



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

GREICILENE MARIA RODRIGUES ALBUQUERQUE

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE BIOPRODUTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA
CAATINGA FRENTE A ESPÉCIES DE *Candida* RESISTENTES AO
FLUCONAZOL**

Recife

2024

GREICILENE MARIA RODRIGUES ALBUQUERQUE

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE BIOPRODUTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA
CAATINGA FRENTE A ESPÉCIES DE *Candida* RESISTENTES AO
FLUCONAZOL**

Dissertação apresentada ao
Programa de PósGraduação em
Medicina Tropical do Departamento
de Medicina Tropical da
Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos
requisitos para a obtenção do título
de Mestra em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina
Tropical

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cristina de Souza-Motta

Recife

2024

Catálogo de Publicação na Fonte.
UFPE - Biblioteca Central

Albuquerque, Greicilene Maria Rodrigues.

Potencial antifúngico de bioprodutos de fungos endofíticos da caatinga frente a espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol / Greicilene Maria Rodrigues Albuquerque. - Recife, 2024.
59f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2024.

Orientação: Rejane Pereira Neves. Coorientação:
Maria Cristina de Souza-Motta.

GREICILENE MARIA RODRIGUES ALBUQUERQUE

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE BIOPRODUTOS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DA
CAATINGA FRENTE A ESPÉCIES DE *Candida* RESISTENTES AO
FLUCONAZOL**

Dissertação apresentada ao
Programa de PósGraduação em
Medicina Tropical do
Departamento de Medicina
Tropical da Universidade
Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestra em
Medicina Tropical. Área de
Concentração: Medicina
Tropical

Aprovada em: 26/02/2024

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves (Presidente da banca/ examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (membro Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga (membro externo)
Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Suplente/ membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr^a. Maria Daniela Silva Buonafina-Paz (Suplente/ membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico ao meu amado pequeno príncipe.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as graças e misericórdias que me sustenta.

A minha família, sem ela não seria nada.

A minha mãe (Irene Rodrigues da Silva Albuquerque) que sempre me incentivou a estudar, e a crescer através da educação, todos seus passos ao longo de minha vida me direcionou para uma educação de qualidade.

Ao meu pai (Nivaldo Batista de Albuquerque- In memoriam) obrigada por tudo, sua perda e ausência ao longo dessa jornada ainda dói muito.

Aos meus irmãos (Greecy Mirian e Gleison Ricardo Rodrigues Albuquerque) por serem meus irmãos queridos e torcedores do meu crescimento.

As minhas tias amadas por me acolherem e cuidarem de mim. Em especial Edilene Rodrigues da Silva, por cuidar do meu filho durante a jornada desse mestrado, sem ela seria difícil me dedicar e sair de casa.

Ao meu filho que até mesmo em meu ventre assistia as aulas junto comigo, quietinho me deixando estudar.

Ao meu marido Cícero Pinheiro Inácio, grande incentivador da minha vida acadêmica, companheiro em todas as horas, por ser meu suporte e base, um exemplo de pessoa e profissional para mim.

A profa. Dr^a. Rejane Pereira Neves pela orientação, incentivo, apoio, confiança e carinho a mim depositado durante essa jornada.

A profa. Dr^a. Maria Cristina de Souza- Motta pela coorientação, acreditando em mim durante estes anos todos.

Aos queridos da Micoteca URM em especial Rosana Albuquerque e Eliane por me encorajarem e auxiliarem durante os experimentos e aos demais micotequeiros que torceram por mim.

A Daniela Buonafina e Franz de Assis, e os demais integrantes do Laboratório de Micologia Médica do departamento de Biologia de Fungos da UFPE, por contribuírem com seus conhecimentos e auxílio durante os experimentos.

Ao Prof, Dr^o. Antônio Fernando Moraes de Oliveira por disponibilizar as instalações laboratoriais necessárias para obtenção dos extratos brutos.

Ao Departamento de Farmácia pela contribuição na análise das amostras.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

O surgimento e disseminação de espécies resistentes de *Candida* é um problema crescente mundial. Esse panorama é especialmente relevante, sobretudo no Brasil, que recomenda, em suas diretrizes, a utilização do fluconazol como opção ao tratamento de infecções por espécies de *Candida*. Paralelamente, há uma nítida limitação na oferta de drogas comerciais e de novos compostos com potencial antifúngico, em especial, a partir de fontes naturais como os fungos. Desde a descoberta da penicilina, até os dias de hoje, os fungos representam importantes biofábricas potenciais à descoberta de metabólitos. Nesse sentido, fungos endofíticos como aqueles presentes no bioma Caatinga, podem constituir uma alternativa promissora a descoberta de substâncias que se mostrem eficazes frente a fungos patogênicos. Diante deste contexto, o objetivo da proposta consistiu em caracterizar o potencial antifúngico de bioprodutos obtidos de fungos endofíticos, isolados de cactos da caatinga, frente a espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol. Assim, para obtenção dos objetivos propostos o desenho experimental consistiu na determinação da atividade antifúngica *in vitro* as células planctônicas frente aos metabólitos secundários dos fungos endofíticos. Os metabólitos secundários foram obtidos através de crescimento em meio líquido constituído de batata. Os endofíticos foram cultivados sob rotação constante por 15 dias a 28°C, filtrados em papel filtro e submetidos a liofilização. Após a obtenção do extrato, este foi submetido a partição em acetato de etila para obtenção dessa fração. Foi utilizado o método de microdiluição em caldo segundo o Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI para determinação do perfil de susceptibilidade ao fluconazol e novas substâncias. Os metabólitos secundários foram caracterizados quanto a sua constituição química através de cromatografia em camada delgada. Foi observado que os extratos brutos das espécies *Tritirachium dependens*, *Diaporthe caatingaensis* e *Penicillium alagoense* exibiram os melhores resultados ao se utilizar o extrato bruto frente a *Candida albicans* e *C. tropicalis*. A atividade antifúngica da fração de acetato de etila dos extratos brutos mostrou resultados promissores com concentrações inibitórias mínimas de 2 a 0,03 mg/mL, sendo os extratos de *Penicillium alagoense* aqueles com maior potencial de inibição de isolados de *Candida*. A caracterização química dos

extratos dos fungos endofíticos do estudo não foram distintas, mesmo entre isolados de uma mesma espécie. Todos os extratos apresentaram frações de flavonoides, taninos e terpenos/esteróides. Nenhum extrato exibiu a presença de antracênicos e os demais exibiram a presença de uma ou mais frações de derivados cinâmicos, taninos, cumarinas, saponinas e alcalóides. A partir do reportado aqui, é possível concluir que fungos endofíticos da caatinga exibem potencial antifúngico promissor, especialmente *Tritirachium dependes*, *Diaporthe caatingaensis* e *Penicillium alagoense* contra isolados de *Candida*. Assim, estudos futuros são necessários com a utilização das frações isoladas, tendo em vista o potencial de caracterizar as substâncias responsáveis pela inibição de *Candida*.

Palavras-chave: endofíticos; *Candida albicans*; extrato bruto; farmacorresistência fúngica.

ABSTRACT

The emergence and spread of resistance *Candida* species is a growing problem worldwide. This panorama is relevant, especially in Brazil, which recommends, in its guidelines, the use of fluconazole as an option for treating infections caused by *Candida* species. At the same time, there is a clear limitation in the supply of commercial drugs and new compounds with antifungal potential, especially from natural sources such as fungi. Since the discovery of penicillin to the present day, fungi represent important potential biofactories for the discovery of metabolites. In this sense, endophytic fungi from inhospitable regions, such as those present in the caatinga biome, may constitute a promising alternative for the discovery of substances that prove to be effective against pathogenic fungi. Given this context, the objective of the proposal is to characterize the antimicrobial potential of bioproducts discovered from endophytic fungi, isolated from caatinga cacti, against *Candida* species resistant to fluconazole. Thus, to obtain the proposed objectives, the experimental design consisted of determining the in vitro antifungal activity of planktonic cells against secondary metabolites of endophytic fungi. Secondary metabolites were obtained through growth in a liquid medium consisting of potato. The endotites were cultivated under constant rotation for 15 days at 28°C, filtered through filter paper, and subjected to freeze-drying. After obtention of the extract, it was partitioned in ethyl acetate to deliver this fraction. The broth microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI was used to determine the susceptibility profile to fluconazole and new substances. The secondary metabolites were characterized in terms of their chemical constitution using thin-layer chromatography. It was observed that the crude extracts of the species *Tritirachium dependentns*, *Diaporthe caatingaensis*, and *Penicillium alagoense* showed the best results when using the crude extract against *Candida albicans* and *C. tropicalis*. The antifungal activity of the ethyl acetate fraction of the crude extracts showed promising results with minimum inhibitory concentrations of 2 to 0.03 mg/mL, with *Penicillium alagoense* extracts being those with the greatest potential to inhibit *Candida* isolates. The chemical characterization of the endophytic fungal extracts in the study was not separated, even between isolates of the same species. All extracts contained fractions of flavonoids,

tannins, and terpenes/steroids. No extract exhibited the presence of anthracenes and the others exhibited the presence of one or more fractions of cinnamic derivatives, tannins, coumarins, saponins, and alkaloids. From what has been reported here, it is possible to conclude that endophytic fungi from the caatinga have promising antifungal potential, especially *Tritirachium dependens*, *Diaporthe caatingaensis* and *Penicillium alagoenses* against *Candida* isolates. Therefore, future studies are necessary using isolated fractions, given the potential to characterize substances responsible for *Candida* resistance.

