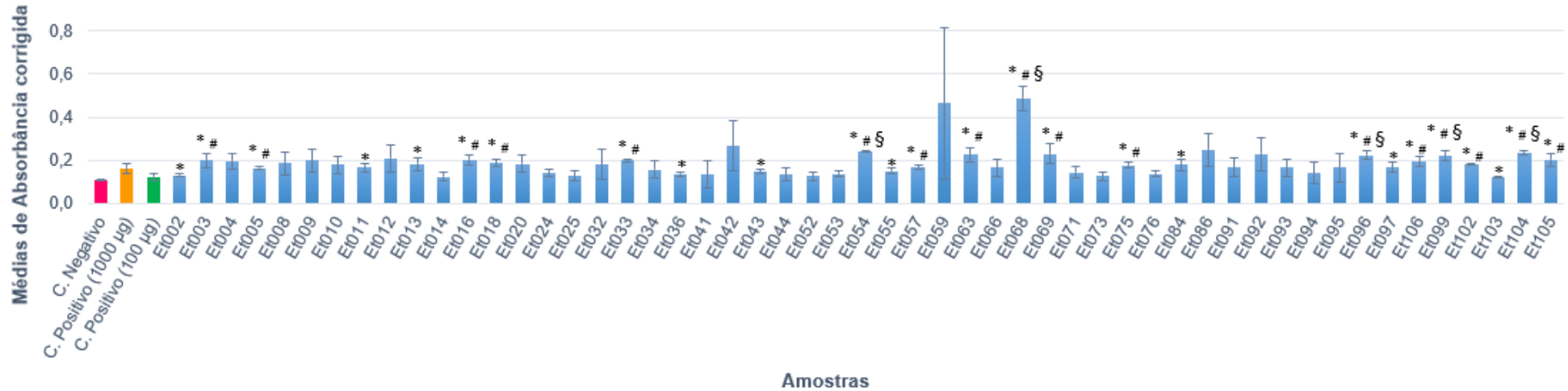
Por conseguinte, pode-se afirmar que neste nível de confiança, os extratos de 26 fungos endofíticos, indicados na Figura 10, apresentaram resultados estatisticamente significativos. Pois, 26 fungos apresentaram média diferente do controle negativo, dos quais 17 apresentaram resultados distintos do controle positivo (100 µg) e 5 mostraram resultados discrepantes da média do controle positivo (1000 µg). Portanto, para estes casos pode-se descartar a hipótese nula de que as médias populacionais são iguais e dessa forma, afirmar que tais fungos são produtores de metabólitos secundários com atividade antibiótica.

Logo, os fungos que manifestaram atividade antibiótica sobre *E. coli* representam 28,3% dos fungos endofíticos testados, sendo o percentual de fungos mais potentes em comparação ao efeito de amoxicilina (100 µg), igual a 18,5% e 5,43% têm resultados superiores quando comparados ao controle com amoxicilina (1000 µg).

O fungo Et103 apresentou o menor desempenho em comparação aos isolados com dados estatisticamente significativos, destacando-se o fungo Et068 que exibiu o resultado mais promissor, apresentando média 3,9 vezes superior que a média do controle positivo (100 µg) e 3,01 vezes maior que a média do controle utilizando 1000 µg do antibiótico.

A Figura 10, contém o gráfico de barras com as médias de absorbância corrigida e as linhas que representam os desvios, para os controles, como também para os 53 extratos fúngicos, são apresentados os dados estatisticamente significativos e não significativos.

Figura 10 – Atividade antibacteriana dos extratos fúngicos sobre *E. coli*. Gráfico de barras com linhas de desvio-padrão. (*) Médias diferentes em relação ao controle negativo; (#) Médias diferentes em relação ao controle positivo (100 µg); (§) Médias diferentes em relação ao controle positivo (1000 µg)



Fonte: Autora (2023).

Os fungos que habitam os tecidos internos de plantas, frequentemente tem sido alvo de estudos de bioprospecção de moléculas com propriedades farmacológicas. Alves e colaboradores (2020) também obtiveram resultados positivos ao isolar e testar cepas de *Aspergillus nidulans*, fungo endofítico proveniente da espécie *Jatropha curcas* ao analisar a atividade antioxidante.

