

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

**ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS OBTIDOS DE
PLANTAS DA CAATINGA, CARACTERIZAÇÃO DOS SEUS
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME**

DAYSE PEREIRA DIAS SILVA

PORTO ALEGRE, 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS OBTIDOS DE
PLANTAS DA CAATINGA, CARACTERIZAÇÃO DOS SEUS
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME**

Tese apresentada por **Dayse Pereira
Dias Silva** para obtenção do TÍTULO
DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Porto Alegre, 2023

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28, fevereiro, 2023 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Danielle da Silva Trentin

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Dayse Pereira Dias
ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS OBTIDOS DE
PLANTAS DA CAATINGA, CARACTERIZAÇÃO DOS SEUS
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME / Dayse Pereira Dias
Silva. -- 2023.
244 f.
Orientador: Alexandre José Macedo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2023.

1. Caatinga. 2. Produtos naturais. 3. Metabólitos
secundários. 4. Fungos endofíticos. 5. Biofilmes
bacterianos. I. Macedo, Alexandre José, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido (durante a pandemia da COVID-19) nos laboratórios de Pesquisa de Tecnologia Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e no Laboratório de Biofilmes e Biodiversidade Microbiana do Centro de Biotecnologia da UFRGS

Durante todo o trabalho foi recebido bolsa de estudos da Capes.

Dedico este trabalho aos meus pais, Eliane e José Florêncio, meu irmão Douglas e sobrinho Enzo e ao meu noivo Rodrigo Molina, obrigada por todo apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter chegado até aqui e por alcançar mais esse objetivo.

Ao meu querido orientador, prof. Dr. Alexandre José Macedo, que desde o nosso primeiro contato sempre foi muito receptivo e gentil. Obrigada pela confiança de encarar esse projeto, pelos ensinamentos e oportunidades.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo programa de excelência e oportunidade concedida para a conclusão desta tese.

Ao Centro de Biotecnologia, campus do Vale, por toda estrutura. Lugar este que foi a minha segunda casa durante esses mais de 4 anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Ao Instituto Nacional do Semiárido (INSA), por todo apoio e suporte técnico para a realização das coletas realizadas neste trabalho.

Aos colaboradores e coautorias deste trabalho, pelo comprometimento e apoio.

À prof. Dra. Tiana Tasca por ser essa pessoa tão querida, empática e de energia incrível. Obrigada por todo apoio e ensinamentos.

Ao Laboratório de Peptidases e Enzimas Proteolíticas do centro de biotecnologia, na pessoa do prof. Dr. Carlos Termignoni por permitir acesso a estrutura e equipamentos do seu laboratório.

Ao laboratório de Bacteriologia e Modelos Experimentais Alternativos (BACMEA), na pessoa da Danielle Trentin e suas alunas, pelo suporte nos momentos em que precisamos de bactérias e larvas.

Aos meus queridos e amados colegas do Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana (LabDiM), Deisiane Fernanda, Fernanda Veiga, Flávia Brust, Nicole

Sartori e Rodrigo Campos, pela amizade, companheirismo, parceria, conselhos, cafés e boas risadas. Cada um de vocês fizeram muita diferença no meu amadurecimento profissional e na construção deste trabalho, levarei a amizade de vocês além do laboratório. A todos que já passaram pelo laboratório e que não estão mais presentes, mas que contribuíram de alguma forma e estiveram presentes nesta etapa da minha vida.

Ao grupo do Laboratório de Parasitologia, em especial aos meus queridos amigos, Fernanda Gomes, Graziella Rigo e Saulo Almeida, obrigada pela amizade construída e parceria sem igual. Eu sempre digo que a chegada de vocês ao laboratório foi uma das melhores coisas que aconteceu.

Às minhas amigas da graduação, Bruna Riviane, Camila Barbosa, Jucilene Pereira, Raíssa Mayane, Rayza Cavalcante e Rhyanne Freitas, que mesmo após longos anos a nossa amizade permanece, obrigada por acompanharem a minha trajetória e sempre torcerem pelo meu sucesso.

À minha família paterna e materna por sempre torcerem e incentivarem os meus objetivos.

À minha segunda família aqui no Sul, Maria Alice Molina, Miguel Molina, Gabrielle Molina, Rafael Molina, Tanise Pinheiro e ao pequeno Arthur, por serem suporte, acolhimento familiar, momentos de descontração e amor. Sem vocês toda a minha adaptação em um lugar novo teria sido muito mais difícil, sou eternamente grata.

Aos meus pais, Eliane e José Florêncio, não consigo expressar a minha gratidão em poucas palavras, por todo amor incondicional, por todo apoio para a concretização deste sonho, por todo incentivo que me deram durante este período e que até hoje ainda dão, por compreenderem a minha ausência, afinal é uma distância absurda a ser encarada.

Ao meu noivo, Rodrigo Molina, por todo amor, suporte, incentivo, paciência e por compreender essa jornada louca que é a pós-graduação. A minha passagem por

Porto Alegre foi mais leve porque tu estiveste ao meu lado. A nossa Zoe que trouxe mais alegrias a casa com seus “lambeijos”.

Ao meu irmão, cunhada e sobrinho, Douglas, Danielle e Enzo, por todo amor, carinho e incentivo, por compreenderem a distância e mesmo assim se fazerem presentes através de vídeos do meu amado Enzo.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A crescente resistência microbiana tem contribuído para um aumento na busca global por novos agentes antimicrobianos. O impacto gerado pela resistência microbiana tem ocasionado um aumento nos custos com a saúde, além de elevar as taxas de mortes. Os biofilmes bacterianos são responsáveis pelo agravamento em diversas doenças e estão associados a diversas infecções hospitalares. *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* estão presentes em infecções hospitalares comprometendo significativamente a condição dos pacientes acometidos por doenças como fibrose cística, pneumonia além de infectarem dispositivos médicos. Diante disso, este trabalho objetivou isolar e identificar microrganismos endofíticos da Caatinga, caracterizar seus metabólitos e avaliar a capacidade destas moléculas de atuarem contra os biofilmes de patógenos de importância médica. Um modelo de biofilme foi utilizado para avaliar a inibição e erradicação do biofilme de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A caracterização das moléculas foi realizada por UPLC-MS/MS. As moléculas tiveram a sua toxicidade avaliadas pelo modelo de larvas *Galleria mellonella*. A identificação dos microrganismos endofíticos isolados foi realizada por técnicas de biologia molecular. Como resultado, a coleta dos microrganismos resultou no isolamento de 69 endofíticos sendo em sua maioria pertencentes a família Aspergilaceae. Dois endofíticos isolados, *Alternaria burnsii* e *Penicillium chermesinum*, tiveram seus extratos fracionados em colunas de C18 e apresentaram frações ativas para atividade antibiótica e Antibiofilme contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. O extrato metanólico de micélio do endofítico *A. burnsii* apresentou toxicidade na concentração de 100 mg/Kg, mas não em 50 mg/Kg, enquanto seu extrato de acetato de etila não foi tóxico na concentração de 100 mg/Kg. As frações do extrato de micélio e o extrato de acetato de etila do endofítico *P. chermesinum* apresentaram toxicidade em ambas as concentrações avaliadas (100 mg/Kg e 50 mg/Kg). De acordo com os resultados obtidos demonstramos a biodiversidade de endofíticos presentes em plantas da Caatinga, bem como ressaltamos o potencial desse bioma em produzir moléculas bioativas na inibição do biofilme de importantes bactérias patogênicas. Além disso, este trabalho também trouxe pela

primeira vez o relato de moléculas que até então não haviam sido reportadas em espécies de *A. burnsii* bem como demonstramos pela primeira vez as atividades antibiofilme destas moléculas.

Palavras - chave: Caatinga, produtos naturais, microrganismos endofíticos, fungos endofíticos, metabólitos secundários, biofilmes bacterianos.

ABSTRACT

Growing microbial resistance has contributed to an increase in the global search for new antimicrobial agents. The impact generated by microbial resistance has impacted and increased health costs, in addition to increasing death rates. Bacterial biofilms are responsible for the aggravation of several diseases and are associated with several nosocomial infections. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are present in hospital infections, significantly compromising the condition of patients affected by diseases such as cystic fibrosis and pneumonia, in addition to being present in medical devices. Therefore, this work aimed to isolate and identify endophytic microorganisms from the Caatinga, characterize their metabolites and evaluate the ability of these molecules to act against biofilms of pathogens of medical importance. A biofilm model was used to evaluate biofilm inhibition and eradication of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The characterization of the molecules was performed by UPLC-MS/MS. The molecules had their toxicity evaluated by the model of *Galleria mellonella* larvae. The identification of isolated endophytic microorganisms was performed using molecular biology techniques. As a result, the collection of microorganisms resulted in the isolation of 69 endophytes, most of which belong to the Aspergilaceae family. Two isolated endophytes, *Alternaria burnsii* and *Penicillium chermesinum*, had their extracts fractionated on C18 columns and showed active fractions for antibiotic activity and antibiofilm against *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The methanolic extract of mycelium from the endophytic *A. burnsii* showed toxicity at a concentration of 100 mg/Kg, but not at 50 mg/Kg, while its ethyl acetate extract was not toxic at a concentration of 100 mg/Kg. The fractions of the mycelium extract and the ethyl acetate extract of *P. chermesinum* showed toxicity in the larval models at both evaluated concentrations (100 mg/Kg and 50 mg/Kg). According to the results obtained, we demonstrated the biodiversity of endophytes present in Caatinga plants, as well as highlighting the potential of this biome to produce bioactive molecules to inhibit the biofilm of important pathogenic bacteria. In addition, this work also brought for the first time the report of molecules that until then had not

been reported in *A. burnsii* species, as well as demonstrated for the first time the antibiofilm activities of these molecules.

Keywords: Caatinga, natural products, endophytic microorganisms, fungal endophytic, secondary metabolites, bacterial biofilms.

LISTA DE FIGURAS

Revisão do tema

Figura 1: Esquema dos estágios de formação de um biofilme.....40

Figura 2: Mapa do recorte do semiárido brasileiro – Bioma Caatinga.....46

Capítulo 1:

Figure 1: Mechanisms of action antimicrobial.....67

Figure 2: General graphic of the fungal endophytic genera surveyed in this review.....98

Figure 3: Number of compounds actives derivatives of fungal endophytic contemplated in this review.....99

Figure 4: Major chemical classes with the lowest MIC values against gram-negative bacteria.....100

Capítulo 2:

Figura 1: Esquema da obtenção dos metabólitos secundários114

Figura 2: Microrganismos endofíticos isolados de plantas da Caatinga.119

Figura 3: Árvore filogenética de microrganismos endofíticos isolados de plantas da Caatinga.....121

Figura 4: Análise antibiótica e antibiofilme dos extratos brutos de acetato de etila testados contra *S. aureus* Newman.....124

Figura 5: Análise antibiótica e antibiofilme dos extratos brutos de acetato de etila testados contra *P. aeruginosa*125

Figura 6: Análise antibiótica e antif formação de biofilme dos extratos de micélio testados contra *S. aureus* Newman.....126

Figura 7: Análise antibiótica e antif formação de biofilme dos extratos de micélio testados contra *P. aeruginosa*.....127

Figura 8: Análise antibiótica e antif formação de biofilme das fases aquosas testados contra *S. aureus* Newman..... 128

Figura 9: Análise antibiótica e antif formação de biofilme das fases aquosas testados contra *P. aeruginosa*.....129

Figura 10: Análise antibiótica e antif formação de biofilme das fases metanólicas e hexânicas testados contra *S aureus* Newman130

Figura 11: Análise antibiótica e antif formação de biofilme das fases metanólicas e hexânicas testados.....131

Capítulo 3:

Figure 1: Antibiotic and antibiofilm activity of ethyl acetate extracts and mycelium (100 µg/ml) against (A) *S. aureus* Newman and (B) *P. aeruginosa*...149

Figure 2: Toxicological evaluation of the (A) mycelium and (B) EBACOEt crude extract and enriched fractions of *Alternaria burnsii* using the survival curve in models of *Galleria mellonella* at the concentration of 100 mg/Kg.....152

Figure 3: Toxicological evaluation of the mycelium enriched fractions of *Alternaria burnsii* using the survival curve in models of *Galleria mellonella* at the concentration of 50 mg/Kg.154

Figure 4: Molecular network and molecules annotated from the MS/MS spectra detected from fractions of *Alternaria* sp. mycelium extract.....155

Figure 5: Analysis of key molecules identified as top BCC for *S. aureus* Newman antibiotic activity.....165

Figure 6: Phylogenetic tree of an endophytic species collected from the Caatinga obtained by the Neighbor-joining method.....167

Capítulo 4:

Figure 1: Antibiotic and antibiofilm activity of ethyl acetate extracts and mycelium against *S. aureus* Newman (A) and *P. aeruginosa* (B).....190

Figure 2: Antibiotic and antibiofilm activity of fractions obtained from the C18 cartridge of EBACOEt from *P. chermesinum* against *S. aureus* Newman.191

Figure 3: Antibiotic and antibiofilm activity of fractions obtained from the C18 cartridge of mycelium from <i>P. chermesinum</i> against <i>S. aureus</i> Newman	193
Figure 4: Antibiotic and antibiofilm activity of fractions obtained from the C18 cartridge of EBAcOEt from <i>P. chermesinum</i> against <i>P. aeruginosa</i>	195
Figure 5: Antibiotic and antibiofilm activity of fractions obtained from the C18 cartridge of mycelium from <i>P. chermesinum</i> against <i>P. aeruginosa</i>	196
Figure 6: Biofilm eradication activity of fractions obtained from the C18 cartridge of EBAcOEt from <i>P. chermesinum</i> against <i>S. aureus</i> Newman.....	197
Figure 7: Biofilm eradication activity of fractions obtained from the C18 cartridge of mycelium from <i>P. chermesinum</i> against <i>S. aureus</i> Newman.....	198
Figure 8: Biofilm eradication activity of fractions obtained from the C18 cartridge of mycelium from <i>P. chermesinum</i> against <i>P. aeruginosa</i>	199
Figure 9: Biofilm eradication activity of fractions obtained from the C18 cartridge of mycelium from <i>P. chermesinum</i> against <i>P. aeruginosa</i>	199
Figure 10: Phylogenetic tree of an endophytic species collected from the Caatinga obtained by theNeighbor-joining method.....	200
Figure 11: toxicological evaluation of the extract EBAcOEt of <i>P. chermesinum</i> from the survival curve in models of <i>Galleria mellonella</i> in the concentration of 100 mg/Kg.....	201
Figure 12: toxicological evaluation of the extract of mycelium of <i>P. chermesinum</i> from the survival curve in models of <i>Galleria mellonella</i> in the concentration of 100 mg/Kg.....	202
Figure 13: toxicological evaluation of the extract of mycelium of <i>P. chermesinum</i> from the survival curve in models of <i>Galleria mellonella</i> in the concentration of 50 mg/Kg.....	203

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1:

Table 1: Molecules isolated from endophytic fungi with antibacterial activity against gram negative species.....69

Table 2: MIC values of the main commercially known antimicrobial agents.....100

Capítulo 2:

Tabela 1: Panorama geral da quantidade de microrganismos endofíticos isolados.....117

Tabela 2: Rendimento dos extratos brutos de acetato de etila e micélio.....123

Capítulo 3:

Table 1: Antibiotic and antibiofilm activities of the enriched fractions of the mycelium and EBAcOEt extracts prepared from *Alternaria burnsii*151

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	28
REVISÃO DO TEMA	33
Resistência microbiana e seus impactos	35
Biofilmes bacterianos	36
<i>Staphylococcus aureus</i>	40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
Produtos naturais como fonte terapêutica	42
Bioma Caatinga	45
Microrganismos endofíticos	52
OBJETIVOS	57
Objetivo geral	59
Objetivos específicos	59
CAPÍTULO 1: Silva, Dayse Pereira Dias; Cardoso, Macley Silva; Macedo, Alexandre José. Endophytic fungi as a source of antibacterial compounds - a focus on gram-negative bacteria. Antibiotics.....	60
CAPÍTULO 2: Microrganismos endofíticos isolados da Caatinga e avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme dos extratos brutos	108
CAPÍTULO 3: Silva, Dayse Pereira Dias; Da Rosa, Deisiane Fernanda; De Felício, Rafael; Trivella, Daniela Barretto Barbosa; Landell, Melissa Fontes; Macedo, Alexandre José. Chemical characterization of secondary metabolites of the endophytic <i>Alternaria burnsii</i> isolated from the Brazilian Caatinga. Manuscrito a ser submetido.	135
CAPÍTULO 4: Silva, Dayse Pereira Dias; Da Rosa, Deisiane Fernanda; De Felício, Rafael; Trivella, Daniela Barretto Barbosa; Landell, Melissa Fontes; Macedo, Alexandre José. Chemical characterization of secondary metabolites of <i>Penicillium chermesinum</i> isolated from <i>Commiphora leptophloeos</i> (Mart.) J.B. Gillett (Burceraceae) (Umburana) from Caatinga. Manuscrito a ser submetido.	181
DISCUSSÃO GERAL	181
CONCLUSÕES	216

PERSPECTIVAS	220
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	224
ANEXOS	237
Anexo 1: Material suplementar referente ao capítulo 3	244

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta inicial da penicilina por Flemming em 1929, a busca por moléculas bioativas obtidas de produtos naturais aumentou significativamente com o passar dos anos, sendo que cerca de 48% dos medicamentos antibacterianos aprovados são derivados dos produtos naturais e 26% são totalmente sintéticos (NEWMAN e CRAGG, 2020). Os produtos naturais são fontes medicamentosas desde muito tempo atrás, um dos primeiros relatos de uso de plantas medicinais pelo homem foi relatado no papiro de Ebers que descreve cerca de 100 doenças e seus tratamentos a partir de drogas vegetais e animais (PINTO *et al.*, 2002). Desta forma eles fazem parte da cultura popular como opção aos tratamentos para diversas doenças (HARVEY, 2000; NOBRE-JUNIOR, 2005).

Os microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior dos vegetais, sendo um grupo de microrganismos pouco estudados e que se apresentam como fontes naturais promissoras na busca por moléculas com potencial bioativo contra diversos alvos, entre eles está a busca por compostos ativos contra bactérias patogênicas de importância médica (CHAPLA, 2010). A resistência microbiana vem preocupando cada vez mais o mundo inteiro por dois motivos principais: (i) pelo elevado número de mortes causadas por infecções microbianas e o impacto que esta resistência causa em doenças e (ii) pelos custos que geram para o setor da saúde (OMS, 2014). A busca urgente por moléculas antimicrobianas é motivada por essa crescente resistência bacteriana que aumenta com o passar dos anos e que preocupa a comunidade pois caso nenhuma solução for encontrada estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas serão mortas até 2050 (O'NEILL, 2016).

Neste mesmo sentido, os biofilmes bacterianos estão envolvidos em diversas doenças crônicas e são formados pelos microrganismos como forma de proteção contra agentes terapêuticos, como por exemplo os antibióticos (DAVIES, 2003). *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são dois exemplos de microrganismos bem conhecidos na comunidade clínica por causarem infecções hospitalares de difícil tratamento e que são formadoras de biofilme (JUSKO *et al.*, 2014; GOMEZ e PRINCE, 2007).

Neste trabalho metabólitos secundários obtidos de microrganismos endofíticos isolados de plantas do bioma Caatinga foram avaliados quanto a sua capacidade antibiótica e antibiofilme de *S. aureus* Newman e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Os microrganismos endofíticos por estarem inseridos em um bioma pouco explorado com características diferenciadas dos demais biomas brasileiros (SOUZA, 2015), fazem deles fontes promissoras na busca por moléculas com atividade antimicrobiana e antibiofilme.