Keywords: endophytic; *Candida albicans*; crude extract, pharmacoresistance

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1- Fungos endofíticos da Caatinga e espécies de <i>Candida</i> utilizados no presente estudo, procedentes da Micoteca URM, Departamento de Micologia, Centro de Biociências, UFPE	31
Quadro 2- Condições cromatográficas para identificação do perfil químico por Cromatografia em Camada Delgada-CCD	33
Figura 1- Imagem ilustrativa das características observáveis dos extratos brutos de <i>Penicillium</i> , <i>Diaporthe</i> e <i>Tritirachium</i>	37
Quadro 3- Identificação do perfil químico por cromatografia em camada delgada dos isolados de <i>Penicillium</i> , <i>Diaporthe</i> e <i>Tritirachium</i>	39
Figura 2- Placa cromatográfica para classe de flavonoides e derivados cinâmicos	40
Figura 3- Placa cromatográfica para classe de Taninos hidrolisáveis	40
Figura 4- Placa cromatográfica para classe de Taninos condensados	41
Figura 5- Placa cromatográfica para classe de Cumarinas	41
Figura 6- Placa cromatográfica para classe de Terpenos e esteroides	42
Figura 7- Placa cromatográfica para classe de Saponinas	42
Figura 8- Placa cromatográfica para classe de Alcaloides	43
Figura 9- Placa cromatográfica para classe de Derivados Antacênicos	43
Figura 10- Placa cromatográfica para classe de Açúcares Redutores	44
Quadro 4- Compostos com potencial antifúngico produzidos pelo endofítico <i>Penicillium</i>	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 01-	Fatores de risco para candidíase de repetição (adaptado de Ringdahl, 2006) _____	26
Tabela 02-	Rendimento, inibição e coloração dos extratos brutos _____	36
Tabela 03-	Resultado do teste de suscetibilidade (mg/mL) de espécies de <i>Candida</i> a extratos brutos de fungos endofíticos do bioma Caatinga (24 h), com concentrações de 2 a 0,06mg/mL _____	37
Tabela 04-	Resultado do teste de suscetibilidade mg/mL de espécies de <i>Candida</i> a extratos brutos de fungos endofíticos do bioma Caatinga (48 h), com concentrações de 2 a 0,06mg/mL _____	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µm	Unidade de Medida Microscópica
AC	Ácido clorogênico
AG	Ácido gálico
ALCL3	Cloreto de Alumínio
ATCC	American Type Culture Collection
BDA	Batata Destrose Ágar
C.	<i>Candida</i>
CAT	Catequina
CCD	Cromatografia em camada Delgada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical e Laboraty Standards Institute
cm	Centímetro
CUM	Cumarinas
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
E.	<i>Escherichia</i>
EB	Extrato Bruto
ERG11	Gene relacionado a síntese do Ergosterol 11
ESC	Escina
EUA	Estados Unidos da América
F.	<i>Fusarium</i>
FeCL3	Cloreto de Ferro
FRUT	Glicose
H	Horas
H2SO4	Ácido sulfúrico
HNO3	Ácido nítrico
KOH	Hidróxido de Potássio
L- AsNase	Aminoácido Asparaginase
L- Glutamina	Aminoácido Glutamina
MacFarland	Escala de turbidez

Mg	Miligrama
Mg/mL	Miligrama por mililitro
mmBar	Milibar
MOPS	Ácido Morfolino Propano Sulfônico
nm	Nano Molar
PA	Puro Absoluto
MacFarland	Escala de turbidez
P-D	Glucano
Pfiser	Laboratório de produção de vacinas
PH	Potencial hidrogeniônico
Q+R	Padrões quercentina + rutina
Rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Intitute
S+Y	Sabouraud Dextrose Ágar
Senβ	Senosídeo β
Spp	Espécie
T.	<i>Tritirachium</i>
TPP	Thermal Protective Performance (Desempenho de Proteção térmica)
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
URM	University Recife Mycology (Micoteca URM)
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
Bsit	Beta Sitosterol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	FUNGOS ENDOFÍTICOS	18
2.2	FUNGOS PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS	19
2.2.1	Gênero <i>Diaphorte</i>	20
2.2.2	Gênero <i>Penicillium</i>	21
2.2.3	Gênero <i>Tritirachium</i>	22
2.2.4	Gênero <i>Trichoderma</i>	23
2.3	FUNGOS DO GÊNERO <i>Candida</i>	23
2.4	TRATAMENTO DE CANDIDÍASE	25
2.5	RESISTÊNCIA FÚNGICA	26
2.6	FLUCONAZOL	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	30
4.2	TÉCNICA DE CULTURA PAREADA	31
4.3	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS FÚNGICOS	31
4.4	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	32
4.5	TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA	33
5	RESULTADOS	35
5.1	OBTENÇÃO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS EXTRATOS DE FUNGOS DA CAATINGA	35
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	38
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Isolados de *Candida* resistentes aos azóis, sobretudo ao fluconazol, constituem uma ameaça, sendo este panorama associado fortemente com a problemática inerente ao tratamento ineficaz e mau prognóstico dos pacientes. Assim, considerando que as opções terapêuticas disponíveis são escassas, que possuem limitações de uso clínico e que apenas um único novo agente antifúngico foi aprovado nas últimas décadas, há o risco real de colapso no sistema de saúde (SHARAFUTDINOV, 2020).

Esforços vêm sendo direcionados na busca por novas opções terapêuticas, como os compostos fosmanogepix, ibrexafungerp, olorofim, opelconazol, rezafungina (Hoenigl, 2021) bem como bioprodutos sintéticos e de origem microbiana (Luna, 2021; Araujo Neto, 2020). A respeito, os produtos naturais apresentam a vantagem de serem mais efetivos e de obtenção mais viável (KURTZMAN, FELL & BOEKHOUT, 2011), especialmente de fungos endofíticos que podem constituir uma alternativa promissora para o tratamento de infecções sistêmicas ocasionadas por *Candida*.

Estudos anteriores demonstraram que fungos endofíticos exibiram a presença de compostos secundários com atividade antimicrobiana (YUAN, 2017; SHI, 2019; ELSHAFIE, 2020; LI, 2020). Assim, a busca por novos bioprodutos de fungos é viável, tendo em vista que inúmeros antibióticos foram desenvolvidos a partir de metabólitos fúngicos. Ademais, a bioprospecção de metabólitos de fungos possui a vantagem de que estes podem ser cultivados em larga escala, não ocorrendo, desta forma, problemas éticos advindos do uso de animais para obtenção destes compostos. Assim, utilizar tendências inerentes aos gêneros fúngicos associados a possíveis efeitos benéficos pode refletir positivamente no cenário do fenômeno de resistência fúngica ao fluconazol (LEITE-ANDRADE, 2017).

A resistência ao fluconazol é mais estudada em *C. albicans* e, à medida que há mudança na epidemiologia da candidemia, torna-se necessário incluir outras espécies para caracterização de novos bioprodutos (BERKOW; LOCKHART, 2017). Dado ao uso indiscriminado do fluconazol houve aumento considerável nos eventos de resistência a este medicamento, o que evidencia a necessidade da busca de novos bioprodutos com potencial anti-*Candida* (POPP, 2019).

Convêm destacar que as diretrizes médicas têm recomendado o fluconazol como opção terapêutica (ANVISA, 2021), entretanto essa prática não impede o surgimento de resistência ao medicamento e não há, até o momento, estratégias estabelecidas para conter o aparecimento de cepas resistentes. Assim, o objetivo dessa proposta consistiu em prospectar bioprodutos de fungos endofíticos da Caatinga pertencentes aos gêneros *Diaporthe*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Tritirachium*, como potenciais agentes anti-*Candida*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os microrganismos (fungos, bactérias, actinomicetos, entre outros) desempenham um papel fundamental na produção de novos produtos naturais que podem ser utilizados na indústria farmacêutica (humana e animal), alimentícia e agrícola. É um grupo que tem se destacado nas últimas décadas pela produção de metabólitos bioativos é o dos endófitos, especialmente os fungos, que representam uma importante fonte genética para a biotecnologia (STROBEL, 2003).

Fungos endofíticos são microrganismos que habitam o interior de plantas hospedeiras por todo ou parte do seu ciclo de vida (ABUTAHA, 2015), sem causar quaisquer danos aparentes à planta hospedeira (TIAN, 2016; PINHEIRO, 2020). Em contrapartida aos nutrientes recebidos da planta hospedeira, são capazes de produzir metabólitos secundários que podem ser úteis à planta como, por exemplo, hormônios de crescimento ou antibióticos. Além disso, esses fungos apresentam um enorme potencial na produção de substâncias novas e bioativas (CHAPLA, V. M, 2013) e desempenham papéis importantes na virulência e na competição contra outros microrganismos (JAKUBCZYK; DUSSART, 2020).

O bioma da Caatinga possui uma grande diversidade de fungos cuja maior parcela é caracterizada pela microbiota endofítica (ALBUQUERQUE, 2006), apresentando-se como uma fonte promissora de metabólitos bioativos oriundo de plantas e microrganismos, dentre os quais os fungos apresentam um papel relevante diante de sua vasta diversidade (ALVES, 2020). Trabalhos sinalizam uma ampla área de aplicação dos metabólitos secundários extraídos de fungos endofíticos, atuando com relevância nas atividades antimicrobiana, antioxidante, entre outras bioatividades (ALVES, 2018; PEREIRA, 2018).