Alves (2023) avaliou o potencial do metabólito secundário de fungos endofíticos, isolados de *Euterpe oleracea* para as atividades antitumoral e antibacteriana e obteve resultado semelhante para inibição de *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella sp.*

Moura (2020) obteve resultados diferentes em seu trabalho, no qual identificou 7 fungos endofíticos, isolados de diferentes plantas no Brasil, com atividade antimicrobiana sobre cepas de microrganismos patogênicos distintas. Um percentual de 14,3% do total de microrganismos testados. Dentre eles, apenas um apresentou inibição do crescimento de *E. coli*.

Todos esses estudos evidenciam que os microrganismos endofíticos de plantas medicinais são fontes propícias para a busca sempre crescente por novas moléculas com propriedades terapêuticas que possam vir a se tornar novos fármacos no futuro.

6 CONCLUSÃO

- Foram isoladas 107 colônias puras obtidas a partir da inoculação dos galhos da Avelós em meio de cultura BSA;
- 28,3% dos fungos testados apresentaram atividade antimicrobiana sobre *E. coli*;
- 18,5% mostraram-se mais potentes quando comparados com amoxicilina (100 µg);
- 5,43% apresentaram-se mais potentes em comparação com amoxicilina (1000 µg);
- O fungo Et068 manifestou maior potencial, apresentando média 3,9 vezes superior à média do controle com amoxicilina (100 µg) e 3,01 vezes maior que a média do controle com amoxicilina (1000 µg);
- Os metabólitos secundários dos fungos endofíticos isolados da *E. tirucalli* configuram-se como biomoléculas promissoras para a produção de antibióticos de novo espectro.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. R. Resistência bacteriana aos antimicrobianos: uma revisão das principais espécies envolvidas em processos infecciosos. **RBAC**, Rio de Janeiro, v. 54, n.1, 2021. DOI 10.21877/2448-3877.202102156. Disponível em: <<http://www.rbac.org.br/artigos/resistencia-bacteriana-aos-antimicrobianos-uma-revisao-das-principais-especies-envolvidas-em-processos-infecciosos/>>. Acesso em: 22 out. 2023.

ALVES, D. **Atividade antitumoral e antibacteriana de metabólitos secundários e fungos endofíticos isolados de *Euterpe oleracea* Mart.** Dissertação (Mestrado em Saúde do Adulto) – Universidade Federal do Maranhão, Maranhão, São Luís, 2023.

ALVES, D. R. et al. Atividade antioxidante, anticolinesterásica e citotóxica de metabólitos de fungos endofíticos. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.6, n.9, p.73684-73691. 2020. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/17558/14249>. Acesso em: 11 nov. 2023.

ALVES, E. M.; NEPOMUCENO, J. C. Avaliação do efeito anticarcinogênico do látex do avelós (*Euphorbia tirucalli*), por meio do teste para detecção de clones de tumor (warts) em *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, p. 125-140, dez. 2012.

ANGELANI, C. R. et al. A metabolic control analysis approach to introduce the study of systems in biochemistry the glycolytic pathway in the red blood cell. **Biochemistry and Molecular Biology Education**.v.46. p.502-515. 2018. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/17558/14249>. Acesso em: 11 nov. 2023.

Bacon, C.W. & White Jr., J.F. Microbial Endophytes. New York. Marcel Dekker. 2000.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V.S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, p. 679-688, 2009. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jqn/a/HsyhWNYtBScPvXCcDBtRkyP/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em 23 out. 2023.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. **Rev. Virtual Quim.**, Araraquara-SP, v. 5, n.3, p. 1-17, nov. de 2012. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/75343/2-s2.0-84880537758.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 29 out. 2023.

COSTA, L. S. **Estudo do uso do aveloz (*Euphorbia tirucalli*) no tratamento de doenças humanas:** uma revisão, 2011. Disponível em: <<http://dspace.bc.uepb.edu.br/jspui/bitstream/123456789/194/1/PDF%20-%20Luciana%20Sobrinha%20Costa.pdf>>. Acesso em 23 out. 2023.

FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos. Potencial para a produção de Substâncias Bioativas. **Fitos**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 1-7. jun. /set 2006. Disponível em: <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/43/pdf>. Acesso em: 29 out. 2023.

FIGUEIRÊDO, L. C. *et al.* Avaliação da produção de amilase em fungos endofíticos isolados de avelós (*Euphorbia tirucalli* L.). In: NETO, B.R.D. (Org) **Principais grupos e aplicações biotecnológicas dos fungos**. Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Bruno-Daquila/publication/336666691_AGRICULTURAL_SUSTAINABILITY_WITH_ENTOMOPATHOGENIC_FUNGI/links/5daae6de4585155e27f6e3cb/AGRICULTURAL-SUSTAINABILITY-WITH-ENTOMOPATHOGENIC-FUNGI.pdf. Acesso em: 11 nov. 2023.

HSIEH, K. *et al.* Simple and Precise Counting of Viable Bacteria by Resazurin Amplified Picoarray Detection. **Analytical Chemistry**. v. 90. n. 15, p. 9449–9456. Jul. 2018. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.analchem.8b02096>. Acesso: 14 nov. 2023.

KAO, Y. *et al.* Gravity-driven microfluidic assay for digital enumeration of bacteria and for antibiotic susceptibility testing. **Lebo on a chip**. v.20 n.1, p. 54-63. 2020.

LIMA, C.C.; BENJAMIN, S. C. C.; SANTOS, R. F. S. Mecanismo de resistência bacteriana frente aos fármacos: uma revisão. **CuidArte Enfermagem**, Catanduva, p. 105-113. jan. 2017. Disponível em: http://www.webfipa.net/facfipa/ner/sumarios/cuidarte/2017v1/15%20Artigo_Mecanismo%20resist%C3%Aancia%20bacteriana%20a%20antibi%C3%B3ticos_27-07-17.pdf. Acesso em: 22 out. 2023.

LÓCIO, C. J. F. **Avaliação das atividades antibiótica e antiparasitária de metabólitos secundários de fungos endofíticos da *Anadenanthera macrocarpa***, 2019. Disponível em: <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/bitstream/riufcg/6772/1/CAMILA%20JOYCE%20FERREIRA%20DE%20L%20C%20%93CIO%20-%20TCC%20ENG.%20DE%20BIOTECNOLOGIA%20E%20BIOPROCESSOS%202019.pdf>. Acesso em: 22 out. 2023.

MELO, I. S. **Endofíticos**, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agricultura-e-meio-ambiente/manejo/recursos-geneticos/endofiticos>. Acesso em: 24 out. 2023.

MOURA, S. T. **Avaliação da atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas no Brasil contra patógenos humanos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, Florianópolis, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/216699/PBTC0313-D.pdf?sequence=-1&isAllowed=y>. Acesso em: 14 nov. 2023.

NASCIMENTO, V. P.; PAZ, K. F.; LIMA, R. A. Avaliação dos efeitos encontrados pelo uso de *Euphorbia tirucalli* L. (Euphobiaceae) no tratamento contra o câncer. **Revista EDUCamazônia**, v. 15, n. 2, p. 346-358. jul/dez. 2020.

NEEDS, S.H; OSBORN, H. M.I; EDWARDS, A.D. Counting bacteria in microfluidic devices: Smartphone compatible 'dip-and-test' viable cell quantitation using resazurin amplified detection in microliter capillary arrays. **Journal of Microbiological Methods**. v.187. p. 106199. ago. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701221000671?via%3Dihub#preview-section-cited-by>. Acesso em: 13 nov. 2023.

OLIVEIRA, J. A. C. **Semissíntese de compostos bioativos a partir de naturais produtos**: obtenção de derivados da estemodina, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/61962/3/2021_dis_jacoliveira.pdf>. Acesso em 23 out. 2023.