REVISÃO DO TEMA

Resistência microbiana e seus impactos

Anos após a descoberta da penicilina em 1929, surgiram os primeiros microrganismos resistentes aos antibióticos por volta da década de 40, mudando então todo o cenário de segurança oferecida por eles na época e demonstrando assim a incrível capacidade de adaptação destes microrganismos quando expostos a agentes antimicrobianos (LEVY e MARSHAL, 2004). Um exemplo é *Streptococcus pyrogenes* resistente ao primeiro fármaco sulfonamida denominado “Prontosil”, tal resistência se deu logo após o desenvolvimento do fármaco em 1930 que surgiu como solução para o tratamento contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (LEVY, 1982).

Estima-se que a rápida resistência microbiana se deve em parte a pressão seletiva causada pelo uso abusivo dos antimicrobianos, como por exemplo o uso na agricultura para promover o rápido crescimento animal e atender as necessidades da alimentação humana (SPELLBERG *et al.*, 2008). Porém é preciso levar em consideração a vertente de que a resistência aos antibióticos é um fenômeno natural que ocorre há muitos anos e que antecede a pressão seletiva exercida pelos antibióticos usados na clínica. Essa ideia é reforçada na premissa de que genes de microrganismos anteriores a era dos antibióticos analisados por metagenômica codificam resistência a classes de alguns antibióticos como β -lactâmicos, glicopeptídeos e tetraciclina. Além de apresentarem estratégias para evasão de fármacos como, por exemplo, modificações de alvos, inativação de fármacos enzimáticos e proteção de alvos (D’COSTA *et al.*, 2011). Esses genes de resistência são transferidos de uma bactéria para outra por transferência horizontal na forma de plasmídeos, transposons, integrons ou bacteriófagos (LEVY e MARSHAL, 2004; GOMES *et al.*, 2020).

A resistência bacteriana tornou-se, portanto, um dos principais fatores no desencadeamento de uma busca global e urgente por novos agentes antimicrobianos. Uma lista de prioridades para bactérias resistentes aos antibacterianos foi criada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para orientar a pesquisa e o desenvolvimento de novos agentes. Os microrganismos de

prioridade crítica incluem *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenem, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenem e Enterobacteriaceae resistente a carbapenem e cefalosporina de 3ª geração. O grupo de alta prioridade compreende *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, *Salmonella* spp. e *Neisseria gonorrhoeae*, enquanto *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Shigella* spp. são considerados de prioridade média (OMS, 2017).

O impacto gerado pela resistência microbiana é imensurável, levando ao prolongamento da doença e aumento das taxas de mortalidade, além de ocasionar problemas sociais, humano e aumento das despesas para o setor da saúde (OMS, 2014). Estes custos associados são extremamente altos, chegando a 20 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos (SMITH e COAST, 2013). Estima-se que mais de 2,8 milhões de infecções resistentes a antibióticos foram registradas só nos Estados Unidos e mais de 35 mil mortes por ano ocorreram como resultado dessas infecções (CDC, 2019). Se nenhuma solução eficaz for encontrada para retardar o crescimento da resistência microbiana, estima-se que até 2050, 10 milhões de pessoas serão mortas a cada ano (O'NEILL, 2016).

Biofilmes bacterianos

Os biofilmes diferem fisiologicamente dos microrganismos que vivem na forma livre, ou seja, das células planctônicas. Ele é formado pelos microrganismos como forma de proteção para sobreviver em ambientes hostis, com baixos níveis nutricionais e em ambientes que representem ameaças a sua forma de vida, como por exemplo quando ameaçados por antibióticos (FRIEDMAN e KOLTER., 2003), podem ser encontrados nos mais diferentes ambientes sejam eles naturais, industriais e ambientes hospitalares (KARATAN e WATNICK., 2009).

Há relatos de biofilmes em registros fósseis hidrotérmicos de aproximadamente 3 bilhões de anos atrás na África do Sul (WESTALL *et al.*, 2001) e em rochas hidrotermais no fundo do mar na Austrália (RASMUSSEN,

2000). Os biofilmes estão presentes no corpo humano na microbiota cutânea, intestinal e em estruturas endovasculares como válvulas cardíacas e cateteres, demonstrando a capacidade adaptativa dessa forma de vida microbiana (PAVITHRA e DOBLE., 2008).

As bactérias quando estão em comunidade produzem uma matriz extracelular composta em grande parte por exopolissacarídeos. Essa matriz compõe o que chamamos de biofilmes bacterianos. Além das substâncias exopoliméricas (EPS) existente na matriz do biofilme, o DNA extracelular também está presente na matriz do biofilme (eDNA), este possui um importante papel na integridade do biofilme (WEI e MA., 2013).

Diversos exopolissacarídeos tem sido descrito e podem variar dentro de uma mesma espécie. O biofilme de *P. aeruginosa*, um dos mais estudados envolve ao menos três diferentes tipos de exopolissacarídeos que contribuem para a arquitetura e desenvolvimento do biofilme: são eles o alginato, Pel e Psl. O alginato um dos polissacarídeos mais estudado está envolvido no estabelecimento das microcolônias nos estágios iniciais da formação do biofilme, conferindo também a estabilidade da maturação do biofilme. Pel e Psl estão envolvidos no estabelecimento do biofilme. Pel é um polissacarídeo rico em glicose sendo essencial na formação de biofilmes que se formam na interface liquido-ar e Psl é um pentassacarídeo composto por d-manose, d-glicose e l-raminose e é bastante importante na aderência do biofilme a superfícies abióticas (FLEMMING e WINGENDER, 2010).

No biofilme de *S. aureus* um dos mecanismos mais conhecidos no desenvolvimento do biofilme envolve a produção de adesinas intercelulares polissacarídicas (PIA) e N-acetil-glucosamina polimérica (PNAG) por enzimas codificadas pelo operon *ica*. Alguns sinais externos como estresse osmótico, glicose, nível de CO₂ podem afetar a regulação da expressão do operon *ica* e a formação do biofilme, mutações do operon *ica* afetam a produção de PIA/PNAG resultando em um fenótipo de biofilme negativo (O'NEILL *et al.*, 2007).

O operon *ica* consiste em quatro genes biosintéticos, *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*

A resistência dos biofilmes aos antibióticos é bastante elevada, as bactérias na forma de biofilme ficam menos suscetíveis na ordem de 10 a 1000 vezes, quando comparada a sua forma livre, planctônica. A matriz do biofilme é responsável por essa alta resistência, desta forma os agentes antimicrobianos conseguem atuar na parte mais superficial do biofilme matando células mais externas e não conseguindo atuar em todas as áreas do biofilme, e assim as células do interior mantêm-se intactas e prontas para colonizar outros tecidos se necessário (DAVIES, 2003).

A capacidade de penetração dos agentes antibióticos é dificultada não só pela matriz do biofilme, mas também pela redução do metabolismo celular ao longo da estrutura do biofilme, células da superfície do biofilme possuem um metabolismo mais ativo que as células encontradas mais ao centro do biofilme, de acordo com Stenberg e colaboradores (1999) na fase inicial da formação do biofilme as células estão altamente ativas para realizar a rápida colonização e crescimento rápido desse biofilme, após o estágio inicial de colonização a atividade metabólica diminui gradativamente na superfície do biofilme. A capacidade de penetração de agentes antimicrobianos na matriz do biofilme é dificultada e comprometida em parte devido a enzimas que atuam como moderadores que reagem prontamente a formas químicas retendo e inativando estas drogas, como por exemplo a retenção de enzimas β -lactamases na matriz do biofilme seria a causa da resistência das *P. aeruginosas* aos antibióticos β -lactâmicos (GILBERT *et al.*, 2002).

O desenvolvimento do biofilme se dá a partir de sinais ambientais que podem interferir na regulação da formação do biofilme, eles podem ser: (a) sinais mecânicos que envolvem estruturas bacterianas como pili e flagelos, estas estruturas podem auxiliar acelerando o desenvolvimento do biofilme (b) sinais nutricionais e metabólicos, como glicose e poliaminas (c) moléculas inorgânicas como ferro e fosfato (d) osmolaridade, (e) sinais do hospedeiro, (f) agentes

antimicrobianos (g) *Quorum sensing*, (h) segundos mensageiros e redes de proteínas como c-di-GMP (MOORTHY e WATNICK., 2004; KARATAN e WATNICK., 2009).

Ao se aderir a uma superfície como células isoladas o biofilme é denominado de biofilme em monocamada, ou que se caracteriza como a adesão inicial, a partir do momento que o biofilme forma grupo de células aderidas (micro colônias) ele é então chamado de biofilme em multicamadas, estando as bactérias ligadas a superfície e à outras bactérias vizinhas (KARATAN e WATNICK., 2009). O mecanismo de adesão envolve interações físico-químicas como forças de Van der Waalls, forças gravitacionais, cargas eletrostáticas na superfície e interações hidrofóbicas (PAVITHRA e DOBLE., 2008).

Após a adesão inicia-se o processo de produção da matriz exopolimérica responsável pela estrutura e adesão do biofilme a superfície, além de conferir proteção contra agentes externos como antibióticos sintéticos e naturais (BEECH *et al.*, 2006). A secreção de moléculas sinalizadoras e que coordenam todo o biofilme é realizada por um processo denominado *Quorum Sensing* (QS). O QS são pequenas moléculas sintetizadas intracelularmente que interagem entre si e com o ambiente externo, além de regularem a expressão de genes, são então denominadas autoindutoras. Esse mecanismo possibilita que as bactérias sintam a presença uma das outras e dessa forma modulam a expressão gênica como resposta a mudanças na densidade populacional. O QS é responsável por controlar processos como formação do biofilme, expressão de fatores de virulência, esporulação e produção de antibióticos (CAMILLI, 2006; BRYERS, 2008). A figura 1 traz um esquema da formação do biofilme.

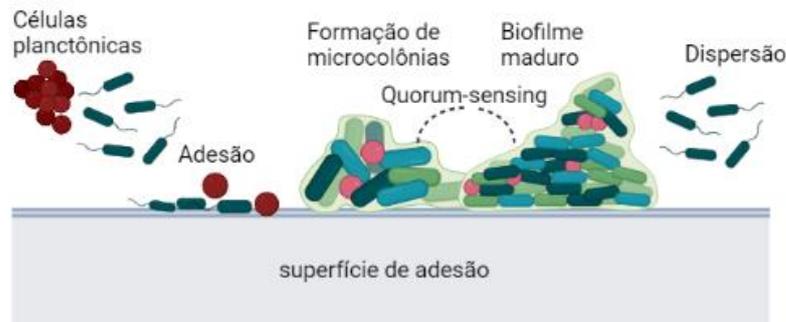


Figura 1: Esquema dos estágios de formação de um biofilme. Adaptado de KOSTAKIOTI *et al* (2013).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva responsável por diversas infecções em humanos, desde infecções na pele até infecções mais graves dos tecidos. É um patógeno de grande importância médica estando associado a altas taxas de mortalidade em infecções IRAS (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde) que ocorrem em função de sepse, especialmente envolvendo *S. aureus* resistentes a metilicilina (MRSA) (KONG *et al.*, 2016).

Um dos fatores que tornam *S. aureus* capaz de sobreviver ao sistema imunológico do hospedeiro e de causar e persistir em diversas doenças, é devido à capacidade de produção de proteínas que medeiam a adesão bacteriana aos tecidos do hospedeiro, além da produção de toxinas extracelulares e enzimas que são responsáveis pela destruição de células e tecidos do hospedeiro incapacitando o sistema imune de combater aquela infecção, desta forma a bactéria se multiplica e se dissemina. Além das toxinas secretadas, há também a produção de enzimas como as proteases e coagulases por *S. aureus* que atuam degradando moléculas que atuam na cascata de sinalização das vias metabólicas do hospedeiro. Essas toxinas são proteínas produzidas pela matriz extracelular durante a fase exponencial e fase estacionária, estas atuam na penetração do tecido do

hospedeiro. As toxinas mais conhecidas de *S. aureus* são hemolisinas, leucotoxinas, enterotoxina, toxina esfoliativa e toxina da síndrome do choque tóxico (TSST- 1) (LOWY, 1998).

Infecções associadas a *S. aureus* como pneumonia, bacteremia, sepse e endocardite fazem deste microrganismo um dos mais ameaçadores (JUSKO *et al.*, 2014). Grande parte das infecções associadas aos biofilmes são causadas por *Staphylococcus*, isso se deve ao fato de que esse microrganismo é uma bactéria comensal muito frequente na pele humana e nas mucosas (OTTO, 2008). Estudos mostram que as narinas são uma das áreas mais comuns onde esse microrganismo pode ser isolado (KLUYTMANS; BELKUM; VERBRUGH., 1997). Dispositivos médicos como cateteres urinários, venosos, válvulas cardíacas e marcapassos são mais propensos a serem infectados, sendo *S. aureus* uma das principais espécies encontradas nesse tipo de infecção. Dispositivos cirúrgicos também podem ser contaminados com essas bactérias, uma vez que elas são encontradas na pele do paciente ou do profissional de saúde (OTTO, 2018).

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa com característica de multirresistência oportunista responsável por diversas infecções em ambientes hospitalares. Algumas das doenças causadas por *P. aeruginosa* são pneumonia, septicemia, endocardite, ceratite e otite. Pacientes acometidos pela fibrose cística (FC) possuem o pulmão muito comprometido e, portanto, estão mais suscetíveis a infecções por *P. aeruginosa* que uma vez infectando esses pacientes contribuindo muito para o avanço da doença (GOMEZ e PRINCE., 2007). Sua patogenicidade está intimamente relacionada com a condição do hospedeiro, seja pela presença de um cateter, um tubo traqueal, queimadura ou alguma pré-condição que ocasione uma diminuição da imunidade do hospedeiro (POLLACK, 1984).

P. aeruginosa é um importante patógeno formador de biofilme aderindo-se a superfícies por meio de estruturas que auxiliam na interação com a superfície por

meio dos flagelos ou pela motilidade mediada por flagelos, além da interação célula-célula necessária para a formação de microcolônias (O'TOOLE e KOLTER., 1998; KLAUSEN *et al.*, 2003).

Alguns genes controlam a formação e diferenciação do biofilme de *P. aeruginosa* promovendo a biossíntese de moléculas que desenvolvem um fenótipo de biofilme mais denso e espesso, como a superprodução do alginato, um polissacarídeo presente na matriz que promove a formação de muco por parte dessas cepas que carregam esse gene (FRIEDMAN e KOLTER, 2003).

As altas taxas de resistência aos carbapenêmicos são relatados na maioria dos isolados clínicos, além de fatores como sistemas de bomba de efluxo, regulação de porinas, produção de enzimas como β -lactamases que limitam o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* (ROSSI, 2011). A virulência de bactérias como *P. aeruginosa*, está relacionada principalmente pelos diversos mecanismos de ação e locais onde as toxinas produzidas por esta bactéria atuam. Os diversos cenários clínicos onde *P. aeruginosa* está presente causando doenças, dificultam cada vez mais a elucidação destes mecanismos e conseqüentemente no desenvolvimento de tratamentos eficazes contra este patógeno (POLLACK, 1984).

Produtos naturais como fonte terapêutica

A utilização de produtos naturais pela humanidade, remonta às sagradas escrituras e ao Papiro de Ebers que enumera cerca de 100 doenças e descreve inúmeras formulações e remédios populares de origem vegetal e animal (PINTO *et al.*, 2002). Há diversos registros de espécies como, por exemplo, a papoula (*Papaver somniferum*) que comprovam a importância dessa planta com poder analgésico com ação primária sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). Planta cujo princípio ativo é a morfina (DUARTE, 2005). Depois de estabelecida a estrutura química dos derivados naturais do ópio, vários outros compostos farmacologicamente ativos foram descobertos, a saber, o derivado 4-fenil-

piperidínicos como uma nova classe de hipno-analgésicos de emprego mais efetivo e seguro (BARREIRO, 1990).

Após a descoberta acidental do primeiro antibiótico, a penicilina, por Fleming a partir do fungo filamentosso *Penicillium notatum*, em 1929, houve então um grande desenvolvimento na busca por novas substâncias com capacidade antibiótica frente às bactérias resistentes. Diversos metabólitos secundários de fungos produziram alguns dos mais importantes produtos da indústria farmacêutica, a exemplo de agentes antibacterianos como os das classes das penicilinas, cefalosporinas, as tetraciclina, agentes imunossupressores como a ciclosporina e rapamicina a partir de *Streptomyces* sp., redutores de colesterol como a mevastatina e lovastatina a partir de *Penicillium* sp. e os anti-helmínticos e antiparasitários, como ivermectinas a partir de *Streptomyces* sp. (CRAGG e NEWMAN, 2005).

Outros exemplos de moléculas são a vimblastina (Velban[®]) e a vincristina (Oncovin[®]) extraídas da *Catharrantus roseus* e o taxol extraído da casca da *Taxus brevifolia*, que são quimioterápicos para o tratamento do câncer inserido na terapêutica nos últimos 20 anos. Estudos sobre a viabilidade econômica e sustentável de obtenção do taxol surgiram em decorrência da escassez da fonte natural, tendo em vista que, para produzir 1 kg de taxol seriam necessários 10 t de cascas de *T. brevifolia*, ou seja, 3000 árvores. Diante disso iniciou-se a busca por fontes alternativas e naturais para obtenção do taxol. Mais tarde surgiram os primeiros relatos de novas fontes de outros taxanos, como a Bacatina III encontrada em outra espécie de *Taxus* com concentrações cinco vezes maiores que a encontrada inicialmente. Recentemente, um grupo da *Montana State University* obteve o taxol a partir fungos endofíticos isolados das cascas da *T. brevifolia* (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Apesar de existirem outros métodos de descoberta de medicamentos, os produtos naturais ainda se mostram bastantes promissores como fonte para novos fármacos. Um estudo realizado por Newman e Cragg (2020) analisando os agentes terapêuticos aprovados nos últimos 39 anos (1981 – 2019), os autores observaram que quase um quinto de todos os novos medicamentos aprovados entre 1981 e

2019 eram oriundos de produtos naturais. Analisando os medicamentos antibacterianos aprovados entre os anos de 2015 e 2019, 48% eram resultantes de produtos naturais e seus derivados.

O Brasil é um país de grande extensão territorial e extremamente diverso em suas características climáticas e vegetais, abrigando uma enorme diversidade biológica que o coloca como um dos países com maior biodiversidade do planeta (MMA, 2002). Além de apresentar uma biodiversidade e diversidade étnica e cultural bastante rica, o povo brasileiro detém um amplo conhecimento popular acerca da sua biodiversidade (MARANGONI, 2015). Atrelado a isso, as plantas medicinais e suas preparações caseiras representam uma grande importância para populações de baixa renda que tem como alternativa a disponibilidade dessas plantas medicinais para tratar diversas doenças. O seu uso está relacionado também à influência cultural passada de geração em geração (NOBRE-JUNIOR, 2005).

Um levantamento de plantas, fungos e algas realizado pelo projeto Flora do Brasil 2020, feito em parceria com 25 países, contou com o apoio de 979 taxonomistas sendo 854 brasileiros. O grupo listou um total de 46.975 espécies de plantas, algas e fungos nativos do Brasil. Neste levantamento 55% das espécies de plantas terrestres são endêmicas do Brasil. O levantamento catalogou 6.320 espécies de fungos, 4.972 espécies de algas, 1.584 espécies de briófitas, 1.380 espécies de samambaias, 23 espécies de gimnospermas e com maior registro catalogado as angiospermas com 32.696 espécies. Entre os anos de 2015 e 2020 a lista de novas espécies registradas cresceu e ainda está longe de ser concluída, cerca de 1.500 espécies de plantas terrestres, 200 de algas e 420 de fungos nativos do Brasil foram descritos como novos (FORZZA *et al.*, 2020).