Os fungos endofíticos são fontes de produtos naturais que podem agir como antibióticos, inibindo ou matando uma variedade de agentes causadores de doenças nocivas, como bactérias, fungos, vírus e protozoários que afetam humanos e animais (STROBEL, 2003). Além de antibióticos, fármacos de alto valor agregado podem ser produzidos a partir desses organismos (PEIXOTO, 2002; PRINCE, 2008), dentre os

quais: anticâncer, compostos imunossupressores e antioxidantes (STROBEL, 2018). Ademais, é evidente a necessidade de novos compostos bioativos oriundos de fungos endofíticos com aplicabilidade em tratamentos clínicos, como alternativas viáveis para amplificar a descoberta de novos compostos, a exemplo de espécies do gênero *Alternaria* (MONTEL, 2021). Nesse contexto, cita-se também o uso de endofíticos de cactáceas da Caatinga (e.g. *Aspergillus flavus*, *Penicillium decaturense*, *Diaporthe ueckerae*, *Phyllosticta catimbauensis*, *Penicillium sp.*, *Diaphorte sp.*) produtores de enzimas, como a L- Asparaginase (L-ASNase), importantes por suas aplicações na biotecnologia e na indústria alimentícia ou farmacêutica (SANTOS, 2022; SILVIA, 2022; ARAUJO-MAGALHAES, 2021; SIALVA, 2018; PÁDUA, 2018).

2.2 FUNGOS PRODUTORES DE COMPOSTOS BIOATIVOS FUNGOS E METABOLISMO SECUNDÁRIO

Metabólitos secundários são compostos de baixo peso molecular produzidos pela transformação de intermediários do metabolismo como aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos e outros, durante a idiofase (KOUNDOUROS e POULOGIANNIS, 2020). Esses metabólitos geralmente são produzidos em resposta a um estímulo, diferenciação morfológica e crescimento da célula (JHA e MOHAMED, 2022; D'SOUZA, 2023). Apesar da relevância desses metabólitos, eles não são indispensáveis para a sobrevivência do microrganismo, fornecendo apenas uma maior diversidade de meios de sobrevivência (LOACH, 2017).

Eles são comumente relatados em plantas e microrganismos e conferem vantagem adaptativa a exemplo da capacidade de prevenir ou curar doenças (VASUNDHARA, 2019).

Os fungos têm despertado grande interesse devido ao seu potencial de produzir substâncias bioativas com aplicações em diversas áreas como a medicina, agricultura e indústrias. Estudos têm demonstrado que esses compostos podem exibir atividade antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e anti-inflamatória (KELLER, 2019; SINGH, 2019; LI, 2020).

No tocante, os fungos endofíticos tem se destacado como potenciais produtores de compostos com potencial bioativos, incluindo alcaloides, terpenoides,

polifenóis e peptídeos com atividades biológicas caracterizadas. Um estudo realizado por Li (2020), os autores isolaram o fungo *Pestalotiopsis* e caracterizaram um novo composto bioativo com atividade antitumoral. Assim como, Singh (2019) ao caracterizarem um novo composto, a aspergiolide A através do fungo *Aspergillus niger*, que exibiu atividade antimicrobiana *in vitro*. Vale salientar que espécies do gênero *Aspergillus* também são importantes produtores de variados compostos, incluindo micotoxinas, antibióticos e metabólitos secundários com atividade farmacológica.

Pesquisas como estas destacam a importância dos compostos bioativos de fungos bem como suas aplicações em áreas como a microbiologia e biotecnologia.

2.2.1 Gênero *Diaphorte*

O gênero *Diaphorte* pertence à família Diaporthaceae, classe Sordariomycetes, filo Ascomycota do reino fungi. É um gênero que atualmente engloba uma gama de aproximadamente 1106 organismos de variadas espécies, dentre elas a *Diaphorte caatingaensis* (INDEX FUGORUM, 2023). Os fungos deste gênero podem apresentar diferentes hábitos de vida, podendo ser tanto, fitopatógenos, saprófitos (TORRES, 2016; SENANAYAKE, 2018) e/ou endofíticos de diferentes plantas (POLONIO, 2015; FELBER, 2016; ORLANDELLI, 2017; DA SILVA RIBEIRO, 2018; GOLIAS, 2019; SILVA, 2020; CARVALHO, 2021; RIBEIRO, 2021).

São relatados como produtores de compostos antimicrobianos no controle de patógenos em plantas e como agentes promissores no desenvolvimento de biofertilizantes para o crescimento vegetativo (ABRAMCYK, 2022). Tem recebido atenção por suas aplicações potenciais na área da saúde, farmacologia e na biomedicina (pelo desenvolvimento de medicamentos) (CHEN, 2022; XU, 2021). São capazes de produzir uma grande diversidade de metabólitos secundários bioativos com propriedades antimicrobianas, antitumorais, inibidores de metástase tumoral (NAKASHIMA, 2018; REIS, 2018; NOGUEIRA e OLIVEIRA, 2022), como flavonas, flavonóis, xantonas, alcaloides, triterpenóides (BOAES, 2019).

Nos últimos anos, estudos foram realizados no intuito de adquirir metabólitos secundários de novas espécies deste fungo (NOGUEIRA E OLIVEIRA, 2022; XU,

2021). Estes estudos, reuniram cerca 335 metabólitos secundários bioativos isolados de 26 espécies conhecidas e outras espécies não identificadas de *Diaporthe*, gerando um total de 106 compostos bioativos. Estes foram classificados em policetídeos (principal classe química, correspondendo a 64%), terpenóides, esteróides, macrólidos, lactonas de dez membros, alcalóides, flavonóides e ácidos graxos. (XU, 2021). Tal diversidade em metabólitos com potencial medicinal produzido por *Diaporthe* retrata que ainda há muito a ser explorado quanto a utilização dos compostos destes microrganismos, principalmente quanto a sua viabilidade e otimização em escala industrial (SPECIAN, 2014). Um cenário desafiador (PAMPHILE, 2017), já que os compostos descobertos podem agir como modelos para a síntese de compostos análogos que desempenhem a mesma atividade (NAGARAJAN, 2021).

O *Diaporthe* é gênero fúngico comumente reconhecido como fitopatógeno e frequentemente isolado como um endofítico de ecossistemas tropicais e temperados (UDAYANGA, 2014; GOMES, 2013; DONG, 2021), no entanto quanto a espécie *Diaporthe caatingaensis*, no campo da saúde, requer estudos mais aprofundados quanto a uma possível fonte de compostos ativos, podendo ser promissora para utilização em fármacos futuros.

2.2.2 Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* pertence à família *Trichomaceae*, classe *Eurotiomycetes*, filo *Ascomycota* do reino Fungi, podendo apresentar tanto a forma anamórfica (fase assexuada ou mitótica) como a teleomórfica (sexual). São considerados cosmopolitas devido a sua distribuição em diferentes tipos de habitats como solo, água, ar e ambientes extremos com elevada variação de temperatura, salinidade e pH (SMITH, 1951; VISAGIE, 2014; MADIGAN, 2016; SAXENA, 2016; SANTIAGO, 2022). Constituem um grupo de microrganismos que sintetizam uma quantidade elevada de metabólitos secundários (antibióticos, micotoxinas, antioxidantes, anticancerígenos, inseticidas, herbicidas, enzimas e fungicidas) (Sanson, 2000 e Frisvad JC, 2004), podendo atingir, uma produção de até 73% maior quando comparado a outros gêneros de microrganismos (CAFÊU, 2005).

Além da sua importância econômica na indústria de alimentos e bebidas e de serem comumente conhecidos como os “fungos dos bolores”, espécies de *Penicillium* vêm se destacando por serem fontes de biocatalisadores e compostos antimicrobianos de interesse industrial (JUNIOR, 2021). Produzem metabolitos secundários utilizados como modelo para síntese e desenvolvimento de antibióticos como penicilina, ampicilina, amoxilina e griseofulvina (Santiago, 2022), como por intermédio do *Penicillium notatum* (JAKUBCZYK; DUSSART, 2020) e pela síntese de compostos bioativos contra *Candida albicans* através do *Penicillium verruculosum* MKH7 (TALUKDAR, 2016). Vale salientar que os fungos do gênero *Penicillium* podem ser utilizados como biorremediadores, produtores de biossurfactantes, e enzimas extracelulares (THOM, 1906; NELSON, 1970; KARAHADIAN, JOSEPHSON e LINDSAY, 1985; GIRAUD, GIRAUD e AGUILETA, 2010; LUDEMANN, GRECO e RODRÍGUEZ, 2010; WHITELAW, HARDEN e BENDER, 1997; LEITÃO e EGUITA, 2016; KHAN, et al., 2008; CHÁVEZ, BULL e EYZAGUIRRE, 2006; GUSAKOV e SINITSYN, 2012).

2.2.3 Gênero *Tritirachium*

A espécie *Tritirachium dependes* pertence à família *Onygenaceae*, do filo Ascomycota (Indexfungorum, 2024). Esse é um fungo filamentoso que produz ascos e ascocarpos, sendo a identificação, muitas vezes, baseada na morfologia da forma perfeita. Ainda, a espécie apresenta hifas septadas hialinas e esporos de reprodução assexuada. Porém, estudos moleculares têm fornecido preciosas informações a respeito da posição taxonômica da espécie (SMITH, 2019).

A espécies do gênero exibem hábito de vida saprofítico, desempenhando relevante função na ciclagem de matéria orgânica, assim como simbiontes, fitopatógenos e patógeno de animais. Neste contexto Jones (2021) estudando a interação planta-fungo de *T. dependes*, observaram a capacidade patogênica da espécie com impactos na agricultura.

Estudos apontam, ainda, seu potencial biotecnológico. Segundo Silva (2020), *T. dependes* possui notável capacidade de produzir enzimas celulolíticas, com reflexos diretos na indústria. Contudo, é importante destacar que é necessário o manejo

adequado da espécie para evitar impactos ambientais, como o observado por Oliveira e colaboradores (2022) os quais reforçam a necessidade de adoção de boas práticas de manejo sustentável em culturas agrícolas.