PARCERIA GLOBAL DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE ANTIBIÓTICOS. **Antibiotic resistance response**. 2022. Disponível em: https://gardp.org/what-we-do/antibiotic-resistance/?gclid=Cj0KCCQjw48OaBhDWARIsAMd966BColr5UgX-IY3N9vPrvjUV98TXhNPcVRNEOZVhBKQUqaNX37YcpcoaAsyqEALw_wcB. Acesso em: 22 out. 2023.

PRATES, F. I. F. *et al.* Agravos provocados pela resistência bacteriana: um problema de saúde pública mundial. **BJSCR**, Belo Horizonte, v.32, n.2, p. 131-138. set. 2020. Disponível em: <https://www.mastereditora.com.br/periodico/20201004_093315.pdf>. Acesso em: 22 out. 2023.

RIBEIRO, E. A.; MARIANO, T. K.; PEREIRA, V. M.; SUGAWARA, A. M. Aveloz – *Euphorbia tirucalli*: Toxicidade da planta. *Brazilian Journal of Natural Sciences*, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 17, 2019. DOI: 10.31415/bjns. v2i1.49. Disponível em: <https://bjns.com.br/index.php/BJNS/article/view/49>. Acesso em: 13 nov. 2023.

RODRIGUES, A. R. M. **Produtos Naturais na Descoberta de Fármacos**, 2018. Disponível em: <https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/6660/1/PPG_%2032022.pdf>. Acesso em 23 out. 2023.

SANTOS, O. J. *et al.* Avaliação do uso do extrato bruto de *Euphorbia tirucalli* na inibição do tumor ascítico de ehrlich. **Rev. Col. Bras. Cir**, 2016. DOI 10.1590/0100-69912016001005. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rcbc/a/6d46hSkFGJGRFmrFG9jLYmd/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em 23 out. 2023.

SHINDELIN, J. *et al.* The ImageJ Ecosystem: An Open Platform for Biomedical Image Analysis. **Molecular Reproduction & Development** v. 82. P. 518–529. 2015.

SILVA, K. R. **Influência da fonte de carbono na produção de pigmento por *Talaromyces minioluteus***. 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/24703/3/InfluenciaFonteCarbono.pdf>. Acesso em: 14 nov.2023.

SILVA, T. C. *et al.* An Accurate, Affordable, and Precise Resazurin-Based Digital Imaging Colorimetric Assay for the Assessment of Fungicide Sensitivity Status of Fungal Populations. **Agronomy** 2023, 13, 343. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/13/2/343>. Acesso em: 18 jul. 2023

SOUZA, F. A. **Processos fermentativos em resíduos agroindustriais utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* QU69**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Paraná, Laranjeiras do Sul, 2018.

SORIANO, B. **Avaliação do potencial antimicrobiano e leshimanicida de materiais orgânicos derivados da base de Schiff N-N-BIS' (Salicilideno) – 1,2-Fenilenodiamina**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, São Carlos, 2017.

SPECIAN, V. *et al.* Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Review**, PR, Brasil, p. 1-8, jan/mar 2014.

THEODORO, P. I. L. **Análise da produção de metabólitos secundários por fungos endofíticos da *Aloe vera***. 2022. Disponível em: <<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/bitstream/riufcg/24998/1/PAULO%20ITAGINO%20LOPES%20THEODORO%20-%20TCC%20ENG.%20DE%20BIOTECNOLOGIA%20E%20BIOPROCESSOS%20CDSA%202022.pdf>>. Acesso em 24 out. 2023.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed. 2017.

VALE, V.V.; ORLANDA, J. F. F. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). **Scientia Plena**, Imperatriz, v.7, n.4, 2011. Disponível em: <<https://scientiaplenua.org.br/sp/article/view/341/133>>. Acesso em 23 out. 2023.

VIANA, A. R. *et al.* Produtos bioativos na prevenção e no tratamento do câncer, em especial o melanoma. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 18, n. 3, p. 511-528, 2017. Disponível em: <<https://periodicos.ufrn.edu.br/index.php/disciplinarumS/article/viewFile/2388/2099>>. Acesso em 22 out. 2023.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3, 163–175 (2008). <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>