A lista de plantas por biomas traz os seguintes dados, na Amazônia foram listadas 13.056 espécies, no Pantanal 1.682 espécies, na Mata Atlântica 17.150 espécies, no Cerrado 12.829 espécies, na Caatinga 4.963 espécies e no Pampa 2.817 espécies (FORZZA *et al.*, 2020). A indiscutível riqueza de espécies encontradas nos biomas brasileiros que há séculos vem despertando o interesse da comunidade acadêmica compõe uma das mais importantes fontes de princípios ativos do planeta. A impressionante quantidade de espécies encontradas na flora

nacional traz destaque para o país como fonte promissora de pesquisas para novas substâncias e conseqüentemente para o desenvolvimento de novos medicamentos (FERNANDES, 2011).

Bioma Caatinga

A Caatinga corresponde a 11% do território brasileiro, o que representa uma área de aproximadamente 844,453 km², é o principal ecossistema existente no Nordeste com clima semiárido ocupando 10 estados. Os valores em porcentagem a seguir representam quanto do território de cada estado é constituído pelo clima semiárido, Bahia (54%), Ceará (100%), Piauí (63%), Pernambuco (83%), Rio Grande do Norte (95%), Paraíba (92%), Sergipe (49%), Alagoas (48%), Maranhão (1%) e Minas Gerais (2%), como mostra a figura 2 (IBGE, 2004) (INSA, a2021). O nome Caatinga é originário do tupi-guarani que significa mata branca devido a sua paisagem esbranquiçada característica da vegetação durante a seca em que grande parte das plantas perdem suas folhagens e os seus troncos tornam-se esbranquiçados e secos. É um bioma exclusivamente brasileiro, ou seja, a maior parte do seu patrimônio biológico não é visto em nenhum outro lugar do planeta (SCHISTEK, 2012).

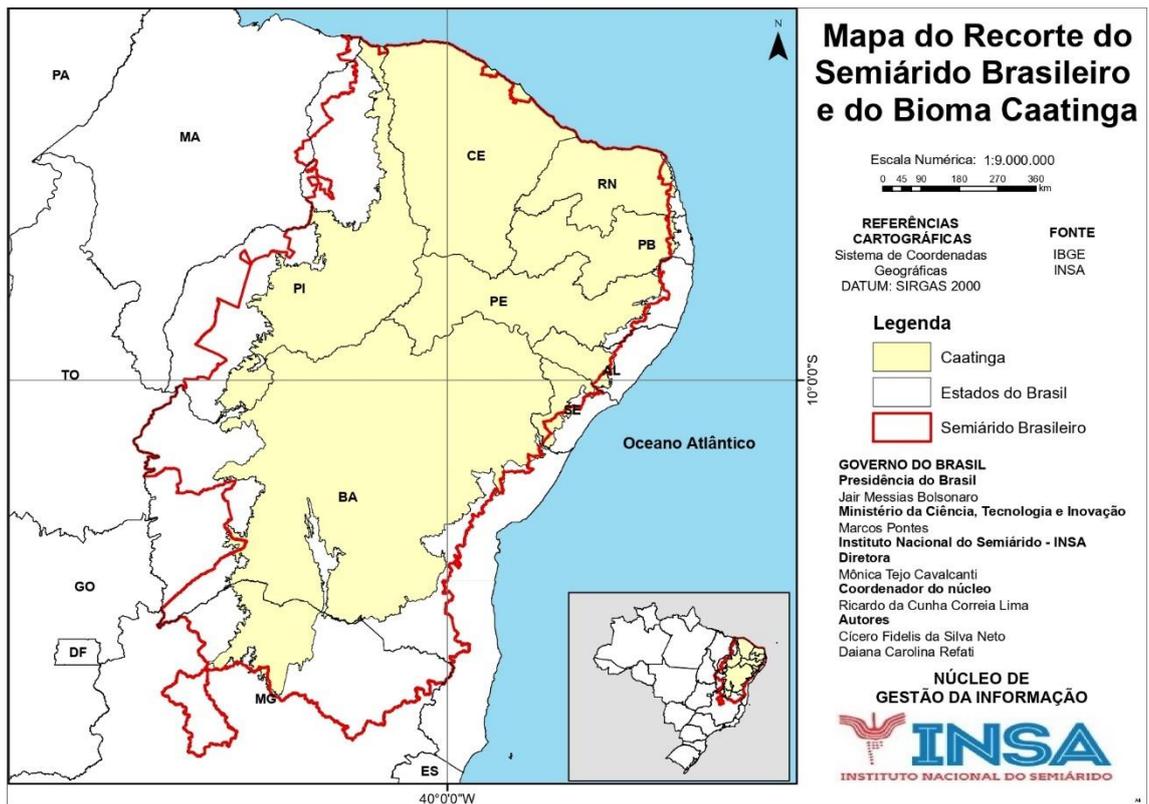


Figura 2: Mapa do recorte do semiárido brasileiro – Bioma Caatinga.

O termo semiárido faz referência ao clima que exerce forte influência sobre a vegetação da Caatinga. Esse clima abrange cerca de 50% do território da região nordeste. A Caatinga está situada entre o Trópico de Capricórnio e o Equador possui uma intensa luminosidade por toda sua extensão territorial durante todo o ano. A temperatura média anual é alta, ficando entre 25°C e 30°C com pouca variação espacial, apresentando poucos graus de diferença nos meses mais frios e quentes. Apresenta estação chuvosa extremamente variável e curta com precipitação média anual de 300 mm na região dos cariris velhos na Paraíba e um pouco mais de 1000 mm nas áreas limítrofes da Caatinga, muitas vezes com precipitações intensas em um único dia e variações no início e término das épocas chuvosas de um ano para o outro (IBGE, 1985).

Os períodos de secas são longos resultado de um complexo sistema de formação de chuvas que é decorrente de alguns fatores, como por exemplo, a disposição do relevo, com serras e chapadas mais altas que interferem na chegada

de frentes úmidas recebendo menos chuvas que o seu entorno e as frentes de chuvas que adentram o semiárido vão perdendo forças resultando em chuvas irregulares e imprevisíveis, muitas vezes concentrando-se em poucos meses do ano e alternando-se em anos chuvosos e anos de secas. Além da alta incidência de radiação solar e nebulosidade reduzida, a evapotranspiração é bastante elevada, situando-se entre 1500 mm e 2000 mm anuais, desta forma excede a precipitação média anual sendo este um fator definitivo da deficiência hídrica que caracteriza a região da Caatinga (SAMPAIO, 2010; SOUZA, 2015).

As serras, chapadas e planaltos existentes no Nordeste, denominadas de brejos de altitude, são ilhas de floresta úmida, uma exceção dentro da região semiárida do Nordeste. Essa região apresenta uma precipitação média anual de 1200 mm, um pouco acima da média da região e está intimamente relacionada com a presença dos paredões, como por exemplo, planalto da Borborema na Paraíba, Chapada do Araripe localizado nas divisas dos estados do Ceará, Pernambuco e Piauí e Chapada de Ibiapaba localizada nos estados do Piauí e Ceará com altitudes de 500 a 1.100 m (IBGE, 1985). Os brejos possuem uma posição privilegiada quando comparadas as demais regiões semiáridas, pois possuem uma melhor condição de umidade, temperatura e cobertura vegetal (ANDRADE-LIMA, 2007).

Outro fator que afeta a disponibilidade hídrica são os solos que possuem uma menor capacidade de armazenamento das águas das chuvas devido às diferentes características de profundidades e texturas, sendo uma das regiões com a maior variabilidade de solos do país. Essa grande variabilidade é decorrente de alguns fatores como erosão, profundidade destes solos variando de solos muito rasos até solos de muita profundidade. Esses tipos de solos são originados de duas formações geológicas, uma sedimentar e a outra cristalina. Quase toda a porção sedimentar é composta por solos antigos, profundos, com boa capacidade de reter água e com boa drenagem. Enquanto a porção do cristalino são áreas que se formaram no pré-cambriano apresentando diversos tipos de rochas, formando grandes depressões sertanejas, inselbergues e serras médias e baixas (SAMPAIO,

2010), correspondendo também ao planalto da Borborema (PORTO; CABRAL; TABARELLI, 2004).

Os solos podem ser caracterizados da seguinte forma, os luvisolos como sendo pouco profundos e com grande variação no conteúdo de argila, os planossolos são solos mal drenados e pouco profundos, chegando a 1 metro de profundidade, os neossolos quartzarênicos são arenosos e muito profundos, apresentam uma drenagem excessiva sendo este fator uma limitação importante pois há uma dificuldade no armazenamento de água e nutrientes. Os neossolos litólicos são solos muito rasos, pedregosos e rochosos, o que torna essas condições limitante para a agricultura, além da baixa capacidade de armazenar água e nutrientes, os neossolos regolíticos de profundidade intermediária e textura arenosa média. Os argissolos possuem profundidade desde muito rasa até muito profunda e possui uma variação no conteúdo de argila (ARAUJO FILHO, 2011).

A disponibilidade de nutrientes está intrinsecamente relacionada com as características do solo que de uma maneira geral são pouco férteis, pobres em fósforo (P), cálcio (Ca) e carbono, porém os níveis de fósforo é maior em solos do tipo luvisolos e litossolos do que em solos latossolos e argissolos, já as médias de carbono são geralmente baixas principalmente em decorrência da baixa formação de biomassa vegetal e resíduos orgânicos devido em parte a deficiência de água e fertilidade do solo, além do processo de lixiviação advindo de muitos anos observado em solos de origem sedimentar (MENEZES *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2010). Os solos cristalinos são um pouco mais férteis para aqueles de textura argilosa como os latossolos, os neossolos por guardarem material lixiviado decorrente das encostas e devido as chuvas os rios se enchem e depositam mais nutrientes resultando em um solo com composição distinta e, portanto, mais fértil. Todas essas questões nutricionais refletem diretamente nas características vegetais desse bioma e na sua variabilidade (SAMPALIO *et al.*, 2010).

As tipologias da Caatinga são de difíceis classificações devidas as transições que ocorrem entre as suas paisagens, que torna bastante desafiador a identificação de elementos que diferenciem cada região. Alguns autores levam em

consideração fatores como solo, relevo, clima e espécies vegetais para classificar e diferenciar os diferentes ambientes. Outro fator que dificulta o mapeamento da Caatinga é a variabilidade da sua paisagem que é dependente dos recursos hídricos, uma vez que a sazonalidade deste recurso muda completamente a vegetação fazendo com que as plantas percam suas folhas no período de estiagem, no entanto, quando há um mínimo de chuvas a paisagem muda completamente de forma muito brusca, com o surgimento de novas folhas. Logo, definir épocas certas para mapear essa região é bastante desafiador e complexo (SILVA e CRUZ, 2018).

A vegetação da Caatinga é a mais heterogênea dentre as vegetações do Brasil, de acordo com o atlas do Brasil da região nordeste (IBGE, 1985) a Caatinga possui as seguintes vegetações: (i) Caatinga seca e agrupada, caracterizada por seu relevo pouco acidentado e altitude em torno de 300 m, (ii) Caatinga seca e esparsa, descrita por possuir arbustos e árvores de 2 m de altura apresentando árvores esparsas distantes uma das outras, (iii) Caatinga arbustiva densa, esse tipo de vegetação é a mais comum em toda a região semiárida, (iv) Caatinga das serras, apresenta uma maior quantidade de árvores e maior cobertura de herbácea recobrando todo o solo com vegetação, neste tipo a umidade é maior em virtude da maior altitude encontrada para esse tipo de vegetação o que propicia um maior desenvolvimento das árvores, (v) Caatinga da chapada dos Moxotós, caracterizada por sua vegetação baixa e arbustiva. Uma característica comum a todos esses tipos de vegetação da Caatinga é que no período da seca as espécies perdem suas folhas como estratégia de sobrevivência para encarar a escassez de água.

Outra classificação é a do botânico George Eiten da Universidade de Brasília mencionada pelo IBGE (2012), nesta classificação o botânico aborda características mais fisionômicas em que o aspecto da vegetação é o fator diferencial. O autor classifica a Caatinga como: florestal, de árvoredo, arbóreo-arbustiva fechada, arbóreo-arbustiva aberta, arbustiva aberta, arbustiva fechada, savânica e savânica lajeada.

O conhecimento das múltiplas faces da Caatinga é essencial para entender a sua heterogeneidade, seus contrastes físicos e climáticos e o porquê desta região

ser extremamente diversa e distinta das demais regiões, dito isto é importante o entendimento da sua vegetação, solo, clima, relevo e ação do tempo (PRADO, 2003; ARAUJO FILHO, 2011).

Apesar do seu potencial, a Caatinga é tachada como um ambiente pobre em espécies e com baixo grau de endemismo, o que certamente é reflexo do pouco conhecimento sobre a região (HAUFF, 2010). A carência de informações do bioma Caatinga e do seu enorme potencial para o desenvolvimento do país é decorrente de vários fatores, um deles é o menosprezo acerca da região da Caatinga por se tratar de um bioma não florestal que muitas vezes é visto como pobre em biodiversidade e potencial econômico, pelo fato de a Caatinga estar longe dos principais centros econômicos e populacionais do país, além do pouco conhecimento científico acerca da sua biodiversidade, resultando em poucos estudos, situação que vem mudando nos últimos anos (SEYFFARTH, 2012).

É notória a riqueza encontrada nos biomas brasileiros, porém se faz necessário ressaltar a importância para a conservação da biodiversidade destes biomas e desta forma criar estratégias que identifiquem áreas com prioridades para conservação. Segundo um levantamento realizado pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA), para a Caatinga foram identificadas 282 áreas com prioridade para a conservação da sua biodiversidade, incluindo 72 unidades de conservação, todas essas unidades juntas somam um total de 36,7% (30,405,138 ha) de todo o território de Caatinga. Destas, 27 foram consideradas como de extrema importância biológica, 12 como de muito alta importância, 18 como de alta importância e 25 como pouco conhecidas, mas de aceitável importância. Recomendam-se proteção integral para a maioria das áreas prioritárias (54,8%), 81% de proteção para áreas de extrema importância, 75% para as de muito alta importância, e 72% para as de alta importância. E como esperado, como principal ação proposta para grande parte das áreas insuficientemente conhecidas (96%), propôs-se a investigação científica. As regiões que apresentam extrema importância biológica que se justificam por serem áreas ricas em espécies endêmicas e um ambiente em processo de desertificação recomenda-se proteção

integral na sua flora, répteis/anfíbios, biota aquática e invertebrados (SILVA; TABARELLI; FONSECA, 2017).

Até o ano de 2009 o bioma Caatinga possuía 54,5% do seu território original intacto, no entanto os impactos causados pela atividade humana vêm mostrando o contrário, cerca de 63,3% da Caatinga já foi modificada, tal fato se deve ao crescente cenário antropogênico resultado da pressão humana sobre a vegetação natural (SILVA E BARBOSA, 2017). O processo de desertificação que já é um fator altamente considerado agrava ainda mais essa situação. É preciso repensar de forma sustentável o uso da terra e incentivar maneiras de conservação. Apenas 1,13% da Caatinga é protegida por unidades de conservação de proteção integral, a forma mais restrita de conservação segundo as categorias do SNUC (Sistema Nacional de Unidades de Conservação) e 98,4% das unidades de conservação de uso sustentável são classificadas como APA (Área de Proteção Ambiental), ou seja, aquelas mais permissivas e que se pode fazer uso extenso e regular de terras privadas (FONSECA *et al.*, 2017).

Diversos estudos sobre o potencial de plantas da Caatinga já foram publicados, demonstrando o crescente interesse pelo conhecimento vegetal acerca desse bioma e de suas moléculas. Na avaliação de 51 artigos publicados entre os anos de 1999 e 2017, destes, 28 tratava de testes microbiológicos, tendo como principal interesse entender os mecanismos de inibição de crescimento microbiano, tal fato deve-se à crescente demanda mundial por novos antimicrobianos devido à resistência que os microrganismos desenvolveram aos fármacos disponíveis no mercado (MESQUITA; PINTO; MOREIRA, 2017). Essa resistência aos antimicrobianos já conhecidos incentiva ainda mais a busca por agentes antibióticos de origem natural (CALLOU *et al.*, 2012).

A extraordinária variabilidade presente na natureza induz pensar que fontes de biodiversidade menos exploradas ou inexploradas podem ser associadas a novas diversidades químicas, com grande potencial de ação contra os organismos patogênicos que apresentam resistência a antibióticos, por exemplo. As plantas e

microrganismos cultiváveis se tornaram as principais fontes de moléculas biologicamente ativas nos tempos atuais (MARANGONI, 2015).

Microrganismos endofíticos

Os microrganismos são fontes promissoras e reprodutíveis tendo em vista a facilidade no cultivo, manutenção e condições mínimas de aparatos laboratoriais, quando comparadas a outros tipos de fontes naturais como as plantas e animais (SPECIAN *et al.*, 2014). Os microrganismos endofíticos (fungos, bactérias entre outros) desempenham um papel fundamental na produção de novos produtos naturais. Os microrganismos endofíticos são aqueles que vivem no interior de espécies vegetais habitando, de modo geral, suas partes aéreas como caules e folhas. Foram primeiramente descritos por De Bary (1866), distinguindo-os dos patógenos por serem assintomáticos, sem causar nenhum dano ao hospedeiro. Atualmente sabe-se que os microrganismos endofíticos são capazes de produzir toxinas, antibióticos e muitos outros produtos de interesse biotecnológico, além de promover proteção à planta (AZEVEDO, 1998).

Os microrganismos endofíticos podem influenciar em diversas características da planta bem como desempenhar funções importantes para o seu bem-estar, atuando como controladores de patógenos e proteção contra herbívoros (PEIXOTO NETO; DE AZEVEDO; CAETANO, 2004). As interações dos fungos endofíticos com o hospedeiro ainda não foram bem elucidadas, porém sabe-se que essas interações podem ser simbióticas (mutualismo e comensalismo) ou tróficas (parasitismo). Nas interações do tipo mutualísticas, os fungos são capazes de produzir metabólitos que conferem vantagens às plantas, como resistência aos estresses. No tipo de interação comensalismo, os endofíticos podem produzir metabólitos que não interferem no metabolismo do vegetal, mas sim na defesa contra outros microrganismos, por exemplo. Nessa associação, a planta hospedeira protege e disponibiliza alimento para o endofítico, que em resposta produz metabólitos bioativos para aumentar o crescimento e competitividade do hospedeiro e protegê-lo contra herbívoros e fitopatógenos. No parasitismo o

endofítico passa a exercer ação patogênica sobre o seu hospedeiro (CHAPLA, 2010).

Praticamente todas as espécies vegetais já estudadas apresentaram microrganismos endofíticos, sendo estes fungos e bactérias, que estão presentes nos mais diferentes tecidos e órgãos vegetais (POLI *et al.*, 2012). Acredita-se que muitas das propriedades medicinais de certas plantas podem estar relacionadas com os metabólitos produzidos pelos endofíticos. Logo, surge o questionamento sobre as tais moléculas bioativas encontradas nas plantas, se são produzidas exclusivamente por estas ou como resultado da relação mutualística entre planta e micro-organismo. Assim, sugere-se que as propriedades terapêuticas de uma planta medicinal podem estar na interação entre ambos (SPECIAN *et al.*, 2014).

Os endofíticos são um grupo de microrganismos pouco estudados e que se apresentam como uma fonte rica para possíveis novos compostos com grande potencial de exploração. A sua capacidade em produzir metabólitos com atividade biológica atrelada a necessidade por novos metabólitos biologicamente ativos faz destes, alvo de interesse cada vez maior (CHAPLA, 2010).