2.2.4 Gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma* compõe a Família *Hypocreaceae*, Ordem *Hyproceales*, Classe *Eucomycetes*, Filo *Ascomycota* do Reino *Fungi* (KRUNGER; BACCHI, 1995). Atualmente existem 485 registros de espécies de *Trichoderma* catalogadas (Indexfungorum, 2021), que podem exibir características morfológicas muito próximas dificultando, assim, a sua classificação (MELO, 1991). De maneira geral, as espécies de *Trichoderma* apresentam reprodução sexuada e assexuada (FIGUEREDO, 2007).

Espécies de *Trichoderma* podem exibir hábito sapróbio e como parasita de fungos fitopatógenos como *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytophthora* entre outros (MELO, 1998; ARENAS, 2007). Os microrganismos do gênero estão presentes no ambiente, mas dependem de condições amenas de temperatura, umidade e pH, além da presença de nutrientes, substrato orgânico e aeração (HOWELL, 2003; BOMFIM, 2007).

Apresentam uma importância econômica e ecológica relevante uma vez que representam importantes organismos biocontroladores e decompositores de matéria orgânica, refletindo diretamente na redução do uso de produtos químicos na agricultura (ESPOSITO e SILVA, 1998). Ainda, estão associados ao aumento da produção agrícola ao estimularem o crescimento das plantas como pela estimulação no crescimento das raízes (HARMAN, 2000; HARMAN, 2004).

2.3 FUNGOS DO GÊNERO *Candida*

As leveduras do gênero *Candida* fazem parte do reino *Fungi*, filo *Ascomycota* e classe *Saccharomycetes* (GUARRO, GENE, STCHIGEL, 1999; BUTLER, 2010). O gênero possui mais de 800 espécies conhecidas e é formado por um grupo heterogêneo (ROBERT, 2013). Primariamente, se reproduzem por cissiparidade originando leveduras, hifa e/ou pseudohifa mas, também, já foi verificado a

reprodução sexuada com a formação de ascos (LACAZ, 2002; GIOLO, SVIDZINSKI, 2010; NEPPELENBROEK, 2013). Uma característica que pode ser observada em vida parasitária diz respeito a capacidade de formação de hifas, fenômeno este conhecido como dimorfismo invertido (FORCHE, 2003).

Espécies de *Candida* representam organismos encontrados na microbiota de humanos. A localização corpórea mais comum são regiões de mucosa podendo, ainda, colonizar a epiderme, trato respiratório superior e trato gastrointestinal (SCHULZE; SONNENBORN, 2009). Esses organismos são importantes agentes de infecções oportunistas localizadas e/ou generalizadas, sendo o quadro mais preocupante o relacionado a candidíase invasiva, sobretudo aos episódios de candidemia e infecção disseminada (BARDEDO; SGARBI, 2010; YAPAR, 2014).

Dentre as infecções, uma que tem impacto direto em pacientes debilitados se refere a infecção do trato urinário que pode progredir para uma infecção mais agressiva. É uma infecção mais evidente em pacientes imunocomprometidos que utilizam dispositivos médicos como cateter vesical de demora (REZAI, 2017). Em um estudo desenvolvido por Toner (2016), os autores reportaram 96 casos de candidúria, sobretudo na presença de cateter, com prevalência de *C. albicans* (72%), *C. glabrata* (11,46%) e *C. tropicalis*.

Infecções disseminadas, como a candidemia, constituem um problema de saúde pública, sobretudo nos pacientes que necessitam de suporte de vida contínuo em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Esse panorama pode estar intimamente relacionado a profilaxia com antibióticos de amplo espectro em indivíduos imunocomprometidos (NEPPELENBROEK, 2013; AIKAWA, 2016).

Estudos tem demonstrado que, dentre as leveduras, as espécies de *Candida* representam aproximadamente 80% dos episódios em UTIs (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; MOLINA et al., 2012). Entre os casos de candidemia na América Latina, *C. albicans* permanece como um dos agentes etiológicos mais comuns, acompanhado por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (PFALLER, 2015; DA MATTA et al., 2017). Por ser uma doença subnotificada o panorama da doença no Brasil é incerto.

Esse cenário é desafiador tendo em vista que em geral os pacientes acometidos necessitam de suporte hospitalar adequado frente a infecção fúngica. Isso pode ser justificado, também, pois a candidemia pode envolver os pacientes de

hospitalização prolongada e onerosa. Ainda, o custo relacionado aos cuidados do paciente com candidemia pode chegar a 500 mil reais (STROLLO et al., 2017, BORBA et al., 2018).

A candidemia por espécies de *Candida* não *C. albicans*, com espécies de *C. glabrata* e *C. krusei*, em pacientes com câncer tem se tornado comum. Essa problemática tem sido atribuída a profilaxia a base de azólicos, sobretudo o fluconazol (PUIG-ASENSIO et al., 2015; WANG et al., 2015). Uma preocupação crescente diz respeito ao fenômeno de resistência de *Candida* aos azóis, mesmo em pacientes imunocompetentes com infecção disseminada por espécies emergentes (CECCARELLI et al., 2016).

Outro panorama observado por pesquisadores em diferentes localidades do globo diz respeito a espécies de *Candida* multidroga resistentes, como *Candida auris*. O conhecimento a respeito dessa espécie está em ascensão, sendo que dados apontam que esta mesma espécie já responde por altas taxas de mortalidade (KATHURIA, 2015; CALVO, 2016). *C. auris* é responsável por doença de difícil tratamento e erradicação, sobretudo em pacientes hospitalizados (Centers for Disease Control and Prevention, 2017).

2.4 TRATAMENTO DA CANDIDÍASE

A candidíase é a segunda causa de doença fúngica mais frequente de vulvovaginite na menacme, durante a gravidez se torna mais prevalente. Nesse tipo de infecção, *Candida albicans* se torna mais frequentemente como agente, com 85% dos casos registrados. A tabela 1 apresenta os fatores que predisõem ao aparecimento da candidíase (SHIOZAWA, 2007).

Clinicamente, a candidíase pode se apresentar nas formas cutânea, mucocutânea, disseminada e alérgica. O microrganismo cresce melhor em superfícies quentes e úmidas, causando frequentemente vaginite, dermatite das fraldas e candidíase oral.

Tabela 1: Fatores de risco para Candidíase de Repetição (adaptado de Ringdahl, 2006)

-
- 1- Diabetes mellitus
 - 2- Imunodeficiência
 - 3- Fatores Hormonais
 - 4- Imunidade local mediada por células *Candida* – específica
 - 5- Antibióticos de largo espectro
 - 6- Hábitos de vida, vestuário, vida sexual
 - 7- Resistência aos antifúngicos
-

A literatura científica tem sugerido que a profilaxia empírica a base de fluconazol pode reduzir a incidência da candidíase invasiva em pacientes graves, mas a essa informação é controversa uma vez que não tem sido observado redução da mortalidade (SHORR, 2005; PELZ, 2001). Ademais, a adoção de profilaxia antifúngica deve ser avaliada com cautela tendo em vista que esta pode ser o gatilho para o surgimento de resistência a antifúngicos, mesmo entre pacientes com fatores de risco de candidíase invasiva, como em pacientes transplantados (OSTROSKY-ZEICHNER, 2014; PAPPAS, 2016). Dados apontam que biomarcadores positivos, como β -D-glucano, não são úteis como valor preditivo para acompanhamento da terapia empírica entre os pacientes com sintomas inexplicáveis, mas sem evidências sólidas de infecção por fungo (TIMSIT, 2016; SCHUSTER, 2008; KNITSCH, 2015; MONTRAVERS, 2017).

2.5 RESISTÊNCIA FUNGICA

No decorrer dos anos tem-se observado um aumento no número de casos com resistência aos antifúngicos, e este cenário pode estar relacionado ao uso indiscriminado desses fármacos, agravando os quadros de recidiva da doença, necessitando assim de outras alternativas eficazes ao tratamento do paciente, como os provenientes de produtos naturais (ALMEIDA, 2012).

Mecanismos moleculares tanto intrínsecas como adquiridas estão envolvidos na resistência microbiológica. Sendo a resistência intrínseca uma característica fenotípica de determinada espécie, conferindo a ele uma resistência inata antes mesmo da exposição ao antifúngico. Já em relação a resistência adquirida, acontece nos microrganismos que desenvolveram mutações após a exposição ao antifúngico, onde ocorreu uma seleção, sobrevivência e proliferação dos mutantes resistente (ARTHINGTON-SKAGGS, 2008).

Os fungos também podem apresentar resistência quanto as equinocandinas de modo progressivo. E essa resistência está relacionada tanto ao aumento do seu uso, como a alta incidência de infecções pelo gênero *Candida* e a correlação entre os fármacos azólicos e as equinocandinas (PFALLER, 2012; OKAMURA, 2019). A resistência aos fármacos azólicos por sua vez, acontece por conta de mecanismos distintos. Dentre os quais por conta da superexpressão ou mutação no gene ERG11, onde acontece alterações na enzima citocromo P-450 lanosterol 14-desmetilase, o que reduz a afinidade aos antifúngicos azóis. Outro mecanismo está relacionado à bomba de efluxo, causando a diminuição da quantidade de fármacos em seu interior (COSTA, 2016).

Em *Candida albicans* por exemplo, a resistência que acontece é uma variação na descendência clonal (VIEIRA e SANTOS, 2016). Onde essa falta de recombinação sexual leva à aquisição de resistência a drogas através da plasticidade do genoma e do aumento de taxas de mutação e de recombinação mitóticas (FORD, 2015). No entanto, a resistência mediada por bombas de efluxo é uma das mais comuns.

2.6 FLUCONAZOL

Os triázóis (representado pelo fluconazol e voriconazol) comumente são um dos três principais grupos de antifúngicos utilizados no manejo clínico de infecções sistêmicas por espécies de *Candida* (PAPPAS, 2009).

Constituem um grupo de antimicrobianos sintéticos e a maior classe de agentes antifúngicos. Seu mecanismo de ação se dá pela inibição da atividade da enzima 14- α -lanosterol-demetilase (codificada pelo gene Erg11), responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, componente fundamental à integridade da membrana celular

de células fúngicas (ODDS, 2003). A atividade dos triazólicos contra espécies de *Candida* é fungistática (PFALLER, 2010).

Entre os triazólicos, o fluconazol é o mais usualmente empregado na terapia das infecções da corrente sanguínea por *Candida* (ANVISA, 2021), sendo também considerada a terapia padrão para o tratamento de candidíase orofaríngea, esofágica e vaginal (PAPPAS, 2009). Ainda, apresentando menores índices de toxicidade quando comparado à anfotericina B. É um antifúngico, utilizado em tratamento de micoses, por via oral, tendo como tempo médio no sangue de 30 horas (com dose de 400 mg ao dia) (SANTOS JR ID, 2005).

De forma geral, a resistência de *Candida* ao fluconazol é variável entre os isolados de corrente sanguínea, porém sua ocorrência tem aumentado (PFALLER; DIEKEMA, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007; PFALLER et al., 2010). Em uma revisão de Pfaller et al. (2007) foram analisados os resultados de testes de sensibilidade ao fluconazol de 13.338 amostras de *Candida*, onde foi observada que a resistência ao fluconazol entre esses isolados está representada principalmente por *C. glabrata* e *C. krusei*, as quais apresentaram resistência em 9% e 40% dos isolados, respectivamente.

É atribuído ao fluconazol a maior parte dos relatos de resistência das leveduras, que foram tratados com azólicos anteriormente (GALBAN; MARISCAL, 2006; PFALLER et al., 2010). Esse antifúngico é eficaz contra as variadas espécies de *Candida*. A identificação da espécie de *Candida* envolvida nos casos de candidemia e o conhecimento do uso prévio de antifúngicos são de fundamental importância, pois pode sugerir a provável resistência *in vitro* ao fluconazol e a outros fármacos (SANTOS, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o potencial antifúngico de bioprodutos obtidos de fungos endofíticos da Caatinga, frente a espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar isolados dos fungos endofíticos obtidos de plantas da Caatinga, dos gêneros *Diaphorte*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Tritirachium* com base na atividade antimicrobiana contra cepas de *Candida albicans* e *C. tropicalis*. procedentes da Coleção de Culturas - Micoteca University Recife Micologia (URM), Universidade federal de Pernambuco (UFPE).
- Obter extrato bruto dos fungos endofíticos da Caatinga que se mostrarem efetivos na inibição de crescimento das cepas clínicas de *Candida*.
- Determinar o perfil de susceptibilidade dos isolados de *Candida* ao fluconazol (controle) e aos extratos fúngicos selecionados previamente.
- Caracterizar o extrato bruto do fungo endofítico quanto a sua composição química.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram selecionadas amostras de fungos endofíticos da Caatinga e cepas clínicas de *Candida*, todos oriundos da coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. As linhagens de fungos endofíticos foram isoladas previamente de cladódios de três espécies de cactos e conservados em tubo contendo meio Batata-Dextrose ágar (BDA – Sigma-Aldrich). Foram utilizadas 12 isolados de fungos endofíticos pertencentes aos gêneros *Diaphorte* sp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Tritirachium* spp., sendo 3 representantes de cada gênero, e 6 isolados de *Candida*, das espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* (Quadro 01).

Quadro 01: Fungos endofíticos da Caatinga e espécies de *Candida* utilizados no presente estudo, procedentes da Micoteca URM, Departamento de Micologia, Centro de Biociências, UFPE.

Espécie	URM
Fungos endofíticos	
<i>Diaphorte caatingaensis</i>	7483
	7484
	7485
<i>Penicillium alagoense</i>	8086
	8087
<i>Penicillium minioluteum</i>	6843
<i>Trichoderma viride</i>	2435
	6823
	6824
<i>Tritirachium dependens</i>	6705
	6821
	6822
Isolados de <i>Candida</i> resistentes ao fluconazol	

<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028
	8668
	8368
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC750
	8937
	8374

URM: University Recife Micologia

ATCC: American Type Culture Collection

4.2 TÉCNICA DE CULTURA PAREADA

O potencial antagônico dos endófitos contra as cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram avaliadas utilizando a técnica de pareamento como descrito por Dennis e Webster (1971). Assim, os fungos endofíticos foram repicados em meio BDA e mantidos a 30°C por sete dias. As leveduras foram semeadas em meio Sabouraud Dextrose Agar (S+Y) e mantidas a 35° C, 24h. Foram preparadas suspensões dos isolados em solução salina ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% de transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm. A técnica consistiu no uso de placas de Petri contendo meio BDA, com adição de um disco (Ø 6mm) da cultura do endofítico em placa previamente semeada com a espécie de *Candida*. O experimento foi acompanhado por até 7 dias, para a observação da presença ou ausência de halos de inibição de crescimento. Os resultados do teste de antagonismo foram avaliados utilizando a fórmula porcentagem de inibição = $(A-B / A) * 100$, onde, A = raio do agente patogênico na placa de controle e B = raio do patógeno na placa teste. Os testes *in vitro* serão realizados em duplicata.

4.3 OBTENÇÃO DE EXTRATOS FÚNGICOS

Os fungos endofíticos foram cultivados em meio BDA a 28°C por 7 dias. Em seguida, os isolados foram inoculados em erlenmeyers contendo caldo batata e mantidos à 28°C por 15 dias (CAFÊU et al., 2005). Ao fim do processo, a fase líquida foi filtrada em papel filtro de 0,22µm e submetida ao processo de liofilização para

obtenção do extrato bruto-EB. Após a obtenção do extrato, este foi submetido a uma partição em Acetato de Etila em frascos mantidos sob agitação (120rpm). O extrato foi, então, filtrado e rotaevaporado sob pressão reduzida (60mmBar) à 50°C até a obtenção da partição. Em seguida, os extratos bruto e partição foram pesados, ressuspensos em DMSO (5%) e álcool etílico absoluto e mantidos -20°C até o momento das análises.

4.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

O extrato bruto foi pesado anteriormente, solubilizado com água na proporção extrato: solvente 1g para 10 mL e particionado com acetato de etila para obtenção da fração acetato. A fração foi seca e concentrada em banho maria, e suspendida com metanol P.A; posteriormente foi submetida à análise por Cromatografia em Camada Delgada. Todos os padrões foram preparados na concentração de 0,5 mg/mL em metanol P.A. em tubos tipo *Eppendorf*.

A amostra e os padrões foram aplicados em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F₂₅₄ (Macherey-Nagel®, Alemanha), e desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel. A cuba foi saturada durante 15 minutos à temperatura de 28°C. As bandas foram aplicadas com largura de 1,0 cm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 0,5 cm. O tamanho da largura e do comprimento das placas cromatográficas foi de 10 cm. As amostras foram aplicadas a 0,5 cm da origem e com término 0,5 cm do final da placa. Após a eluição das placas, as mesmas foram secas à temperatura ambiente, observadas sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e luz visível e, em seguida, digitalizadas. As placas foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito, sendo que as bandas obtidas para a fração do extrato foram comparadas com os padrões correspondentes, como demonstrado no quadro 02 (NUDATEF, 2023).

Quadro 02 – Condições cromatográficas para identificação do perfil químico por Cromatografia em Camada Delgada-CCD.

Classe de metabólito	Sistema	Padrão	Revelador

Derivados Cinâmicos	(90:5:5)	Ácido clorogênico	AlCl ₃
Flavonoides	(90:5:5)	Rutina e Quercetina	AlCl ₃
Taninos hidrolisáveis	(90:5:5)	Ácido gálico	FeCl ₃
Taninos Condensados	(90:5:5)	Catequina	Vanilina Clorídrica + Δ
Cumarinas	(50:50:50)	Cumarina	KOH
Terpenos/Esteroides	(90:10)	β-sitosterol	Liebermann-Burchard + Δ
Saponinas	(16:10:2,5)	Escina	Liebermann-Burchard + Δ
Antracênicos	(20:30:15:0,5)	Senosídeo B	HNO ₃ + Δ + KOH
Açúcares	(100:11:11:27)	Glicose	Timol + H ₂ SO ₄ + Δ
Alcaloides	(70:20:10)	Piperina	Dragendorff

AlCl₃: Cloreto de alumínio a 5% em metanol; FeCl₃: Cloreto férrico; Δ: Aquecimento; KOH: hidróxido de potássio; HNO₃: Ácido nítrico; H₂SO₄: Ácido sulfúrico. 90:5:5 = Acetato de etila, ácido fórmico e água; 50:50:50 = Tolueno, éter etílico e ácido acético glacial (saturação); 90:10 = Tolueno, acetato de etila; 100:11:11:26 = Acetato de etila, ácido acético glacial, ácido fórmico e água; 16:10:2,5 = Clorofórmio, metanol e água; 20:30:15:0,5 = Acetato de etila, álcool n-butílico, água e ácido acético glacial; 70:20:10 = Tolueno, acetato de etila, dietilamina.

Fonte: Laboratório de Farmacognosia-NUDATEF, 2023.