A especificidade de microrganismos endofíticos pode estar relacionada com a espécie vegetal na qual ele habita, podendo cada espécie vegetal hospedar uma ou mais espécies de endofíticos. Tal especificidade pode estar relacionada também com as condições ambientais (ZHANG; SONG; TAN, 2006). Os fungos endofíticos são o grupo mais produtivo quimicamente entre os fungos filamentosos com uma diversidade metabólica de 73%, superior a outros tipos de fungos. Essa alta produtividade pode estar relacionada a dois fatores: altos níveis de estresse ambiental e as interações com outros organismos (STROBEL e DAISY, 2003).

Alguns endofíticos produzem substâncias químicas com as mesmas características químicas da planta hospedeira. Essa capacidade está relacionada com uma recombinação genética entre o hospedeiro e a planta ao longo do processo evolutivo, ocorrendo à transferência de genes (TAN e ZOU, 2001). As vantagens dessa habilidade do endofítico produzir os mesmos metabólitos bioativos da planta hospedeira podem reduzir coleta de plantas que muitas vezes

são raras ou ameaçadas de extinção, preservando desta forma a biodiversidade (SPECIAN *et al.*, 2004).

Praticamente todas as espécies vegetais possuem microrganismos endofíticos e diante da diversidade vegetal encontrada nos biomas brasileiros, se faz necessário entender qual a melhor forma de cultivo destes microrganismos endofíticos bem como melhores formas de extrair seus produtos bioativos, tais métodos são: dar preferência a plantas de ambientes únicos, que possuam estratégias de sobrevivência; plantas com histórico etnobotânico e que estejam relacionadas com aplicações de interesse; plantas endêmicas com certa ocupação de terras antigas sendo mais propício possuir endofíticos com produtos ativos quando comparados a outras plantas (STROBEL e DAISY, 2003).

Os microrganismos endófitos associados a plantas representam uma fonte inexplorada de produtos naturais novos e bioativos, com mais de 20.000 substâncias descritas, sendo que destas, 51% apresentam estruturas inéditas e 80% atividade biológica (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013). Isto pode ser explicado pela teoria ecológica, que nos diz que mudanças no ambiente e conseqüentemente a disponibilidade de recursos podem provocar alterações na produção metabólica de uma dada espécie microbiana dependendo do nicho ecológico no qual ele está inserido e das conseqüentes interações bióticas e abióticas (OWNLEY; GWINN; VEJA, 2010). Logo, partindo desse pressuposto podemos sugerir que o investimento em estudos realizados em ambientes com características distintas e pouco explorados podem contribuir com o conhecimento acerca de biomas como o da Caatinga e conseqüentemente na descoberta de novos endofíticos.

Os produtos naturais são responsáveis por moléculas conhecidas e registradas na literatura e que possuem valor agregado devido a sua aplicação como medicamentos, cosméticos, agroquímicos e entre outros. No entanto, existe a utilização de plantas medicinais que necessitam de estudos acerca das suas propriedades farmacológicas bem como dos microrganismos que nelas habitam. Grande parte de espécies nativas brasileiras ainda não foram estudadas mais

detalhadamente, além do fato de existirem espécies que estão inseridas em ambientes com características distintas, pouco exploradas e, portanto, com menos estudos.

Diante disso, os metabólitos secundários de microrganismos endofíticos oriundos de plantas de regiões como da Caatinga que apresentam características bem distintas das demais regiões do Brasil, podendo-se até dizer características únicas, apresentam-se como uma fonte promissora na busca por novas moléculas bioativas com atividade antimicrobiana e antibiofilme.

Logo, esse trabalho visa explorar o bioma Caatinga dentro do âmbito dos microrganismos endofíticos isolados de plantas típicas da Caatinga e justifica-se pela possibilidade de isolar novos microrganismos endofíticos bem como isolar novas moléculas biotecnologicamente ativas que venham a se tornar possíveis candidatos a fármacos.

Apresentação do conteúdo, esta tese foi dividida em 4 capítulos, objetivando um melhor detalhamento dos resultados obtidos ao longo do desenvolvimento desta tese, desde a coleta do material, isolamento dos endofíticos, caracterização dos metabólitos e ensaios biológicos.

O capítulo 1 abordamos um artigo de revisão desenvolvido no decorrer do doutorado, este artigo mostra o arsenal de moléculas isoladas de microrganismos endofíticos com atividade antibacteriana contra bactérias gram-negativas. O capítulo 2, o qual chamamos de pré-resultados traz o panorama geral dos microrganismos endofíticos isolados, além do *screening* inicial para obtenção dos extratos brutos dos endofíticos isolados bem como as suas atividades antibacterianas e antibiofilme. O capítulo 3 e 4, nós abordamos as atividades de dois endofíticos isolados e escolhido com base nas atividades obtidas no *screening* inicial relatados no capítulo 2. Os capítulos 3 e 4 trazem a caracterização das moléculas ativas produzidas por microrganismos endofíticos, os ensaios biológicos e a identificação dos endofíticos realizada por análise filogenética.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Isolar e identificar microrganismos endofíticos de plantas da Caatinga bem como seus metabólitos secundários e avaliar as suas atividades antimicrobianas, de antiformação e erradicação de biofilme.

Objetivos específicos

- Isolar microrganismos endofíticos de plantas típicas da Caatinga;
- Identificar os microrganismos endofíticos por técnicas de biologia molecular e construção da árvore filogenética;
- Caracterizar por espectrometria de massas os metabólitos secundários dos microrganismos endofíticos;
- Avaliar as atividades antimicrobiana, antiformação e de erradicação de biofilme dos metabólitos secundários contra *Staphylococcus aureus* Newman e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853;
- Avaliar a toxicidade das frações enriquecidas ativas em modelo *in vivo*.

CAPÍTULO 1: Silva, Dayse Pereira Dias; Cardoso, Macley Silva; Macedo, Alexandre José. Endophytic fungi as a source of antibacterial compounds - a focus on gram-negative bacteria. **Antibiotics.**

O capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 61 – 106.

Silva, D.P.D.; Cardoso, M.S.; Macedo, A.J. Endophytic Fungi as a Source of Antibacterial Compounds—A Focus on Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* 2022, 11, 1509. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111509>

CAPÍTULO 2: Microrganismos endofíticos isolados da Caatinga e avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme dos extratos brutos

Este capítulo teve como objetivo realizar o isolamento e identificação por análises filogenéticas dos microrganismos endofíticos coletados de plantas da Caatinga, realizar o *screening* inicial para atividades antibiótica e antibiofilme frente a bactérias como *Staphylococcus aureus* Newman e *Pseudomonas aeruginosa*.

1.0 INTRODUÇÃO

A Caatinga um bioma exclusivamente brasileiro, correspondendo a 11% do seu território, ocupa 10 estados do nordeste (IBGE, 2004). Com clima predominantemente seco, a temperatura média anual varia entre 25°C e 30°C. A irregularidade pluviométrica decorrente de fatores como disposição do relevo com serras e chapadas que interferem na ocorrência e quantidade das chuvas fazendo com que muitas vezes estas cheguem em menor quantidade. Contribui fortemente para as diferentes paisagens observadas na vegetação da Caatinga. A precipitação média anual fica em torno de 300 mm (IBGE, 1985).

Além da irregularidade pluviométrica, outra característica que confere exclusividade a este bioma é alta radiação solar e evapotranspiração elevada que excede a precipitação média anual (SAMPAIO, 2010). A vegetação da Caatinga, bastante conhecida por sua característica de seca, é a mais heterogênea dentre as vegetações do Brasil (IBGE, 1985). A sua vegetação varia de arbustos menores de 2 m de altura até árvores de maior desenvolvimento. Essas múltiplas faces da Caatinga são de extrema importância para entender a sua diversidade e explica o porquê desta região ser tão distinta das demais regiões brasileiras, além de fazer luz para a importância de investigar esse bioma único e que necessita de mais atenção pois por muito tempo foi visto como um ambiente pobre em biodiversidade (PRADO, 2003; SEYFFARTH, 2012).

Alguns estudos acerca do potencial de plantas da Caatinga já foram relatados, muitos deles envolvendo atividade antimicrobiana (MESQUITA; PINTO; MOREIRA, 2017). Dentro desse contexto, os microrganismos endofíticos, aqueles que vivem dentro dos tecidos vegetais (De Bary, 1866), são fontes promissoras na busca por biomoléculas pois produzem diversos metabólitos como resposta a sua sobrevivência e em resposta às necessidades do seu hospedeiro, constituindo desta forma uma relação simbiótica (CHAPLA, 2010).

Cada espécie de planta pode hospedar um ou mais endofíticos, sendo essa especificidade muitas vezes atrelada às necessidades da planta, que por sua vez é explicada pelas condições ambientais. Portanto a presença do endofítico dentro da planta está intimamente relacionada com o seu hospedeiro (ZHANG; SONG; TAN, 2006).

Os produtos naturais são responsáveis por serem fontes de diversos medicamentos já registrados com ação anticancerígena (VIEGAS JUNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006), antibiótica, imunossuppressores, antiparasitários (CRAGG e NEWMAN, 2005). Analisando os compostos aprovados nos últimos anos, 48% dos registrados como antimicrobianos foram obtidos de produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2020).

Sendo assim, pensando na incrível riqueza e biodiversidade que o bioma Caatinga possui, este trabalho objetivou realizar a investigação dos metabólitos secundários produzidos por microrganismos endofíticos isolados de plantas típicas da Caatinga tendo como principal alvo investigar as suas atividades antibióticas e antibiofilme contra bactérias de importância médica.

2.0 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal

O material vegetal foi coletado no Instituto Nacional do Semiárido – INSA, localizado em região de Caatinga na cidade de Campina Grande, Paraíba, Brasil, o material foi coletado em janeiro de 2019 na estação do verão, a temperatura no momento da coleta era de 33°C, sem ocorrência de chuvas no dia da coleta. O espaço de coleta constitui 300 hectares de reserva de Caatinga preservada (INSA, b2021).

Foram coletadas cascas e folhas de plantas típicas da Caatinga, sendo elas, ***Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir. (Leguminosae)**, popularmente conhecida como Jurema preta (07° 15' 04.4''S 035° 56' 46.9''W), horário de coleta 13:50. Descrição da planta: arbusto, 3m de altura, folhas discolores, ramos com glândulas

avermelhadas, inflorescências brancas, flores brancas com estames amarelados, caule marrom acinzentado e córtex verde. Planta coletada de uma zona antropizada, fase de desenvolvimento: Adulto. ***Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae)**, conhecida como Juazeiro (07° 16' 41.0'' S 035° 58' 17.2''W), horário de coleta 11:05. Descrição da planta: árvore, 5m altura, caule acinzentado, folhas levemente discolores, planta estéril. Zona conservada, área de borda, aparentemente sem infestação de pragas. Fase de desenvolvimento: Adulto. ***Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Altschul (Leguminosae)**, mais conhecida como Angico (07°16'06.3" S, 035°58'22.3"W), horário de coleta 09:30. Descrição da planta: árvore, 5m de altura, casca escamosa com poucas lenticelas e ramos apicais acinzentados. Planta estéril com folhas levemente discolores. Coleta em zona antropizada, área aberta, sem infestação aparente. Fase de desenvolvimento: Adulto. ***Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett (Burceraceae)**, popularmente conhecida como Imburana, Amburana ou Umburana (07°16'51"S, 035°58'18.6"W), horário de coleta 10:35. Descrição da planta: árvore, 3m de altura, caule amarronzado, escamoso, folhas levemente discolores, frutos verdes com endocarpo laranja e sementes pretas. Fase de desenvolvimento: adulto. ***Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae)**, conhecida como Aroeira preta ou aroeira do sertão (07°15'08.9"S, 035°56'43.4"W), horário de coleta: 13:35. Descrição da planta: Árvore, 3m de altura, planta estéril com folhas, sem infestação aparente. Fase de desenvolvimento: adulto. ***Melocactus concinnus* Buining&Brederoo (Cactaceae)**, (coleção - Cactário Guimarães Duque - CAGD305, sede do INSA), horário de coleta 14:30. Descrição da espécie: Cacto globoso, armado, espinhos esbranquiçados, cefálio branco e flores róseas. ***Melocactus glaucescens* Buining&Brederoo (Cactaceae)**, (Cactário Guimarães Duque - CAGD312, sede do INSA), horário de coleta 15:30. Descrição da espécie: Cacto globoso, armado, espinhos esbranquiçados, cefálio vermelho e flores róseas. ***Melocactus concinnus* Buining&Brederoo (Cactaceae)**, (Coleção - Cactário Guimarães Duque - CAGD326, sede do INSA), horário de coleta 16:00. Descrição: Cacto globoso, armado, espinhos esbranquiçados, cefálio branco e flores róseas. Coletadores

presentes: Dayse Pereira Dias Silva (autora deste trabalho), Daniel Rodrigo Cavalcante de Araújo (Pesquisador INSA) e Juliana Gomes Freitas (Botânica – INSA).

2.2 Obtenção e isolamentos dos microrganismos endofíticos

O material coletado em campo foi levado para laboratório do INSA onde foi preparado para isolar os microrganismos endofíticos. As amostras vegetais foram lavadas em água corrente com detergente neutro e desinfetadas para remoção dos microrganismos epifíticos, bem como para remover resíduos de solo e poeira presentes na superfície das amostras. Em seguida, seguiu-se o protocolo de isolamento de endofíticos descrito por Araújo e colaboradores (2002). as partes vegetais foram mergulhadas em álcool 70% durante 1 minuto, seguida de hipoclorito de sódio a 3% por 2 minutos para folhas e 4 min para cascas. Após isso passou-se novamente em álcool 70% por 30 segundos para folhas e 1 minuto para cascas. E por fim, água destilada estéril por 2 minutos para todos os tecidos. Após essa sequência de passos o material foi cortado em fragmentos para serem inoculados em meio de cultivo. Para cada espécie vegetal foram inoculadas partes de cascas e folhas, e para os cactos foram inoculados o corpo do cacto.

O material cortado foi incubado em placas de petri contendo meios sólidos de BDA (Batata, Dextrose e Agar) e CAA (Caseína, Amido e Agar) previamente autoclavados. Os microrganismos foram incubados em BOD a 35°C durante 7 dias. Após crescimento dos microrganismos, este serão repicados novamente em meio de BDA e CAA a fim de isolá-los. Os microrganismos isolados foram conservados pelo método Castellani e armazenados em geladeira, constituindo a coleção de microrganismos endofíticos da Caatinga.

2.3 Fermentação e obtenção dos metabólitos secundários

Para iniciar a fermentação, os microrganismos foram cultivados em placa de petri contendo meio de BDA ou CAA e crescidos em BOD a 28°C até preenchimento total da placa pelo microrganismo. Em seguida 5 discos contendo

os microrganismos previamente cultivados foram inoculados em Erlenmeyers contendo 100 ml de meio de caldo de batata (KASVI), previamente autoclavados. Os erlenmeyers foram incubados em BOD a 28°C durante 30 dias (imagem a esquerda da figura 1).

Após este período, o caldo foi separado do micélio por meio de filtração a vácuo com auxílio de funil de büchner. O micélio foi extraído com metanol e mantido em banho ultrassônico por 2 horas, sendo que a cada 1 hora o solvente foi trocado e adicionado mais metanol. O caldo fermentado foi submetido a extração líquido-líquido em ampola de separação com acetato de etila, resultando em duas fases, uma fase orgânica denominada de extrato bruto de acetato de etila (EBAcOEt) e uma fase aquosa, como mostra o esquema na figura 1. Ambas as fases foram evaporadas em evaporador rotativo a 40°C para remoção do solvente e em seguida liofilizadas e armazenadas para futuros ensaios (ROMMINGER, 2008).

2.4 Fracionamento dos extratos

O EBAcOEt foi submetido a um fracionamento com metanol e hexano, para isso parte do EBAcOEt foi particionado em ampola de separação com metanol aquoso (90% de metanol e 10% de água) e hexano (v/v), resultando em uma fase metanólica e uma fase hexânica, como representado na figura 1 acima (KJER *et al.*, 2010). Os extratos foram secos em evaporador rotativo a 40°C, liofilizados e armazenados em freezer a -20°C para posteriores análises e ensaios.

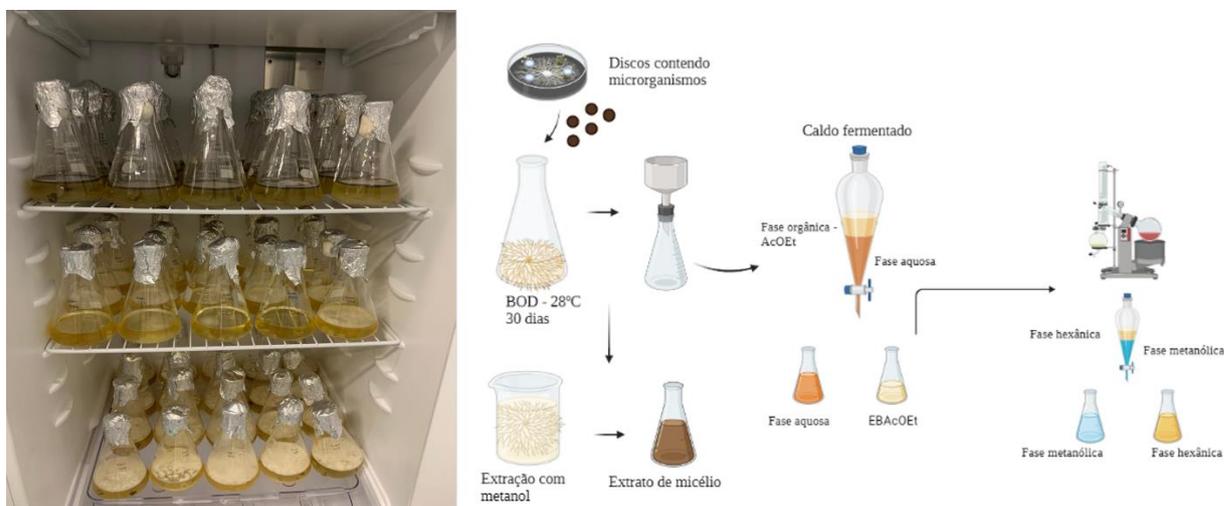


Figura 1: Cultivo dos microrganismos endofíticos em BOD (esquerda). Esquema da extração dos metabólitos secundários (direita).

2.5 Atividade antibacteriana e antiformação de biofilme dos extratos

Os ensaios antibacterianos e antibiofilme foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Trentin e colaboradores (2011). Para isso foi usando placas de 96 poços de fundo chato (Costar Clear, Corning Inc., USA). As placas foram preenchidas com caldo BHI (Brain Heart Infusion) para *Staphylococcus aureus* ou TSB (Trypticase Soy Broth) para *Pseudomonas aeruginosa*. Uma suspensão bacteriana de 80 µL foi inoculada nos poços da placa com densidade ótica de 600 nm (OD₆₀₀) correspondente a uma OD de 0,150 (3x10⁸ ufc/ml) e adicionou-se 4 µL extrato a ser testado numa concentração de 100 µg/ml. Em seguida, foi realizada leitura de OD₆₀₀ nm no tempo 0h, em seguida a placa foi incubada em estufa a 37°C por 24horas. Após este período, foi realizado novamente leitura de OD₆₀₀ nm para determinar o crescimento bacteriano e comparar ao controle não tratado sem a presença do extrato e dessa forma identificar a atividade antibacteriana dos extratos.

As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* Newman ATCC 25904 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, cultivadas em meio Mueller Hinton Ágar durante 24 horas.