4.5 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

O método utilizado no teste de susceptibilidade seguiu as instruções descritas nos documentos M27-A3 e M60 do *Clinical & Laboratory Standards Institute-CLSI* (CLSI 2017, CLSI 2008). Foi utilizado o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), esterilizado em membranas de 0,22μm, suplementado com L-glutamina e pH (7,0 ± 0,1) ajustado com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0,165 mol.L⁻¹;

Sigma-Aldrich). Foi utilizado o antifúngico comercial fluconazol (Pfizer) preparado em água deionizada e o extrato bruto e frações diluídos em Dimetil-sulfóxido (DMSO) e álcool etílico absoluto na concentração de 8mg/mL, respectivamente. Em seguida, as espécies de *Candida* foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Agar a 35°C por 24h. As suspensões dos isolados foram preparadas em salina 0,9%, com densidade ajustada na escala 0.5 de MacFarland, utilizado espectrofotômetro a 530 nm em 90% de transmitância. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0mL de solução salina esterilizada e diluído em RPMI 1640 na concentração de $2-5 \cdot 10^3$ céls/mL⁻¹. Para os testes, foram utilizadas placas de microtitulação placas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com os antifúngicos e os extratos separadamente e as placas incubadas a 35°C visualmente, durante 24h e 48h. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) foram determinadas com inibição de 100% para os extratos brutos e frações e 50% para o fluconazol em relação ao poço controle.

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE DOS EXTRATOS DE FUNGOS DA CAATINGA

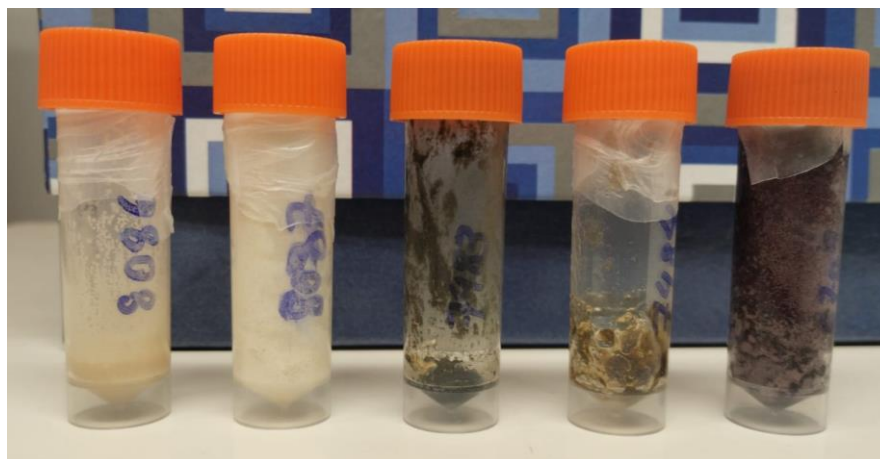
Os extratos brutos das espécies *Tritirachium dependens*, *Diaporthe caatingaensis* e *Penicillium alagoense* foram capazes de inibir o crescimento das leveduras avaliadas com halo de inibição de até 2mm. Os fungos filamentosos *Trichoderma viride* (URM2435, URM6823 e URM6824), *Tritirachium dependens* (URM6821 e URM6822), *Penicillium minioluteum* (URM6843) e *Diaporthe caatingaensis* (URM7485) não exibiram halo de inibição pela técnica da cultura pareada. Desta forma, os isolados não foram selecionados para a etapa subsequente relacionada a obtenção dos extratos brutos em meio líquido.

Após a obtenção dos extratos brutos, foi possível recuperar 146,6mg do isolado de *Tritirachium dependens* (URM6705), 267,8mg de *Diaporthe caatingaensis* (URM7483), 637,5mg de *Diaporthe caatingaensis* (URM7484), 1.878,9 mg de *Penicillium alagoense* (URM8087) e 1.036,4mg de *Penicillium alagoense* (URM8086), como observado na Tabela 1. Os extratos de *Penicillium* exibiram uma tonalidade branca, o de *Diaporthe* esverdeada e *Tritirachium* avermelhada, como observado na Figura 1 e Tabela 2.

Tabela 2: Rendimento, inibição e coloração dos extratos brutos.

Espécie	URM	Inibição	Massa	Coloração
<i>Tritirachium dependens</i>	6705	+	146,6 mg	Avermelhada
<i>Diaporthe caatingaensis</i>	7483	+	267,8mg	Esverdeada
	7484	+	637,5mg	
<i>Penicillium alagoense</i>	8086	+	1036,4mg	Branca
	8087	+	1878,9mg	

Figura 1: Imagem ilustrativa das características observáveis dos extratos brutos de *Penicillium*, *Diaporthe* e *Tritirachium*.



A atividade antifúngica da fração de acetato de etila dos extratos brutos dos fungos de *Tritirachium dependens*, *Diaporthe caatingaensis* e *Penicillium alagoense* frente à *Candida albicans* (URM8368 e URM8668) e *C. tropicalis* (URM 8937 e URM8374) mostrou resultados promissores. Com concentrações inibitórias mínimas de 2 a 0,03 mg/mL. O melhor resultado foi obtido no tempo de leitura de 24h, sendo observado que os extratos de *Penicillium alagoense* foram aqueles com maior potencial de inibição de *Candida*, com valores de Concentração Inibitória Mínima de 0,06mg/mL, como demonstrado nas tabelas 03 e 04.

Tabela 03: Resultado do teste de suscetibilidade (mg/mL) de espécies de *Candida* a extratos brutos de fungos endofíticos do bioma Caatinga (24 h), com concentrações de 2 a 0,06mg/mL.

Leveduras	Amostras									
	<i>Tritirachium dependens</i>		<i>Diaporthe caatingaensis</i>				<i>Penicillium alagoense</i>			
	URM6705		URM7483		URM7484		URM8087		URM8086	
	100	50%	100	50%	100	50	100%	50	100%	50%
	%		%		%	%		%		

<i>Candida albicans</i>	URM8668	1	0,125	0,5	0,125	2	2	2	0,5	0,125	0,06
					5						
	URM8368	1	0,125	0,5	0,125	2	2	2	0,5	0,125	0,06
					5						
	ATCC	0,5	0,25	1	0,5	2	2	2	1	0,25	0,125
<i>C. tropicalis</i>	URM8937	1	0,125	0,5	0,125	2	2	2	0,5	0,125	0,06
					5						
	URM8374	1	0,125	0,5	0,125	2	2	2	0,5	0,125	0,06
					5						
	ATCC	2	0,5	2	1	2	2	2	2	0,25	0,25

Tabela 04: Resultado do teste de suscetibilidade mg/mL de espécies de *Candida* a extratos brutos de fungos endofíticos do bioma Caatinga (48 h), com concentrações de 2 a 0,06mg/mL:

Leveduras		Amostras									
Espécie		<i>Tritirachium dependens</i>		<i>Diaporthe caatingaensis</i>				<i>Penicillium alagoense</i>			
		6705		7483		7484		8087		8086	
		50%	100%	50%	100%	50%	100%	50%	100%	50%	100%
<i>Candida albicans</i>	URM 8668	1	2	0,25	1	0	0	0	0,5	0,06	0,25
	URM 8368	0,5	2	0,25	1	0	0	0	0,5	0,125	0,25
	ATCC	0,5		0,5		0		1		0,25	
<i>C. tropicalis</i>	URM 8937	1	2	0,25	1	0	0	0	0,5	0,125	0,25
	URM 8374	0,5	2	0,25	1	0	0	0	0,5	0,06	0,25
	ATCC	0,5		0,5		0		1		0,25	

Resultados em mg/mL. O valor 0 na tabela, corresponde a não obteve inibição.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A caracterização dos compostos presentes nos extratos dos fungos *Tritirachium dependens* (URM6705), *Diaporthe caatingaensis* (URM7483), *Diaporthe caatingaensis* (URM7484), *Penicillium alagoense* (URM8087) e *Penicillium alagoense* (URM8086) permitiu concluir todos os extratos apresentaram em sua composição frações de flavonoides, taninos e terpenos/esteróides. Nenhum extrato exibiu a presença de antracênicos e os demais exibiram a presença de uma ou mais frações de derivados cinâmicos, taninos, cumarinas, saponinas e alcalóides. Não houve alteração nos constituintes nos isolados de *Penicillium*, entretanto, em *Diaporthe* foi notado que, apesar de serem cepas da mesma espécie, apenas um isolado de cada espécie apresentou a presença de cumarina e saponinas, resultados estes discriminados no quadro 03.

Quadro 03 – Identificação do perfil químico por cromatografia em camada delgada dos isolados de *Penicillium*, *Diaporthe* e *Tritirachium*.

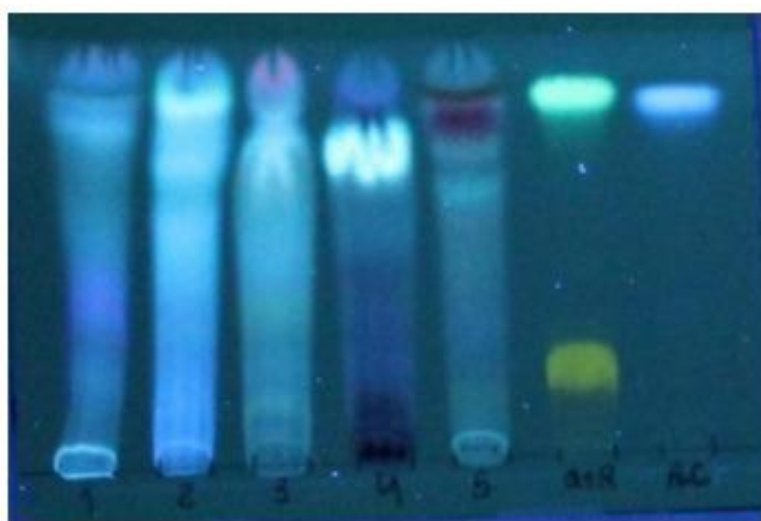
	<i>Penicillium alagoense</i>		<i>Diaporthe caatingaensis</i>		<i>Tritirachium dependens</i>
Classe de metabólito	URM8087	URM8086	URM7484	URM7483	URM6705
Derivados Cinâmicos	+	+	-	-	-
Flavonoides	+	+	+	+	+
Taninos hidrolisáveis	+	+	+	+	+
Taninos condensados	-	-	-	-	+
Cumarinas	+	+	-	+	
Terpenos/Esteroides	+	+	+	+	+
Saponinas	+	+	+	-	+

Antracênicos	-	-	-	-	-
Açúcares	+	+	-	-	+
Alcaloides	-	-	+	+	-

Fonte: Laboratório de Farmacognosia-NUDATEF, 2023.

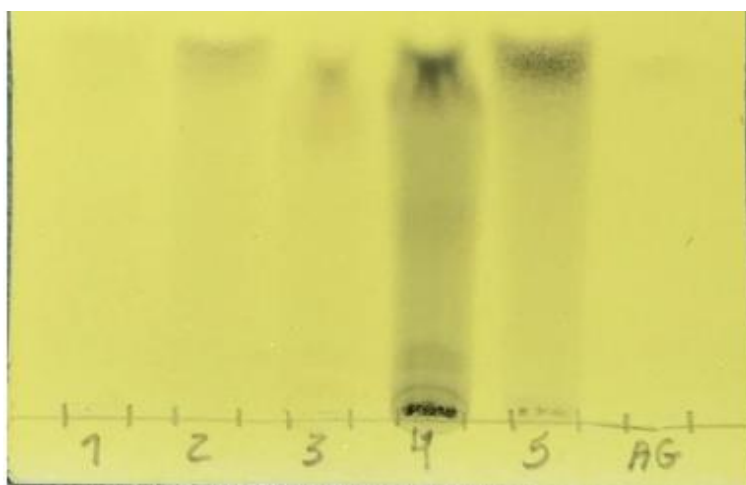
Nas figuras de 2-10, é exibido o perfil da cromatografia em camada delgada dos extratos dos fungos filamentosos utilizados no estudo.

Figura 2– Placa cromatográfica para classe de flavonoides e derivados cinâmicos.



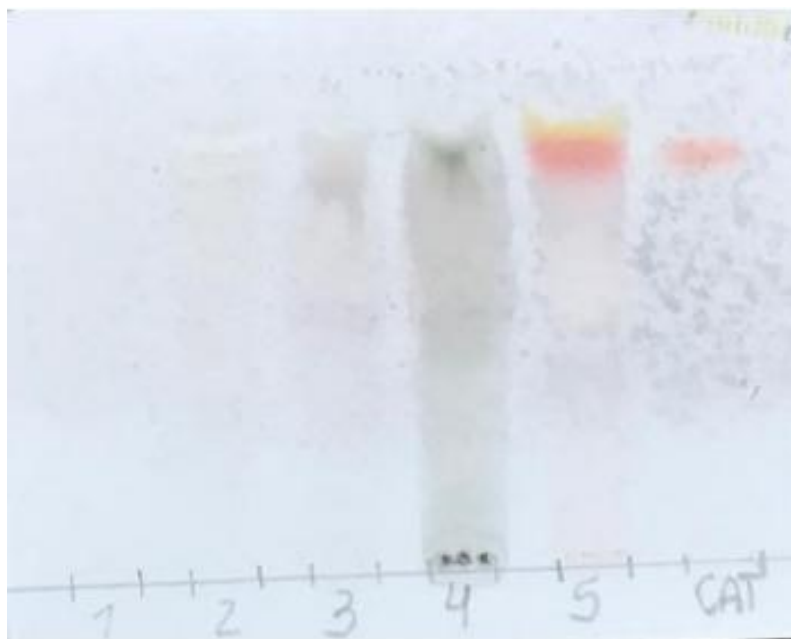
Amostra 1 – URM8087, amostra 2 – URM8086, amostra 3 – URM7484, amostra 4 – URM7483 e amostra 5 - URM6705; Q + R – padrões quercetina + rutina; AC – ácido clorogênico.

Figura 3 – Placa cromatográfica para classe de Taninos hidrolisáveis.



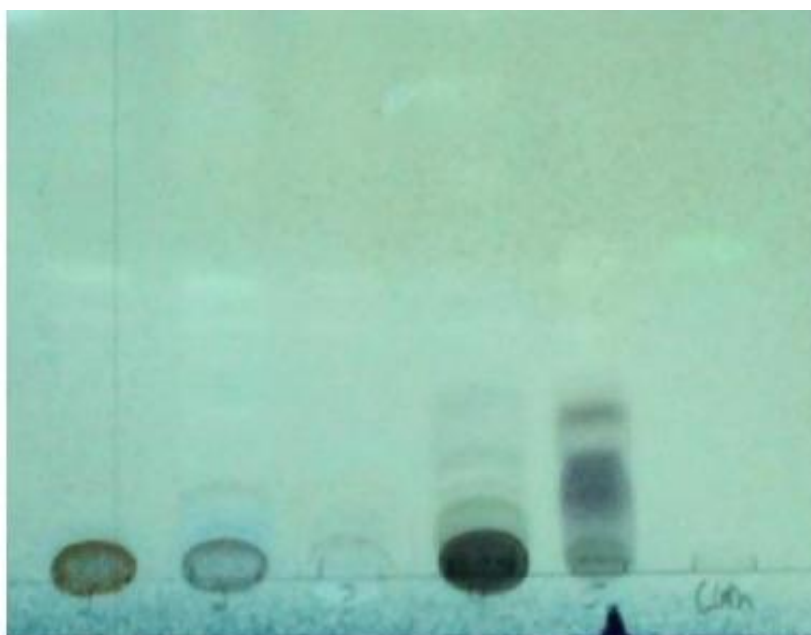
Onde: 1 a 5 são respectivamente amostra 1 – 8087, amostra 2 – 8086, amostra 3 – 7484, amostra 4 – 7483 e amostra 5 – 6705; AG – Ácido gálico.

Figura 4 – Placa cromatográfica para classe de Taninos condensados.



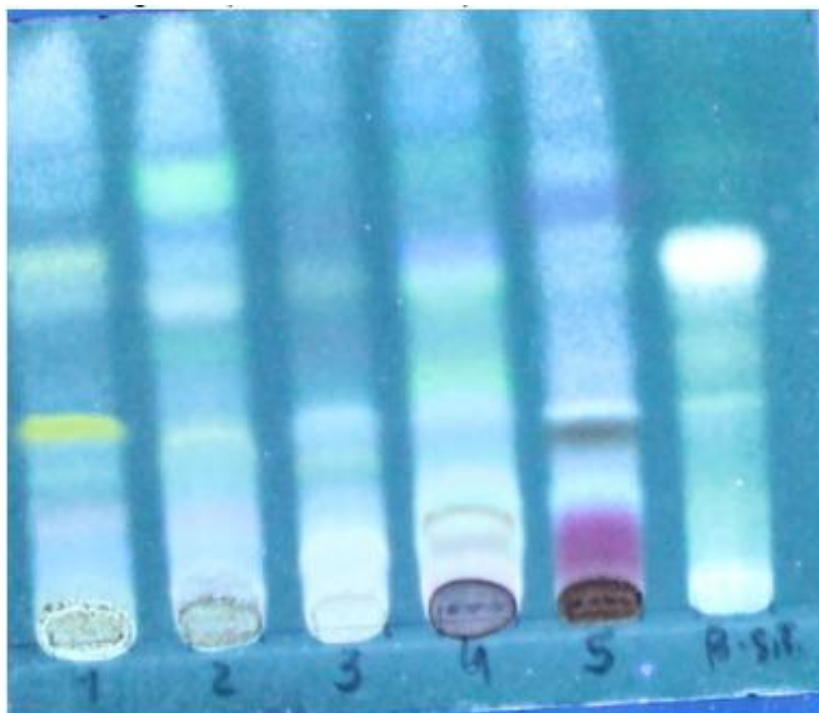
Onde: 1 a 5 são respectivamente amostra 1 – 8087, amostra 2 – 8086, amostra 3 – 7484, amostra 4 – 7483 e amostra 5 - 6705; CAT – catequina.

Figura 5 – Placa cromatográfica para classe de Cumarinas.



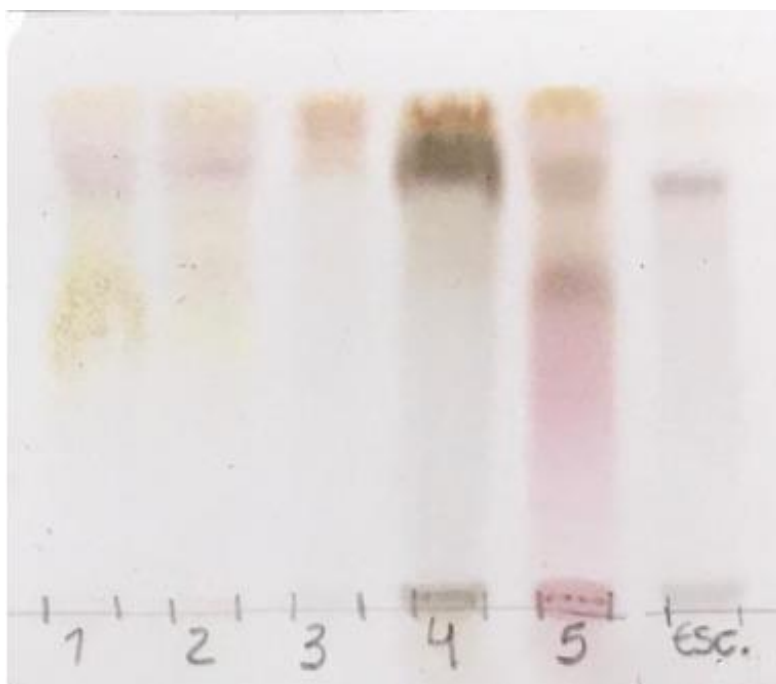
Onde: 1 a 5 são respectivamente amostra 1 – 8087, amostra 2 – 8086, amostra 3 – 7484, amostra 4 – 7483 e amostra 5 – 6705; CUM – cumarinas.