Para os ensaios de atividade antibiofilme a biomassa aderidas aos poços serão avaliados pelo método de coloração com cristal violeta, após o período de incubação para determinar a atividade antibacteriana como descrito acima, os poços das placas serão lavados com solução salina a 0,9% por 3 vezes para remoção das bactérias na sua forma plantônica, em seguida as placas foram mantidas por 1 hora em estufa a 60°C para fixação do biofilme formado, decorrido este tempo as placas foram coradas com cristal violeta a 0,4% durante 15 minutos, então a placa foi lavada com água para remoção do excesso de corante e foi adicionado álcool etílico absoluto e aguardou-se 30 minutos para realizar a leitura da placa em 570 nm para determinar a formação do biofilme.

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e os resultados exibidos representam a média e o desvio padrão médio de 3 ensaios realizados de forma independente. Os dados foram analisados utilizando o teste t de Student e ANOVA. As amostras foram consideradas significativas para um $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad-Prim 8.0.

2.6 Cultivo dos microrganismos endofíticos

Para realizar a identificação dos 33 microrganismos endofíticos selecionados, estes foram previamente cultivados em meio BDA até preenchimento total na placa de petri, em seguida 5 discos de aproximadamente 5 mm contendo os microrganismos foram inoculados em 100 ml de meio de caldo de batata, previamente autoclavados, e incubados em BOD a 28°C até que o micélio encostasse nas paredes do Erlenmeyer. Após esse período, em câmara de fluxo laminar os micélios foram separados do caldo, lavados com água destilada estéril e armazenados em freezer a -20°C para posterior identificação.

2.7 Identificação dos microrganismos endofíticos

A identificação dos microrganismos endofíticos foi realizada por meio de biologia molecular através da amplificação do DNA por PCR e sequenciamento da região internal transcribed spacer (ITS). As sequências de DNA foram alinhadas e os cromatogramas foram analisados utilizando o software Sequencher. Após obtenção das sequências os nucleotídeos foram analisados no BLASTn comparando as sequências obtidas com sequências do tipo “type” depositadas na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Para a edição, alinhamento das sequências e reconstrução filogenética as análises foram realizadas da seguinte forma: as sequências geradas foram submetidas à consulta de similaridade no banco de dados do NCBI através do algoritmo BLASTn. Para refinamento dos dados foi selecionado a opção de busca

por sequências ITS e 16S padrão. As sequências obtidas, juntamente com outras do GenBank, foram alinhadas utilizando o algoritmo MAFFT v7 (KATO e STANDLEY, 2013) através da plataforma EBI Tools (MADEIRA *et al.*, 2019) e verificadas manualmente utilizando o programa MEGA v11 (KUMAR *et al.*, 2016) e para as correções de erros no alinhamento foi utilizado do recurso TrimAI (CAPELLA *et al.*, 2009). A análise filogenética foi realizada na plataforma NGPhylogeny.fr (LEMOINE *et al.*, 2019) sendo utilizada análise de Neighbor-joining (SAITOU *et al.*, 1987) baseado em bootstrap de 1000 replicatas.

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento dos microrganismos endofíticos

Como resultado do isolamento dos microrganismos endofíticos foi possível isolar 69 microrganismos. Na tabela 1 podemos observar o panorama geral da quantidade de endofíticos isolados de acordo com a parte da planta e por espécie vegetal.

Tabela 1: Panorama geral da quantidade de microrganismos endofíticos isolados.

Espécies vegetais	Cascas	Folhas	Total isolados
<i>Anadenanthera colubrina</i> var. <i>cebil</i> (Griseb.) Altschul (Leguminosae) - Angico	0	3 (BDA)	3
<i>Myracrodruon urundeuva</i> Allemão (Anacardiaceae) Aroeira preta	5 (BDA); 3 (CAA)	2 (BDA); 1 (CAA)	11
<i>Ziziphus joazeiro</i> Mart. (Rhamnaceae) - Juazeiro	1 (BDA); 3 (CAA)	4 (BDA); 2 (CAA)	10

<i>Commiphora leptophloeos</i> (Mart.) J.B. Gillett (Burceraceae) Umburana/Amburana	4 (BDA); 3 (CAA)	5 (BDA); 6 (CAA)	18
<i>Mimosa tenuiflora</i> (Wild.) Poir. (Leguminosae) - Jurema preta	2 (BDA); 2 (CAA)	6 (BDA) 6 (CAA)	16
<i>Melocactus concinnus</i> Buining&Brederoo (Cactaceae) - 305	1 (BDA)		1
*<i>Melocactus glaucescens</i> Buining&Brederoo (Cactaceae) - 312	4 (BDA);		4
*<i>Melocactus concinnus</i> Buining&Brederoo (Cactaceae) - 326	6 (CAA)		6

*Para os cactos, as partes coletadas foram recortes do cacto, já que estes não possuem folhas nem cascas.

Ao analisar os 69 isolados endofíticos de acordo com suas características macroscópica, como cor e forma, observamos que existiam espécies com isolados em comum ou ainda que eram encontrados tanto nas cascas como nas folhas dentro de uma mesma espécie vegetal. Com base nesse critério, selecionamos apenas os microrganismos que eram diferentes entre si, desta forma essa triagem resultou em 33 isolados, como mostra a figura 2.

É possível observar a variedade de microrganismos endofíticos isolados entre as espécies vegetais coletadas. Os microrganismos seguiram para posterior identificação por biologia molecular por meio do sequenciamento da região ITS.

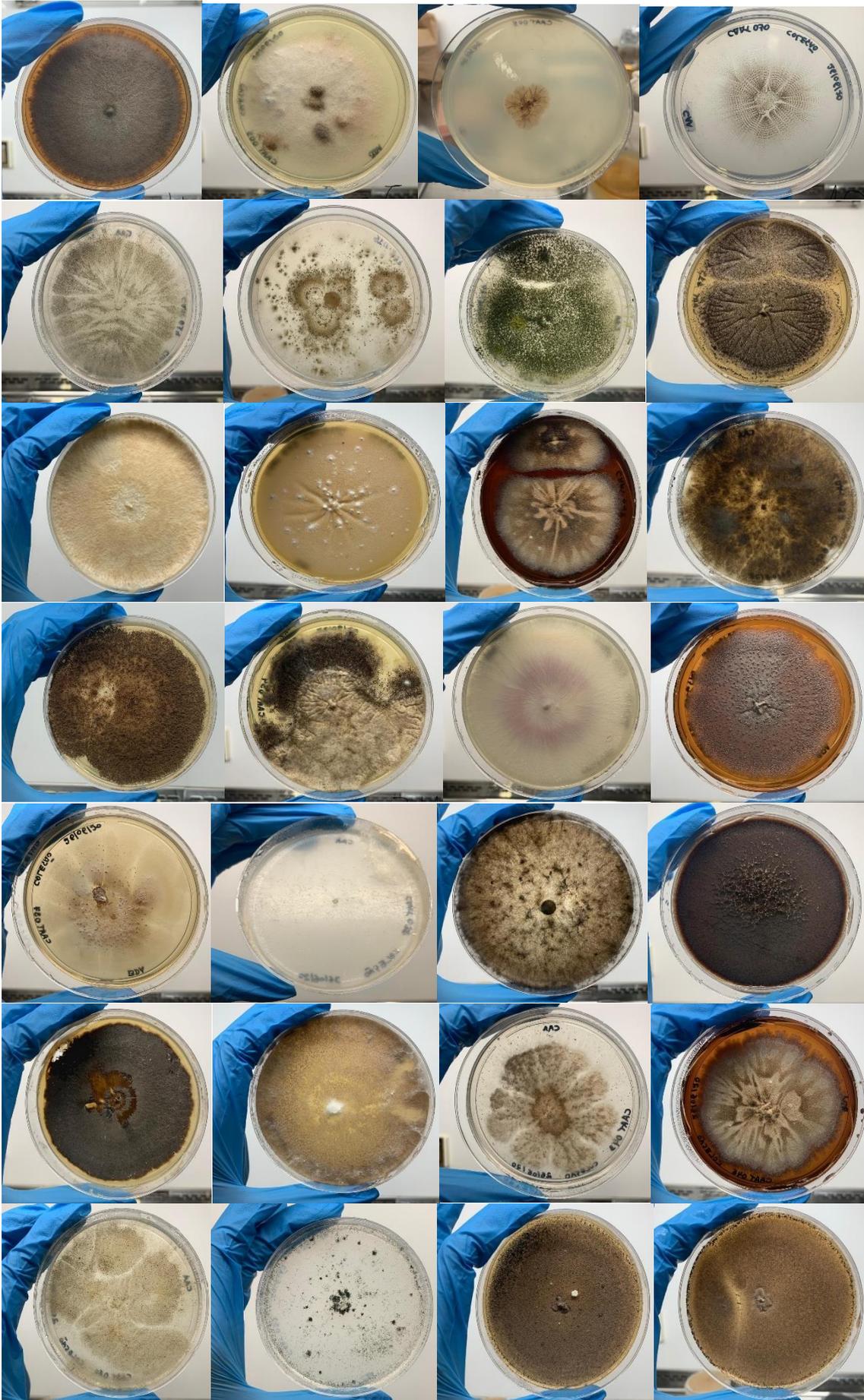




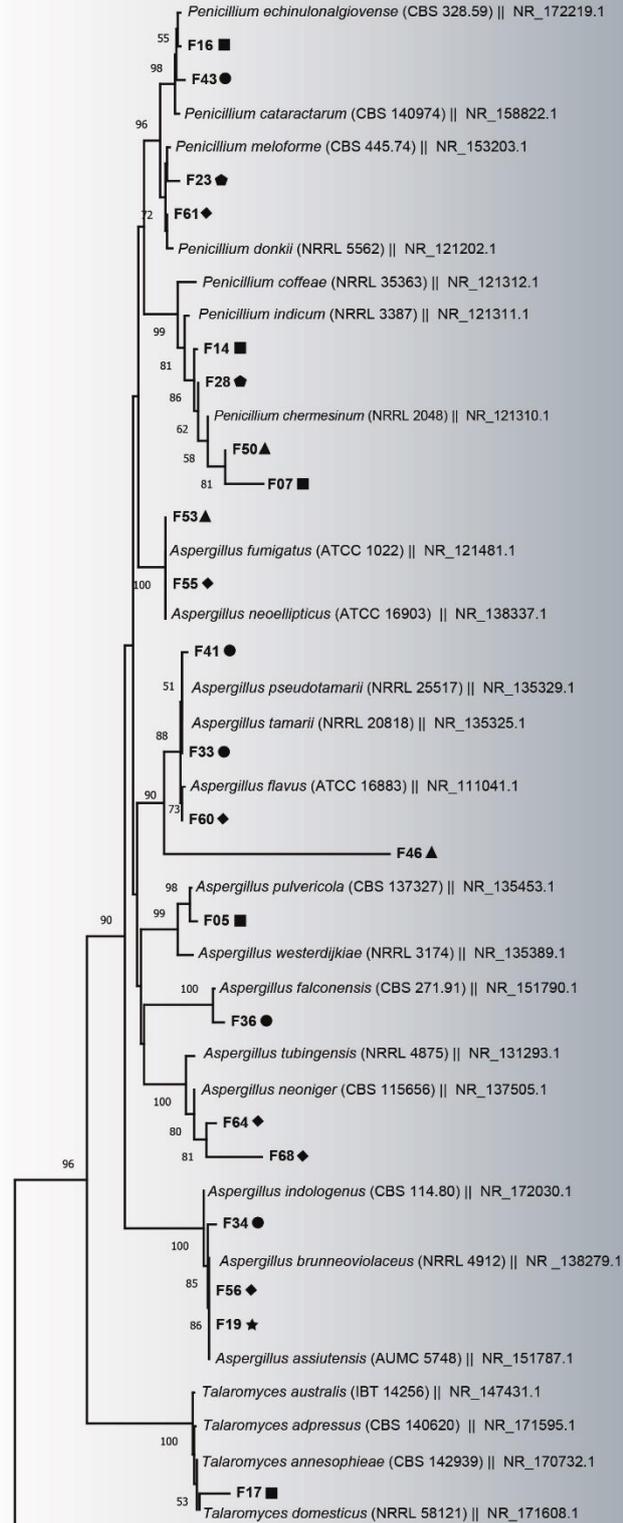
Figura 2: Microrganismos endofíticos isolados de plantas da Caatinga.

3.1.1 Análise filogenética dos microrganismos endofíticos

Como resultado da identificação dos microrganismos, construímos uma árvore filogenética com todos os 33 isolados endofíticos. Como resultado podemos observar na figura 5 abaixo que os isolados abrangem os reinos Fungi e Bacteria, sendo que a maioria dos endofíticos são da família Aspergillaceae pertencendo ao filo Ascomycota, classes Eurotiomycetes, ordem Eurotiales (WIJAYAWARDENE *et al.*, 2020).

Os fungos isolados pertencem ao gênero *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Talaromyces* sp. Outras famílias foram observadas neste isolamento, como Sordariaceae, Chaetomiaceae, Nectriaceae, Botryosphaeriaceae, Phaeotrametaceae e Pleosporaceae.

Os gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. foram os mais abundantes, observa-se ainda uma predominância do gênero *Aspergillus* em quase todas as espécies vegetais abordadas neste estudo para o isolamento dos endofíticos, demonstrando a diversidade deste gênero em mais de um grupo de árvore. Ao contrário de outras famílias que estiveram presentes em apenas um tipo de árvore, como é o caso da família Sordariaceae, Nectriaceae e Botryosphaeriaceae estando presentes apenas nos cactos. Deste isolamento apenas um endofítico bacteriano foi obtido, uma actinobactéria do gênero *Streptomyces* sp.



Aspergillaceae

FUNGI

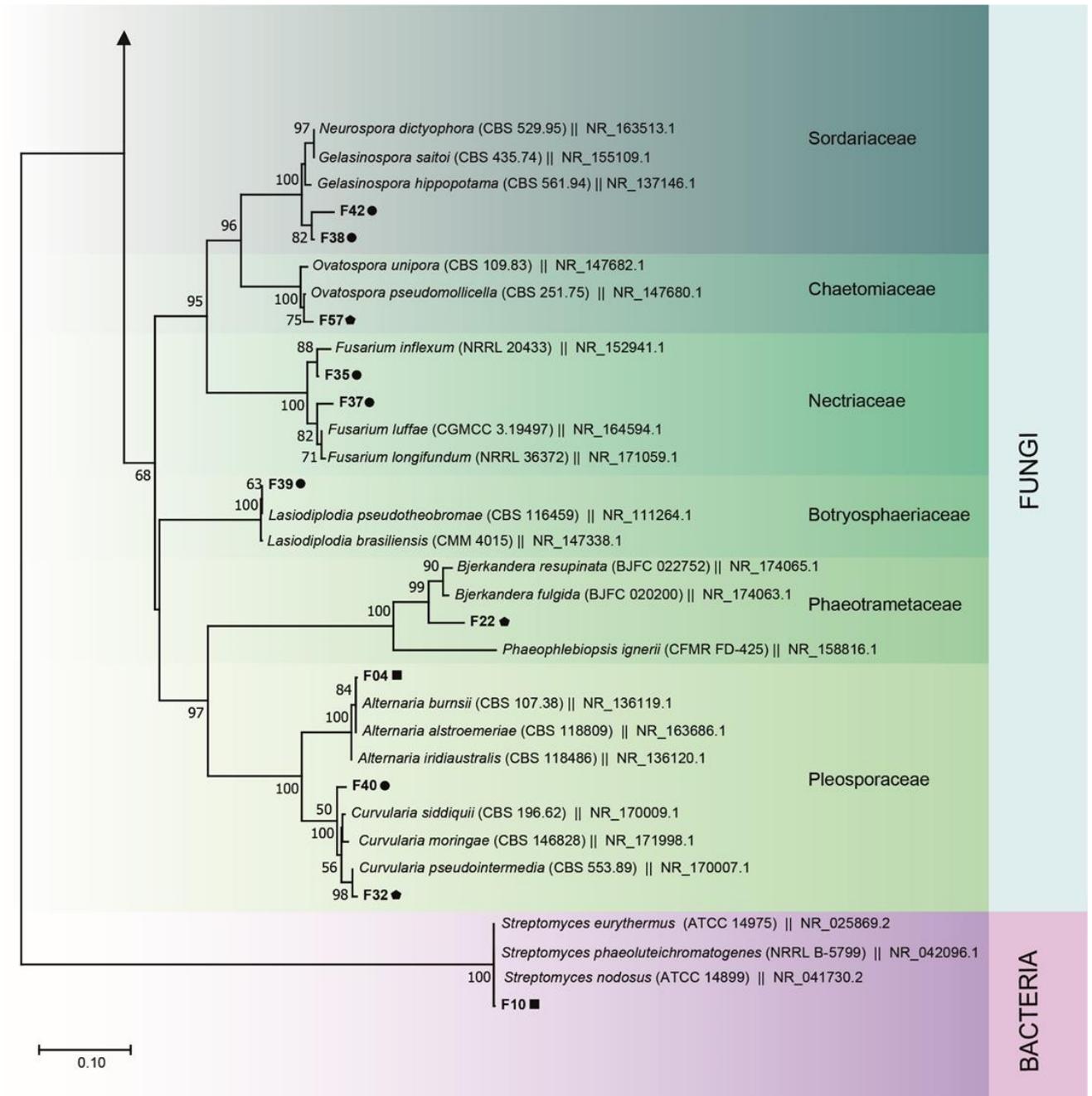


Figura 3: Árvore filogenética de microrganismos endofíticos isolados de plantas da Caatinga.

3.2 Obtenção dos metabólitos secundários

Como resultados da fermentação dos microrganismos endofíticos, foi realizada a fermentação de 12 microrganismos endofíticos escolhidos de forma

aleatória. A fermentação resultou em 12 extratos brutos e 8 extratos de micélio. Na tabela 2 é possível observar as quantidades obtidas de cada extrato bem como o volume da fermentação.

Tabela 2: Rendimento dos extratos brutos de acetato de etila e micélio.

Extrato	Massa (mg)		Volume fermentado (L)
	EBAcOEt	Micélio	
CAAT004	472,8	1,4958	3
CAAT005	473,5	2,4433	2,3
CAAT007	7,2679	6,7713	3
CAAT008	235,5	Não forma micélio	2
CAAT010	341,9	Não forma micélio	2
CAAT019	68,1	112,9	1
CAAT022	473,6	2,4593	2
CAAT023	183	6,8224	3
CAAT036	81,7	-	1
CAAT040	311,4	1,3645	2
CAAT056	54,8	215,7	1
CAAT068	343,7	820,9	2

“-este extrato foi perdido por contaminação externa.

Os extratos foram testados para avaliar as atividades antibacteriana e antiformação de biofilme contra as cepas *S. aureus* Newman ATCC 25904 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Nas figuras 4 e 5 está representado os resultados das atividades antibióticas e antiformação de biofilme dos extratos brutos de acetato de etila (EBAcOEt) testados na concentração de 100 µg/ml.

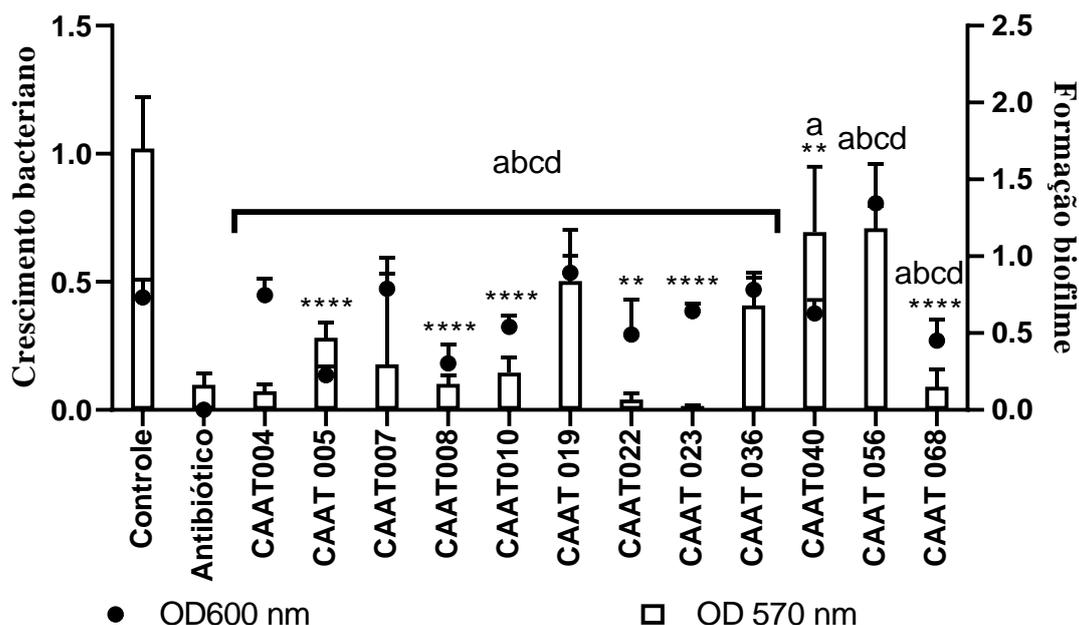


Figura 4: Análise antibiótica e antibiofilme dos extratos brutos de acetato de etila testados contra *S. aureus* Newman em uma concentração de 100 µg/ml. Os valores foram considerados significativos para um $P < 0,05$.

Para avaliação da atividade antibiótica, podemos observar as atividades no gráfico representado na figura acima dos seguintes extratos, CAAT005, CAAT008, CAAT 010, CAAT 022, CAAT 023, CAAT 040 e CAAT 068 apresentaram atividade antibiótica contra *S. aureus* Newman com porcentagens de atividade de 70%, 60%, 28%, 34%, 12%, 14% e 38%, respectivamente. Estes extratos apresentaram valores significativo para um $P < 0,05$, quando comparados com o grupo controle não tratado.

Para os resultados de antiformação de biofilme dos EBACOEt testados contra *S. aureus* Newman é possível observar o potencial de antiformação de biofilme de todos os extratos, CAAT004, CAAT005, CAAT007, CAAT008, CAAT010, CAAT 019, CAAT022, CAAT023, CAAT036, CAAT 040, CAAT 056 e CAAT068, com valores de inibição da formação de biofilme de 92%, 72%, 82%, 90%, 85%, 50%, 96%, 99%, 60%, 31%, 30% e 91%, respectivamente. No entanto para os extratos CAAT 005, CAAT 008, ao analisar as suas atividades antibiótica percebe-se que a inibição da formação do biofilme para estes extratos pode ser devido a ação antibiótica, pois a atividade antibiótica reflete na formação

Para a atividade antibiótica é possível observar que não houve atividade significativa para todos os extratos avaliados, para um $P < 0,05$, quando comparadas ao grupo controle não tratado. Enquanto para a avaliação da atividade de antiformação do biofilme os extratos CAAT004, CAAT 005, CAAT 007, CAAT 019, CAAT 022, CAAT 040, CAAT 056 e CAAT 068 apresentaram resultados positivos e significativos na inibição da formação do biofilme de *S. aureus* Newman, com valores de inibição de 81%, 40%, 58%, 25%, 58%, 42%, 32% e 40%, respectivamente. É importante ressaltar que para estes extratos não houve atividade antibacteriana significativa, sendo estes resultados interessantes para a atividade de antiformação de biofilme.

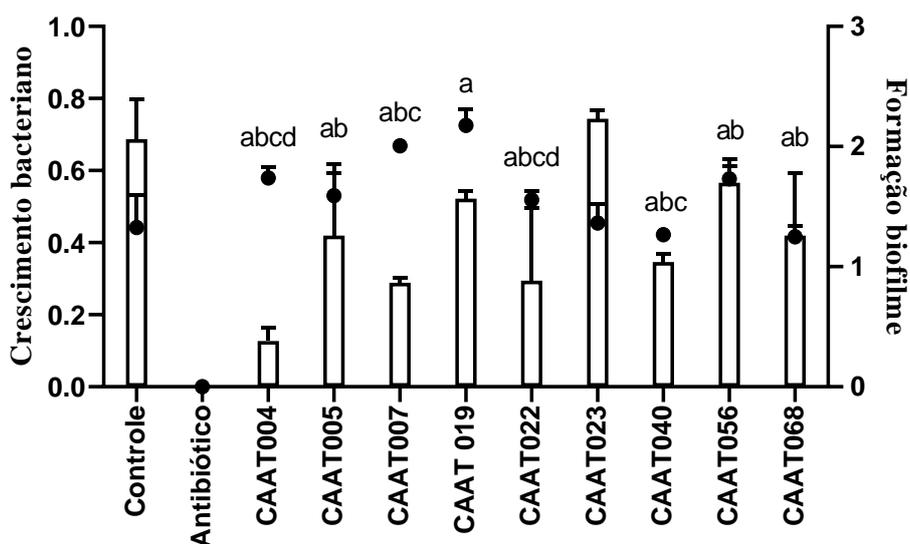


Figura 6: Análise antibiótica e antiformação de biofilme dos extratos de micélio testados contra *S. aureus* Newman em uma concentração de 100 µg/ml. $P < 0,05$.

Ao analisar a atividade antibiótica na figura 7 abaixo dos extratos de micélio contra *P. aeruginosa* observamos uma atividade antibiótica de 32% do extrato de micélio CAAT 007 este resultado se mostrou significativo, para um $P < 0,05$, quando comparado com o controle não tratado. No entanto, nenhum dos demais extratos testados foi capaz de inibir a formação de biofilme de *P. aeruginosa*.

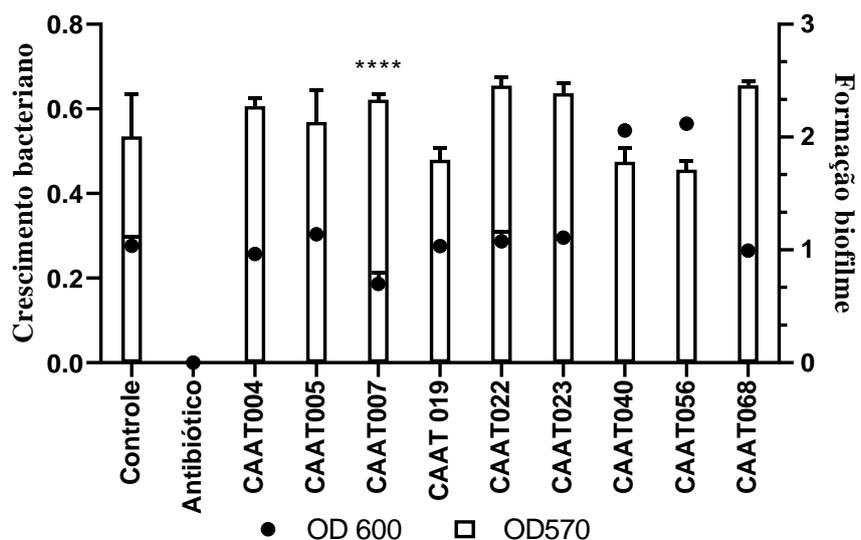


Figura 7: Análise antibiótica e antiformação de biofilme dos extratos de micélio testados contra *P. aeruginosa* em uma concentração de 100 µg/ml. $P < 0,05$.

As fases aquosas resultantes da extração do caldo fermentado também foram testadas contra as cepas de *S. aureus* Newman e *P. aeruginosa* na concentração de 100 µg/ml, os resultados das fases testadas estão representados nas figuras 8 e 9, respectivamente abaixo.

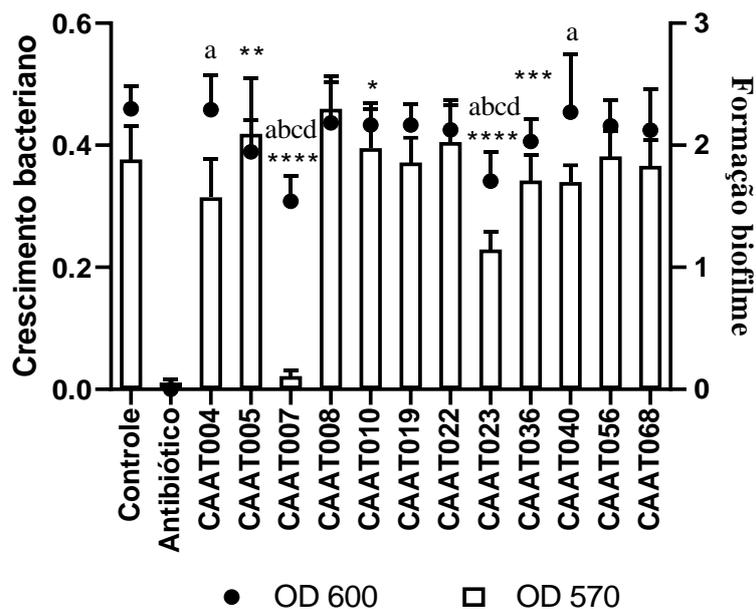


Figura 8: Análise antibiótica e anti formação de biofilme das fases aquosas testados contra *S. aureus* Newman em uma concentração de 100 µg/ml. P<0,05.

Dos resultados das atividades antibióticas dos extratos aquosos contra *S. aureus* Newman exibidos na figura 8 acima, podemos observar que os extratos CAAT005, CAAT007, CAAT010, CAAT023, CAAT 036 foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, com inibições de 6%, 12%, 4%, 18%, 3%, respectivamente. Os demais extratos não apresentaram atividade antibiótica significativa quando comparados com o grupo controle não tratado. Para a inibição da formação do biofilme apenas os extratos CAAT004, CAAT007, CAAT023 e CAAT040 foram ativos inibindo em 8%, 91%, 36% e 10% do biofilme de *S. aureus*.

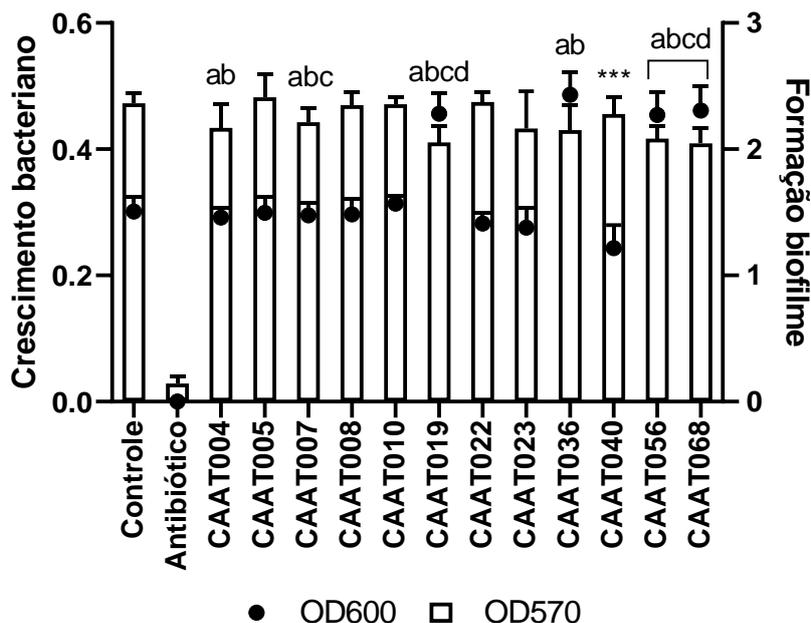


Figura 9: Análise antibiótica e anti formação de biofilme das fases aquosas testados contra *P. aeruginosa* em uma concentração de 100 µg/ml. P<0,05.

Quanto a avaliação da atividade antibiótica dos extratos aquosos contra *P. aeruginosa* podemos observar na figura 9 acima, que apenas os extratos CAAT040 foi ativo contra o crescimento *P. aeruginosa* inibindo em 19% o seu crescimento. Para inibição da formação do biofilme as fases aquosas dos extratos CAAT004, CAAT007, CAAT 019, CAAT 036, CAAT 056 e CAAT 068 inibiram 8%, 6%, 3%, 2%, 4% e 8%, respectivamente.

Além dos EBAcOEt, extratos de micélio e extrato das fases aquosa, obtivemos também extratos metanólicos e hexânicos oriundos de uma partição realizada com o EBAcOEt afim de separar mais ainda os compostos presentes naquele extrato. Sendo assim, a figura 10 e 11 abaixo traz os resultados das atividades antibacteriana e de anti formação de biofilme destes extratos contra *S. aureus* Newman e *P. aeruginosa*. As concentrações testadas para estes extratos metanólicos foi de 100 µg/ml, no entanto para alguns extratos da fase hexânica não foi possível testar na concentração de 100 µg/ml devido à baixa quantidade obtida

na extração, são eles, o extrato CAAT004 foi testado na concentração de 74 µg/ml e o extrato CAAT008 a concentração testada foi de 40 µg/ml.

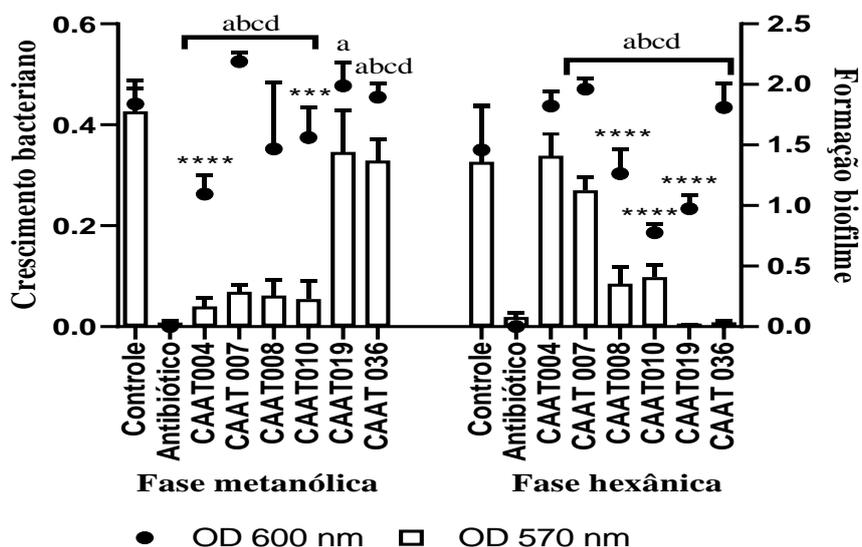


Figura 10: Análise antibiótica e antiformação de biofilme das fases metanólicas e hexânicas testados contra *S aureus* Newman. P<0,05.

Como observado na figura 10 acima, para as fases metanólicas dos extratos testados é possível observar uma atividade antibiótica dos extratos CAAT004 e CAAT010 com porcentagens de inibição do crescimento bacteriano de 40% e 15%, respectivamente. Para os extratos da fase hexânica os extratos que exibiram atividade antibiótica foram CAAT008, CAAT010 e CAAT019, com porcentagens de atividade antibiótica de 31%, 57% e 46%, respectivamente.

Para análise da atividade de antiformação do biofilme todos os extratos da fase metanólica foram ativos contra *S. aureus* com inibições de 90% para o extrato CAAT004, 83% de inibição para o extrato CAAT007, 85% do extrato CAAT008, 87% para o extrato CAAT010, 18% para o extrato CAAT019 e 22% para o extrato CAAT036. A fase hexânica apresentou atividade de antiformação do biofilme dos seguintes extratos CAAT007, CAAT008, CAAT010, CAAT019 e o CAAT036, com porcentagens de inibição de 36%, 80%, 76%, 99% e 97%, respectivamente.

Estes mesmos extratos também foram avaliados quanto a sua atividade antibiótica e antiformação do biofilme contra *P. aeruginosa* como demonstrado na figura 11 abaixo.

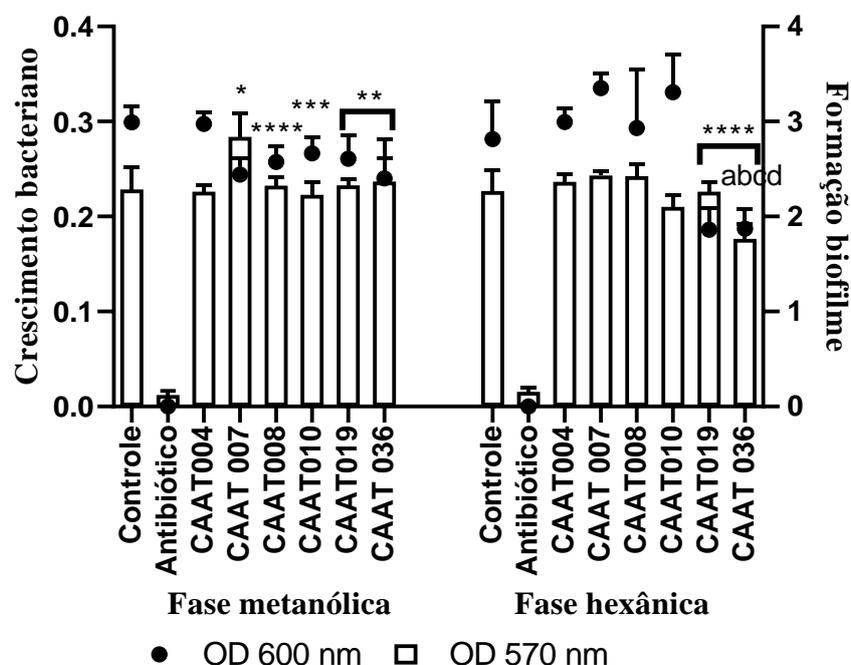


Figura 11: Análise antibiótica e antiformação de biofilme das fases metanólicas e hexânicas testados contra *P. aeruginosa*. $P < 0,05$.

Como demonstrado na figura acima, podemos observar que os extratos da fase metanólica CAAT007, CAAT008, CAAT010, CAAT019 e CAAT036 exibiram inibição do crescimento de *P. aeruginosa* de 18%, 13%, 12% e 19%, respectivamente. Dos extratos das fases hexânicas apenas os extratos CAAT019 e CAAT036 apresentaram atividade antibiótica contra *P. aeruginosa* com porcentagem de atividade de 37% para ambos os extratos. Quanto a avaliação da atividade de anti-formação do biofilme, apenas o extrato hexânico CAAT036 foi ativo com inibição do biofilme *P. aeruginosa* de 22%.

4.0 CONCLUSÃO

A grande maioria das estimativas de diversidade de fungos são realizadas com o auxílio da biologia molecular que permitem identificar com maior precisão as espécies e relacionar a filogenia entre elas, classificando-os da melhor forma dentro dos táxons (ARNOLD *et al.*, 2000). Neste estudo com o auxílio de ferramentas moleculares e por meio de análises filogenéticas foi possível identificar de 33 endofíticos e realizar a anotação dos isolados de cada planta coletada da região da Caatinga.

A diversidade de microrganismos endofíticos isolados da Caatinga mais precisamente na região semiárida, demonstra que existe biodiversidade neste bioma que por muitas vezes é subestimado, desta forma é preciso ressaltar e investigar a biodiversidades de regiões secas como a Caatinga, primeiro pelo fato de que esse tipo de clima é predominante em cerca de 30% do planeta (PEEL *et al.*, 2007) e segundo por que regiões secas se apresentam como um ambiente de pesquisa promissor devido aos desafios ambientais enfrentados pelas espécies que ali vivem (BEZERRA, 2016).

Neste estudo do isolamento de microrganismos endofíticos de plantas da Caatinga, destaca-se o isolamento de fungos pigmentados, como por exemplo espécies de *Alternaria burnsii*, *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. A produção de melanina por fungos endofíticos pode estar relacionada com a relação simbiótica entre fungo/hospedeiro. De acordo com Redman e colaboradores (2002) a produção de melanina pelos fungos dissipa o calor ao longo das hifas e o endofítico pode ainda ativar prontamente o sistema de defesa fazendo com que a planta responda de forma imediata ao estresse térmico. Além de conferir proteção contra o estresse das altas temperaturas, os endofíticos demonstram ainda a capacidade de tolerarem a altas radiações UV e de seca intensa (HUBBARD *et al.*, 2014).

Fungos endofíticos podem ter preferência de colonização, seja pelas famílias de plantas, fisiologia da planta, localização desta e até mesmo pela textura do tecido (PHOTITA *et al.*, 2001). Os resultados obtidos neste capítulo corroboram com esta informação, uma vez que se observou um maior número de

microrganismos isolados em uma determinada planta do que em outra, mesmo sendo plantas coletadas em uma mesma região. Outra informação que vale a pena ressaltar é que foi observado diferenças entre os isolados de acordo com a parte vegetal coletada dentro de uma mesma espécie de planta. Microambientes como por exemplo copas de árvores, clareiras, ambientes áridos e ambientes com alternância de períodos de chuva e de seca podem influenciar no tipo de endofítico isolado (HOFFMAN e ARNOLD, 2008).

De acordo com Arnold e colaboradores (2000) o número de fungos endofíticos isolados de regiões secas pode estar relacionado em virtude da baixa umidade do ar uma vez que esta é uma característica importante pois influência na esporulação, além das características da vegetação. O clima também é um fator determinante (COLLADO *et al.*, 1999). Além de que microrganismos de regiões secas sofrem uma maior seleção para colonizar o seu hospedeiro (HOFFMAN e ARNOLD, 2008).

Mesmo havendo um avanço sobre a biodiversidade de endofíticos isolados de regiões áridas, ainda sim a literatura concentra mais dados sobre o isolamento de endofíticos oriundos de regiões úmidas. Dos poucos estudos sobre endofíticos de áreas secas, alguns deles relatam o isolamento de endofíticos dos cactos *Cereus jamacuru* e *Opuntia ficus-indica* (BEZERRA *et al.*, 2012; 2013), outro estudo relata 22 espécies de endofíticos presentes em cactos em áreas desérticas do Arizona (SURYANARAYANAN *et al.*, 2005), bactérias endofíticas foram isoladas da espécie de cacto *Opuntia ficus-indica* Mill isolado do semiárido nordestino brasileiro (COSTA e MELO, 2012). Bezerra (2016) avaliou a diversidade de fungos endofíticos associados a *Pilosocereus gounellei* subsp. *gounellei*, *Melocactus zehntneri* e *Tacinga inamoena* em áreas de Caatinga preservada e em áreas com agricultura familiar sustentável no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil.

Este estudo permitiu o isolamento de 11 fungos endofíticos obtidos das Cactaceae, sendo as espécies de *Melocactus glaucencis* Buining & Brederoo e *Melocactus concinnus* Buining & Brederoo, 3 endofíticos de *Anadenanthera*

colubrina (Angico), 11 endofíticos de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira preta), 10 endofíticos de *Ziziphus joazeiro* (Juazeiro), 18 endofíticos da *Commiphora leptophloeos* (Amburana) e 16 endofíticos de *Mimosa tenuiflora* (Jurema preta). Os cactos e as demais espécies abordadas representam um importante grupo de estudo em virtude das suas características com interessantes adaptações intrínsecas a região em que vivem, além de contribuir para o conhecimento acerca da biodiversidade endofítica da Caatinga.

O isolamento dos microrganismos da Caatinga resultou em 69 isolados endofíticos, em que 33 destes foram identificados e 12 deles foram avaliados quanto a suas atividades antibiótica e antibiofilme contra as bactérias *S. aureus* Newman e *P. aeruginosa*. A partir dos dados obtidos neste capítulo, dois microrganismos foram selecionados para aprofundamento das suas atividades antibacteriana e antibiofilme, bem como realizar a caracterização química dos seus metabólitos.

CAPÍTULO 3: Silva, Dayse Pereira Dias; Da Rosa, Deisiane Fernanda; De Felício, Rafael; Trivella, Daniela Barretto Barbosa; Landell, Melissa Fontes; Macedo, Alexandre José. Chemical characterization of secondary metabolites of the endophytic *Alternaria burnsii* isolated from the Brazilian Caatinga. Manuscrito a ser submetido

O capítulo 3, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as 135 -180, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da caracterização química, atividade antibacteriana e antibiofilme, além da identificação do microrganismo endofítico e análise do seu genoma.

CAPÍTULO 4: Silva, Dayse Pereira Dias; Da Rosa, Deisiane Fernanda; De Felício, Rafael; Trivella, Daniela Barretto Barbosa; Landell, Melissa Fontes; Macedo, Alexandre José. Chemical characterization of secondary metabolites of *Penicillium chermesinum* isolated from *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett (Burceraceae) (Umburana) from Caatinga. Manuscrito a ser submetido.

O capítulo 4, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as 181 -206, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da caracterização química, atividade antibacteriana e antibiofilme e identificação do microrganismo endofítico.

DISCUSSÃO GERAL

As dificuldades enfrentadas no tratamento de infecções associadas a biofilmes estão intrinsicamente relacionadas com os mecanismos de resistência próprios da comunidade do biofilme, além da limitada difusão encontrada pelos antibióticos na matriz extracelular. Esses fatores tornam as bactérias de dentro do biofilme muito mais tolerantes que as bactérias planctônicas. Desta forma é preciso pensar em estratégias mais eficazes para desfazer ou inibir a formação dos biofilmes (HOIBY *et al.*, 2010).

A resistência microbiana é um fator muito importante e preocupante uma vez que genes de resistência aos antimicrobianos estão presentes principalmente em bactérias causadoras de doenças, além de que os microrganismos desenvolveram resistência a todas as classes de antibacterianos aprovadas até hoje (LARSSON e FLACH, 2022).

Algumas estratégias para a problemática dos biofilmes podem ser encontradas na imensidade de moléculas obtidas a partir dos produtos naturais. Os microrganismos endofíticos são boas fontes para a obtenção de moléculas promissoras pelo fato de produzirem uma infinidade de substâncias bioativas. A diversidade de moléculas obtidas a partir dos microrganismos endofítico demonstra a importância deste nicho para a pesquisa tendo como alvo os biofilmes bacterianos.

A grande variabilidade de microrganismos endofíticos existentes é notória como reportado por Silva e colaboradores (2022) que relataram diversos fungos endofíticos isolados, bem como um total de 166 moléculas isoladas a partir destes fungos endofíticos. As moléculas isoladas relatadas apresentaram atividade antibiótica contra bactérias Gram-negativas. Além dos resultados apresentados neste estudo sobre metabólitos secundários isolados de endofíticos. Estima-se que existam milhares de endofíticos ainda sem relato (FAETH e FAGAN., 2002; FAETH e HAMMON., 1997).

Neste trabalho nós obtivemos o isolamento de 69 microrganismos endofíticos da Caatinga, destes, 33 foram identificados e tiveram sua árvore filogenética construída, além disso dois endofíticos *Alternaria burnsii* e

Penicillium chermesinum isolados da planta *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett (Burceraceae), tiveram seus extratos fracionados e avaliados para atividade antibiótica e antibiofilme. A caracterização das frações do extrato de micélio do endofítico *A. burnsii* resultou na anotação de 18 moléculas identificadas por desreplicação, as moléculas Tentoxina B, dihidrotentoxina e ácido secalônico A, foram apontadas como as principais responsáveis pela atividade antibiótica observada contra *S. aureus* Newman. Essa análise é realizada por correlação que considera a atividade biológica observada e a abundância da molécula na fração ativa.

O número de endofíticos descritos só tende a crescer, acredita-se que cerca de 1,5 milhões de espécies ainda serão descobertas (HAWKSWORTH, 1991). Um levantamento mais recente é de que esse número possa ser ainda maior chegando a 5 milhões de endofíticos a serem descobertos (BLACKWELL, 2011). Essa teoria faz sentido quando observamos as mais de 300 mil espécies de plantas e poucas dessas foram completamente estudadas quanto aos seus microrganismos endofíticos (STROBEL *et al.*, 2002).

Microrganismos endofíticos são comumente encontrados nos mais diversos tipos de vegetais, em espécies tropicais (ARNOLD e HERRE, 2003) e em zonas áridas como no deserto de Sonoran na América do Norte (MASSIMO *et al.*, 2015). As plantas coletadas neste estudo abrangem as mais variadas famílias como Leguminosae, Rhamnaceae, Burceraceae, Anacardiaceae e Cactaceae. Neste estudo nós isolamos 69 microrganismos endofíticos de 5 árvores e de 2 espécies de cactos, todas as espécies típicas da Caatinga. Dentre os isolados nós observamos uma grande variabilidade de espécies obtidas demonstrando que muitas vezes uma mesma espécie vegetal é hospedeira de mais de um tipo de endofítico, e em outros casos apenas um único tipo de endofítico foi isolado por espécie. Muitas vezes o fato de obtermos apenas um isolado por espécie vegetal vai de encontro com as necessidades da planta, estas muitas vezes permitem a presença de determinados endofíticos por questões de necessidades nutricionais e de sobrevivência, exatamente por precisarem de uma troca de compostos oferecidos por esses

endofíticos que são necessários para a sobrevivência do hospedeiro (FAETH e HAMMON, 1997).

Esse é o caso de plantas típicas de regiões secas e áridas como a Caatinga. Essas plantas possuem características peculiares de sobrevivência como diferenciação de folhas para espinhos e acúleos como forma de adaptação a escassez das chuvas e desta forma obter um maior armazenamento de água (MEIADO *et al.*, 2015). A própria associação com os endofíticos também são mecanismos de sobrevivência, uma vez que estes conferem tolerância a altas temperaturas (REDMAN *et al.*, 2002), produção de moléculas que atuam por exemplo na proteção da planta contra raios UV, produção de toxinas conferindo proteção contra herbívoros, entre outros (HUBBARD *et al.*, 2014).

Os metabólitos secundários ativos obtidos da espécie *Commiphora leptophloeos* (Amburana) abrangem as diferentes classes químicas. Para o extrato de micélio do endofítico de *A. burnsii* algumas classes químicas foram descritas como alcaloides, terpenos, quinonas, dicetopiperazinas, citocininas, cumarinas, nucleosídeos, benzopiranos, lipídeos, ester e naftoquinonas.

Alguns estudos sobre o potencial biológico dos fitoquímico de *Commiphora leptophloeos* tem sido relatado na literatura. Pereira e colaboradores (2017) observaram atividade antimicrobiana do extrato das cascas de *C. leptophloeos* contra várias bactérias Gram-positivas como *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*. A investigação do perfil químico da *C. leptophloeos* detectou a presença de compostos fenólicos como os ácidos gálico, clorogênico e protocatecuico, flavonóides e taninos, esses compostos são conhecidos por serem agentes antimicrobianos.

Bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa* são importantes patógenos que preocupam devido a sua resistência a diversos tratamentos, isso se deve aos diferentes mecanismos de resistência conferido por esta bactéria como produção de β -lactamases que interferem na ação de antibióticos β -lactâmicos e bombas de efluxo que diminuem o acúmulo intracelular da droga (GASPAR *et al.*, 2013).

Outro estudo avaliando o extrato de *C. leptophloeos* observou inibição do biofilme e efeito bacteriostático de *P. aeruginosa* (TRENTIN *et al.*, 2013).

Dantas-Medeiros e colaboradores (2021) relataram atividade antibiofilme contra espécies de *Candidas* sp., essa atividade foi atribuída a presença de taninos condensados do tipo Proantocianidinas poliméricas do tipo B no extrato de *C. leptophloeos*. Cordeiro *et al* (2021) observaram atividade antioxidante do extrato de *C. leptophloeos*, os autores identificaram diversos compostos como compostos fenólicos, terpenos, flavonoides, saponinas e taninos e atribuíram a presença destes compostos a atividade antioxidante observada.

Como demonstrado acima os estudos envolvendo *C. leptophloeos* trazem dados sobre o perfil fitoquímico da espécie vegetal, porém não há relatos do isolamento dos seus microrganismos endofíticos e seus metabólitos secundários. Para seu melhor conhecimento este trabalho traz o isolamento até então não relatado dos endofíticos presentes em *C. leptophloeos* além da investigação dos seus metabólitos secundários e suas atividades antibacteriana e antibiofilme.

Diante dos resultados positivos para as atividades antibiótica e antibiofilme, analisamos a toxicidade das frações ativas e obtivemos um bom resultado do perfil tóxico das frações e desta forma nos permitiu decidir sobre o potencial futuro daquela fração. O modelo *in vivo* de *G. mellonella* utilizado para avaliação da toxicidade é uma opção vantajosa para o estudo de toxicidade e de agentes patogênicos em humanos, uma vez que esses invertebrados possuem semelhança evolutivas com os humanos, além da sua fácil manipulação, possuem semelhança com o sistema imune inato de vertebrados com alto grau de estruturas semelhantes (LIONASKI, 2011; GLAVIS-BLOOM *et al.*, 2012).

Estudos envolvendo modelos de *G. mellonella* conferem vantagem pois estes invertebrados possuem uma resposta imune altamente eficaz e adaptada capaz de lidar com uma ampla variedade de patógenos, a semelhança do sistema imune inato dos invertebrados com o sistema imune dos mamíferos torna o seu uso muito interessante, pois fornece informações obtidas nos invertebrados sobre o funcionamento dos mamíferos (KAVANAGH e REEVES, 2004).

Insetos como *G. mellonella* apresentam estruturas celulares semelhantes à dos mamíferos como por exemplo hemolinfa que se assemelha ao sangue nos mamíferos sendo responsável pelo transporte de nutrientes e moléculas sinalizadoras. Os hemócitos são responsáveis pela defesa celular e humoral, os tipos de defesa celular envolvidos no sistema imune das *G. mellonella* são fagocitose, encapsulamento, melanização e eliminação de toxinas (MATHA e MRACEK, 1984). Estes componentes são necessários para o entendimento dos processos de infecção bacteriana e para avaliar a toxicidade potencial de novos compostos (TSAI *et al.*, 2016).

Modelo de *G. mellonella* são fundamentais para avaliar a ação de moléculas e desta forma determinar a eficácia de agentes antimicrobianos e sua resposta aproximada em humanos, por exemplo (THOMAS *et al.*, 2013). Outro fato vantajoso das larvas é que elas podem ser mantidas a 37 °C, uma qualidade importante quando se analise possíveis moléculas com aplicação em humanos (HOFFMANN, 1995), além de não necessitarem de aprovação de comitês de ética para utilização (TSAI *et al.*, 2016).

Neste contexto, este trabalho contribui para a valorização da biodiversidade microbiana endofítica de espécies de plantas típicas da Caatinga, trazendo informações importantes a respeito da abundância endofítica e química presente neste bioma. Além de fornecer as atividades biológicas antimicrobiana e antibiofilme destes metabólitos. É importante ressaltar que a literatura traz muitos dados sobre os metabólitos secundários obtidos a partir da matéria prima vegetal dessas plantas da Caatinga, no entanto, os dados referentes a microbiota endofítica ainda é escasso.

Por fim, muitas dessas moléculas não haviam sido reportadas até então em espécies de *A. burnsii* e não há relatos na literatura quanto a suas atividades antibiofilme. Os resultados apresentados aqui são importantes diante da problemática encontrada no combate dos biofilmes pois contribuem e direcionam para futuras pesquisas na área de biofilmes bacterianos.

CONCLUSÕES

- As espécies vegetais típicas da Caatinga analisadas quanto a suas espécies endofíticas se mostraram ricas em fungos endofíticos, sendo a grande maioria dos isolados fungos endofíticos da família Aspergilaceae, apenas uma actinobactéria foi isolada deste estudo;
- A espécie *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett (Burceraceae) foi a espécie que apresentou maior riqueza de endofíticos isolados;
- Os endofíticos *Alternaria burnsii* e *Penicillium chermesinum* identificados de *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett (Burceraceae) produziram metabólitos ativos na inibição do crescimento bacteriano de *S. aureus* Newman e *P. aeruginosa*. Além de apresentar atividade antibiofilme contra *S. aureus* Newman;
- As frações enriquecidas dos extratos de micélio dos endofíticos *A. burnsii* e *P. chermesinum* apresentaram toxicidade em modelo de *G. mellonella*;
- A maioria das frações dos extratos EBAcOEt de *A. burnsii* e *P. chermesinum* não foram tóxicas para o modelo de *G. mellonella*;
- A predição do genoma de *A. burnsii* possibilitou realizar a anotação de alguns possíveis metabólitos da espécie e estes foram de encontro aos metabólitos anotados neste estudo com o auxílio de técnicas de desreplificação.

PERSPECTIVAS

A fim de complementar os resultados até então obtidos neste trabalho, temos como perspectivas futuras:

1. Concluir a caracterização química das frações obtidas;
2. Realizar os ensaios de proteção das frações em modelos de *G. mellonella* contra os patógenos avaliados nesta tese;
3. Avaliar a viabilidade das células bacterianas do biofilme;
4. Avaliar a morfologia do biofilme por meio de técnicas microscópicas como SEM a fim de obter imagens do biofilme tratados com as frações ativas;
5. Finalizar a anotação genômica das duas espécies fúngicas, *Alternaria burnsii* e *Penicillium chermesinum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-LIMA, D. de. **Estudos fitogeográficos de Pernambuco (reedição)**. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, v. 4, p.243-274, 2007.

ARAÚJO, W. L. *et al.* **Manual de isolamento de microrganismos endofíticos**. Piracicaba, 86 p, 2002.

ARAÚJO FILHO, J. C. de. Relação solo e paisagem no bioma Caatinga. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA FÍSICA APLICADA, 14., 2011, Dourados. "Dinâmicas socioambientais das inter-relações às interdependências". **Anais eletrônicos [...]** Dourados: UFGD, 2011. **Embrapa solos**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/38909/1/Coelho-XIV-SBGFA-1.pdf>

ARNOLD, A. E., HERRE, E. A. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). **Mycologia**, v. 95, p. 388–398, 2003.

AZEVEDO, J. L. Micro-organismos endofíticos. In: MELLO, I. S., AZEVEDO, J. L. (ed.). **Ecologia microbiana**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, p. 17 – 137, 1998.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química nova**. v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.

BEECH, I.B., SUNNER, J.A., ARCIOLA, C.R., CRISTIANI, P. Microbially-influenced corrosion: Damage to prostheses, delight for bacteria. **The International Journal of Artificial Organs**. v. 29, n.4, p. 443-452, 2006.

BEZERRA, J. D. P., SANTOS, M. G. S., SVEDESE, V. M., LIMA, D. M. M., FERNANDES, M. J. S., PAIVA, L. M., SOUZA-MOTTA, C. M. Richness of endophytic fungi isolated from *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. **World J Microbiol Biotechnol**, v.28, p. 1989–1995, 2012. Doi:10.1007/s11274-011-1001-2

BEZERRA, J. D. P., SANTOS, M. G. S., BARBOSA, R. N., SVEDESE, V. M., LIMA, D. M. M., FERNANDES, M. J. S., GOMES, B. S., PAIVA, L. M., ALMEIDA-CORTEZ, J. S., SOUZA-MOTTA, C. M. Fungal endophytes from cactus *Cereus jamacaru* in Brazilian tropical dry forest: a first study. **Symbiosis**, v. 60, p. 53-63, 2013.

BEZERRA, J. D. P. **Fungos endofíticos em cactos de áreas de Caatinga preservada e com atividade de agricultura familiar: diversidade e estudo filogenético**. 2016. 83f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Recife, 2016.

BRYERS, J. D. Medical Biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, p. 1-18, 2008.

- CALLOU, M. J. A., MIRANDA, R. C. M., FEITOSA, T. R., ARRUDA, F. V. F., NASCIMENTO, M. S., GUSMÃO, N. B. Avaliação da atividade antimicrobiana da casca de *Mimosa caesalpinifolia* Benth (Sabiá). **Scientia Plena**. v. 8, n. 1, 2012.
- CAMILLI, A., BASSLER, B. L. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. **Science**. v. 311, p. 1113-1116, 2006.
- CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopath Mycol appl**. v. 20, p. 1–6, 1963.
- CDC - Centers for Disease Control. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019.
- CHAPLA, V. M. **Estudo químico e biológico do fungo endofítico *Phomopsis sp.* isolado da *Senna spectabilis***. 2010. 176f. Dissertação (Mestrado em química) – Instituto de química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2010.
- CHAPLA, V. M., BIASSETTO, C. R., ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de novos e Bioativos Produtos Naturais. **Rev. Virtual Quim.**, v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.
- COLLADO, J., PLATAS, G., GONZÁLEZ, I., PELÁEZ, F. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex*. **New Phytol.**, v.144, p. 525–532, 1999.
- CORDEIRO, M. L. S., RIBEIRO, A. R. C., MELO, L. F. M., SILVA, L. F., FIDELIS, G. P., SILVA, L. M. P., *et al.*, Antioxidant Activities of *Commiphora leptophloeos* (Mart.) J. B. Gillett) (Burseraceae) Leaf Extracts Using In Vitro and In Vivo Assays. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2021, p. 3043720, 2021. doi: 10.1155/2021/3043720.
- COSTA, F. E. C., MELO, I. S. Endophytic and rhizospheric bacteria from *Opuntia ficus-indica* mill and their ability to promote plant growth in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n.6, p. 1345-1353, 2012. Doi: 10.5897/AJMR11.1503
- CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure Appl. Chem.**, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.
- D' COSTA, V. M., *et al.* Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, p. 457-461, 2011.
- DANTAS-MEDEIROS, R., ZANATTA, A. C., SOUZA, L. B. F. C., FERNANDES, J. M., AMORIM-CARMO, B., TORRES-RÊGO, M., FERNANDES-PEDROSA, M. F., *et al.*, Antifungal and Antibiofilm Activities of B-Type Oligomeric Procyanidins From *Commiphora leptophloeos* Used Alone or in Combination With Fluconazole Against *Candida* spp. **Front. Microbiol.**, v.12, p. 613155. 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.613155

- DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature review drug disc.** v. 2, p, 114-122. 2003.
- De BARY, A., Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten und myxomyceten. **Leipzig: Engelamn**, 316p. 1866.
- DUARTE, D. F. Uma Breve História do Ópio e dos Opióides. Opium and Opioids: A Brief History. **Rev. Bras. Anestesiol.**, v. 55, n. 1, p. 135-146, 2005.
- FAETH, S. H., HAMMON, K. E. Fungal endophytes in oak trees: long-term patterns of abundance and associations with leafminers. **Ecology**, v.78, n. 3, p. 810–819, 1997.
- FERNANDES, A. F. C. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana do Extrato Etanólico e Fases Particionadas de *Myracrodruon urundeuva* Fr Allemão (Aroeira do-sertão)**. 2011. 51f. Monografia (Graduação em Farmácia). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2011.
- FLEMMING, H. C., J. WINGENDER, 2010. U. The biofilm matrix. **Nat Rev Microbiol**, v. 8, p. 623-633, 2010.
- FORZZA, R. C., *et al.*, **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 17 fev. 2022
- FRIEDMAN, L., KOLTER, R., 2003. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 3, p, 675–690, 2003.
- GASPAR, M. C., COUET, W., OLIVER, J. C., PAIS, A. A. C. C., SOUSA, J. J. S. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v. 32, p.1231–1252, 2013. Doi:10.1007/s10096-013-1876-y
- GILBERT, P., ALLISON, D. G., MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance?. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**. v. 92, p, 98S-110S, 2002.
- GLAVIS-BLOOM, J., MUHAMMED, M., MYLONAKIS, E. Of Model Hosts and Man: Using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as Model Hosts for Infectious Disease Research. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 710, 2012. DOI 10.1007/978-1-4419-5638-5
- GOMES, I. B., MAILLARD, J.-Y., SIMÕES, L. C., SIMÕES, M. Emerging contaminants affect the microbiome of water systems—strategies for their mitigation. **Npj Clean Water**, v.3, n.1, 2020. doi:10.1038/s41545-020-00086-y
- GOMEZ, M. I., PRINCE, A. Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 7, p. 244-251, 2007.

HAUFF, S. N. **Representatividade do Sistema Nacional de Unidades de Conservação na Caatinga**. Ministério do Meio Ambiente. Brasília. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/203/_arquivos/representativconserveaat_shauffrevisojoo03produto_final_203.pdf>. Acesso em: 07 de outubro de 2016, 2010.

HUBBARD, M., GERMIDA, J. J., VUJANOVIC, V. Fungal endophytes enhance wheat heat and drought tolerance in terms of grain yield and second-generation seed viability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 109–122, 2014.

HOFFMANN, J. A. Innate immunity of insects. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, p. 4-10, 1995.

HOIBY, N., BJARNSHOLT, T., GIVSKOV, M., MOLIN, S., CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, p. 322–332, 2010. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011

IBGE. **Atlas nacional do Brasil: região Nordeste**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 1985.

IBGE. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira**. Rio de Janeiro. IBGE. 2012.

IBGE. **Mapa de Biomas e de Vegetação**. 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>> Acesso: 07 de outubro de 2020.

INSA. **Mapa do Recorte do Semiárido Brasileiro e do Bioma Caatinga**. Neto, C. F. S., Refati, D. C., a2021. 1 pag. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/rede-mcti/insa/mapas-e-documentos-oficiais/mapas/recorte_sab_Caatinga.pdf/view>. Acesso em: 12 set. 2021.

INSA. **Site do INSA**, b2021. Sobre o INSA. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/rede-mcti/insa/o-instituto>>. Acesso em: 12 set. 2021.

JUSKO, M. *et al.*, Staphylococcal Proteases Aid in Evasion of the Human Complement System. **Journal of Innate Immunity**, 2016. DOI: 10.1159/000351458.

KARATAN, E., WATNICK, P. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. **Microbiology and molecular biology reviews**. v. 73, n. 2, p. 310-347, 2009.

KAVANAGH, K., REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, n.1, 101–112, 2004. doi: 10.1016/j.femsre.2003.09.002

KJER, J., DEBBAB, A., ALY, A. H. PROKSCH, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature protocols**. v. 5, n. 3, p. 479-490, 2010.

KLAUSEN, M., AAES-JORGENSEN, A., MOLIN, S., TOLKER-NIELSEN, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Mol Microbiol**, v.50, n. 1, p. 61–68, 2003. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03677.x

KLUYTMANS, J., BELKUM, A.V., VERBRUGH, H. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. **Clinical microbiology reviews**. v. 10, n. 3, p. 505-520, 1997.

KONG, C., NEOH, H. M., NATHAN, S. Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. **Toxins**. v. 8, n. 72, p. 1-21, 2016.

KOSTAKIOTI, M., HADJIFRANGISKOU, M., HULTGREN, S. J. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, p. a010306, 2013.

LARSSON, D. G. J., FLACH, C. F. Antibiotic resistance in the environment. **Nat Rev Microbiol**, v. 20, p. 257–269, 2022.
<https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>

LEVY, S. B., MARSHAL, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine Supplement**. v. 10, n. 12, p. 122-129, 2004.

LEVY, S.B., 1982. MICROBIAL RESISTANCE TO ANTIBIOTICS. An Evolving and Persistent Problem. *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(82\)91701-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(82)91701-9).

LIONAKIS, M. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 2, n.6, p. 521-527, 2011.

LOWY, M. D. F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**. vol. 339, n°. 8, p. 520-532, 1998.

MARANGONI, C. **Plantas medicinais tradicionalmente utilizadas no nordeste do brasil: potencial antimicrobiano para tratar distúrbios das vias gênito-urinárias**. 2015. 109f. Dissertação (Mestrado em Biologia vegetal) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

MATHA, V., MRACEK, Z. Changes in haemocyte counts in *Galleria mellonella* (L) (Lepidoptera: Galleriidae) larvae infected with *Steinernema* sp. (Nematoda: steinernematidae). **Nematology**, v,30, p. 86–89, 1984.

MASSIMO, N. C., DEVAN, M. N., ARENDT, K. R., WILCH, M. H., RIDDLE, J. M., FURR, S. H., STEEN, C., U'REN, J. M., SANDBERG, D. C., ARNOLD, A. E. Fungal endophytes in above-ground tissues of desert plants: infrequent in culture, but highly diverse and distinctive symbionts. **Microb. Ecol.**, v. 70, n. 1, p.61–76, 2015. doi:10.1007/s00248-014-0563-6.

- MEIADO, M. V., MACHADO, M. C., ZAPPI, D. C., TAYLOR, N. P., SIQUEIRA FILHO, J. A. Ecological attributes, geographic distribution and endemism of cacti from the São Francisco watershed. **Gaia Scientia**, v. 9, n. 2, p. 40-53, 2015.
- MENEZES, R. S. C., SAMPAIO, E. V. S. B., GIONGO, V., PÉREZ-MARIN, A. M. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. **Braz. J. Biol.** vol. 72, n. 3 (suppl.), p. 643-653, 2012.
- MESQUITA, M. O. M., PINTO, T. M. F., MOREIRA, R. F. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. **Revista Fitos**. v. 11, n. 2, 2017.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade brasileira. Brasília, 2002.
- NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural products**, v. 83, p. 770-803, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- MOORTHY, S., WATNICK, P. I. Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development. **Mol Microbiol**. v. 52, n.2, p. 573–587, 2004.
- NOBRE-JUNIOR, H. V. **Chalconas isoladas de *Myracrodruon urundeuva* e 2 Ometilinositol isolado de *Magonia glabrata* protegem neurônios de danos oxidativos e apoptose induzida por 6-hidroxidopamina (6-OHDA): Estudo em cultura primária de células mesencefálicas de ratos**. 2005. 213f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2005.
- O’NEILL, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. 2016.
- OMS - Organização Mundial de Saúde. Annex table 2. Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2002. **The World Health Report**, p.121–125, 2004.
- OMS - Organização Mundial de Saúde. HARBARTH, S., KAHLMETER, G., KLUYTMANS, J., MENDELSON, M., PULCINI, C., SINGH, N. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of the new antibiotics**. 2017.
- O’TOOLE, G. A., KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Mol Microbiol**, v.30, n. 2, p. 295 –304, 1998.
- OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 322, p. 207-228, 2008.
- OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Microbiol Spectrum**. v. 6, n. 4, GPP3-0023-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0023-2018, 2018.

- OWNLEY, B. H., GWINN, K. D., VEGA, F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl.**, v. 55, p. 113-128, 2010.
- PAVITHRA, D., DOBLE, M. Biofilm formation, bacterial adhesion and host response on polymeric implants—issues and prevention. **Biomedical materials**, v. 3, 2008.
- PEIXOTO NETO, P. A., De AZEVEDO, J. L., CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latino americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.** v. 3, n. 4, p.69-72, 2004.
- PEREIRA, J. J. S., PEREIRA, A. P. C., JANDÚ, J. J. B., PAZ, J. A., CROVELLA, S., CORREIA, M. T. S., SILVA, J. A. *Commiphora leptophloeos* Phytochemical and Antimicrobial Characterization. **Front. Microbiol.**, v.8, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00052
- PEEL, M. C., FINLAYSON, B. L., MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v.11, n.5, p. 1633–1644, 2007. doi:10.5194/hess-11-1633-2007
- PHOTITA, W., LUMYONG, S., LUMYONG, P. HYDE, K. D. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. **Mycological Research**, v. 105, p. 1508-1513, 2001
- PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., LOPES, N. P., EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.25, n.1, p.45-61, 2002.
- POLLACK, M. The Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinical Infectious Diseases**, v.6, n.3, p.S617–S626, 1984. doi: 10.1093/clinids/6.supplement3.s61710.1093/clinids/6.supplement3.s617
- PÔRTO, K. C., CABRAL, J. J. P., TABARELLI, M. **Brejos de altitude em Pernambuco e Paraíba. História Natural Ecologia e Conservação.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2004. 324 p.
- PRADO, D. E. As Caatingas da América do Sul. In: LEAL, I. R., TABARELLI, M., SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da Caatinga.** Recife – Ed. Universitária da UFPE, p. 3-74, 2003.
- RASMUSSEN, B. Filamentous microfossils in a 3,235-million-year-old volcanogenic massive sulphide deposit. **Nature**, v. 405, n. 8, p. 676-679, 2000.
- REDMAN, R. S., SHEEHAN, K. B., STOUT, R. G., RODRIGUEZ, R. J., HENSON, J. N. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v. 298, p. 1581, 2002.
- ROMMINGER, S. **Avaliação do potencial metabólico de linhagens de fungos isolados de uma espécie de alga marinha do gênero *Sargassum*.** 2008. 69f.

Dissertação (Mestrado em ciências) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

ROSSI, F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. **Antimicrobial resistance**. v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol**. v.4, n.4, p. 406-25, 1987. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

SAMPAIO, E. V. S. B. Caracterização do bioma Caatinga. in: GARIGLIO, M. A., SAMPAIO, E. V. S. B., CESTAO, L. A., KAGEYAMA, P. Y. V. Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da Caatinga. Ministério do Meio Ambiente. Brasília: Serviço Florestal Brasileiro. p. 29-48, 2010.

SCHISTEK, H. Caatinga, um bioma desconhecido e a “convivência com o semiárido”. In: DRUMOND, M. A., SCHISTEK, H., SEIFFARTH, J. A., RUIZ, C. B., ABROMOVAY, R., OVERBECK, G. Caatinga: um bioma exclusivamente brasileiro e o mais frágil. **Revista do Instituto Humanitas Unisinos**. São Leopoldo, n. 389, ano XII, abr. 2012.

SEIFFARTH, J. A. Semiárido, o bioma mais diversos do mundo. In: DRUMOND, M. A., SCHISTEK, H., SEIFFARTH, J. A., RUIZ, C. B., ABROMOVAY, R., OVERBECK, G. Caatinga: um bioma exclusivamente brasileiro...e o mais frágil. **Revista do Instituto Humanitas Unisinos**. São Leopoldo, n. 389, ano XII, abr. 2012.

SILVA, J. M. C. da., BARBOSA, L. C. F. **Impact of Human Activities on the Caatinga**. In: SILVA, J. M. C. da., LEAL, I. R., TABARELLI, M. Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America. Springer. p. 359-367, 2017.

SILVA, D. P. D., CARDOSO, M. S., MACEDO, A. J. Endophytic Fungi as a Source of Antibacterial Compounds - A Focus on Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, v.11, n. 11, p.1509, 2022.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics11111509>

SILVA, D. V. S. da., CRUZ, C. B. M. Tipologias de Caatinga: Uma Revisão em Apoio a Mapeamentos Através de Sensoriamento Remoto Orbital e GEOBIA. **Revista do departamento de geografia**. São Paulo, v. 35, p. 113-120, 2018.

SILVA, J. M. C. da., TABARELLI, M., FONSECA, M. T. **Conservation Opportunities in the Caatinga**. In: SILVA, J. M. C. da., LEAL, I. R., TABARELLI, M. (Org.). Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America. Springer, p. 429-442, 2017.

SMITH, R., COAST, J. The true cost of antimicrobial resistance. **BMJ**, v. 346, f.1493, 2013. doi.org/10.1136/bmj.f1493

SOUZA, R. T. A. **Potencial taninífero da jurema preta e do angico vermelho avaliado por diferentes métodos**. 2015. 98f. Dissertação (Mestrado em ciência

animal e pastagens) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, 2015.

SPECIAN, V., ORLANDELLI, R. C., FELBER, A. C., AZEVEDO, J. L., PAMPHILE, J. A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **Cient. Ciênc. Biol. Saúde**. v. 16, n. 4, p. 345-351, 2014.

SPELLBERG, B., GUIDOS, R., GILBERT, D., BRADLEY, J., BOUCHER, H.W., SCHELD, W.M., BARTLETT, J.G., EDWARDS, J. The epidemic of antibiotic-resistant infections: A call to action for the medical community from the infectious diseases society of America. **Clin Infect Dis**, v. 46, 155–164, 2008. <https://doi.org/10.1086/524891>

STERNBERG, C., CHRISTENSEN, B. B., JOHANSEN, T., NIELSEN, A. T., ANDERSEN, J. B., GIVSKOV, M., MOLIN, S. Distribution of Bacterial Growth Activity in Flow-Chamber Biofilms. **Applied and environmental microbiology**. v. 65, n. 9, p. 4108-4117, 1999.

STROBEL, G., DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol and Mol Bio Ver.**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

TAN, R. X., ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Products Reports**. v. 18, p. 448-459, 2001.

THOMAS, R. J., HAMBLIN, K. A., ARMSTRONG, S. J., MULLER, C. M., BOKORI-BROWN, M., GOLDMAN, S., ATKINS, H. S., TITBALL, R. W. *Galleria mellonella* as a model system to test the pharmacokinetics and efficacy of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, p. 330–336, 2013.

TRENTIN, D. S., GIORDANI, R. B., ZIMMER, K. R., SILVA, A. G., SILVA, M. V., CORREIA, M. T. S., BAUMVOL, I. J. R., MACEDO, A. J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 137, p.327–335, 2011.

TSAI, C. J., LOH, J. M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016. Doi: 10.1080/21505594.2015.1135289

UBEDA, C., TAUR, Y., JENQ, R. R., EQUINDA, M. J., SON, T., SAMSTEIN, M., *et al.*, Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. **J Clin Invest**, v. 120, n.12, p. 4332–4341. 2010. doi:10.1172/JCI43918

VIEGA- JUNIOR, C., BOLZANI, V. S., BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WEI, Q., MA, L, Z. Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas*

aeruginosa. **Molecular Science**, v. 14, p, 20983-21005, 2013.

WESTALL, F., WIT, M. J., DANN, J., GAAST, S. V., RONDE, C. E. L., GERNEKE, D. Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa.

Precambrian Research, v.106, p.93–116, 2001. doi:10.1016/s0301-9268(00)00127-3

WIJAYAWARDENE, N. N., HYDE, K. D., AL-ANI, L. K. T., TEDERSOO, L., HAELEWATERS, D., RAJESHKUMAR, K. C. *et al.*, Outline of Fungi and fungus-like taxa. **Mycosphere**, v. 11, n. 1, p. 1060-1456, 2020. Doi 10.5943/mycosphere/11/1/8

World Health Organization. Antimicrobial resistance global report on surveillance. 2014.

ZHANG, H. W., SONG, C. S., TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**. v. 23, p. 753-771, 2006.

ANEXOS

**Anexo 1: Material suplementar referente ao capítulo 3.
Chemical characterization of secondary metabolites of the endophytic
Alternaria burnsii isolated from the Brazilian Caatinga.**

O Anexo 1 é constituído por gráficos referentes ao manuscrito científico a ser publicado, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 237 -244.