Figura 6 – Placa cromatográfica para classe de Terpenos/esteroides.



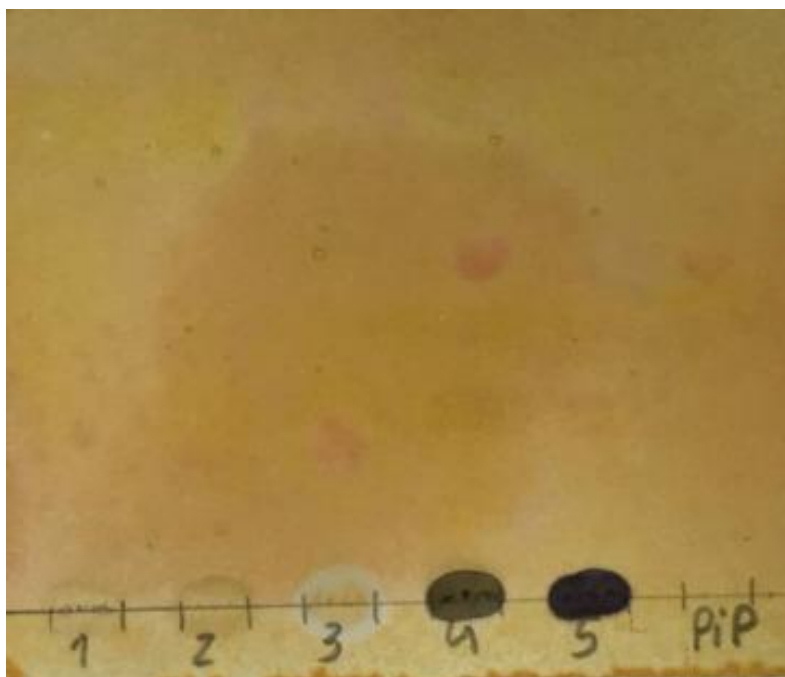
Onde: 1 a 5 são respectivamente amostra 1 – 8087, amostra 2 – 8086, amostra 3 – 7484, amostra 4 – 7483 e amostra 5 – 6705; B.SIT. – β -sitosterol.

Figura 7 – Placa cromatográfica para classe de Saponinas.



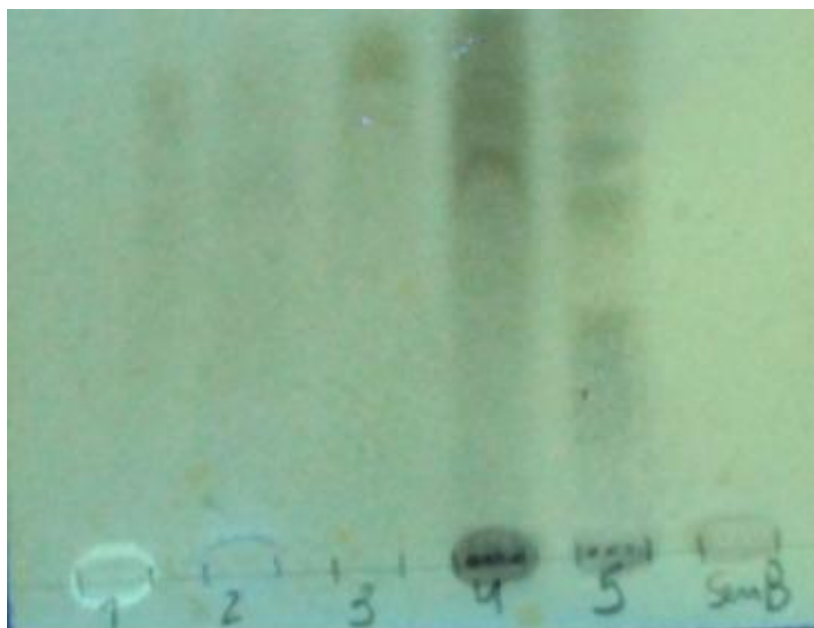
Onde: 1 a 5 são respectivamente amostra 1 – 8087, amostra 2 – 8086, amostra 3 – 7484, amostra 4 – 7483 e amostra 5 – 6705; ESC. – escina.

Figura 8 – Placa cromatográfica para classe de Alcaloides.



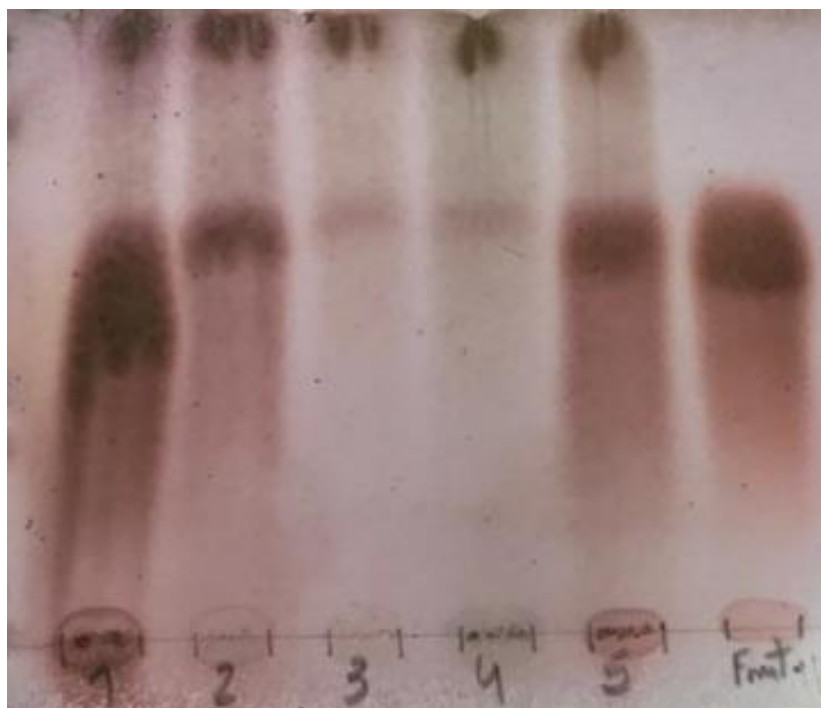
Onde: 1 a 5 são respectivamente amostra 1 – 8087, amostra 2 – 8086, amostra 3 – 7484, amostra 4 – 7483 e amostra 5 – 6705; PIP. – Piperina.

Figura 9 – Placa cromatográfica para classe de Derivados Antacênicos.



Onde: 1 a 5 são respectivamente amostra 1 – 8087, amostra 2 – 8086, amostra 3 – 7484, amostra 4 – 7483 e amostra 5 – 6705; SenB. – Senosídeo B.

Figura 10 – Placa cromatográfica para classe de Açúcares Redutores.



Onde: 1 a 5 são respectivamente amostra 1 – 8087, amostra 2 – 8086, amostra 3 – 7484, amostra 4 – 7483 e amostra 5 – 6705; Frut. – Glicose.

6 DISCUSSÃO

Os ensaios conduzidos no projeto visaram a seleção dos melhores isolados produtores de agentes com potencial anti- *Candida*. Os dados obtidos demonstraram potencial promissor quanto ao uso de fungos isolados da caatinga como reservatórios de novas substâncias biativas, especialmente *Tritirachium dependens*, *Diaporthe caatingaensis* e *Penicillium alagoense*, mais promissor contra isolados de *Candida*. Os dados desse estudo se mostram relevantes, também, do ponto de vista químico, sendo demonstrado a presença de classes de substâncias de interesse microbiológico, como flavonoides, alcaloides e outras.

Foi observada uma habilidade distinta na produção de classes químicas singulares de metabólitos, mesmo entre os isolados da mesma espécie. Essa versatilidade de adaptação do fungo pode estar relacionada com o fenótipo da cepa e a complexidade do meio de cultivo. Assim, a pressão seletiva e adversidade peculiar do habitat do fungo podem implicar na seleção de cepas capazes de se adaptar às novas condições e, conseqüentemente, a produção de compostos relacionados à adaptação nas novas condições disponíveis (SPECIAN, 2014). Esse fato reforça a necessidade de se selecionar os organismos para condução de experimentos que requerem alto nível de eficiência para uso industrial.

Em trabalho recente conduzido por Dhakshinamoorthy (2021) foi verificado a ação antibacteriana de camptotecina, molécula com ação anti-células cancerígenas, obtida de *Diaporthe caatingaensis* no biocontrole de bactérias. Os autores verificaram que o fungo consistiu de um excelente organismo produtor natural do bioproduto. Porém, um achado interessante é que a camptotecina atua estabilizando o complexo de clivagem da topoisomerase I em fungos e mamíferos (FOSTEL, MONTGOMERY & SHEN, 1992) o que significa que provavelmente o composto não foi o responsável pela inibição, observada por nós, em *Candida*.

Apesar de organismos de uma mesma espécie serem semelhantes, eles apresentam diversidade genética, morfológica e modulada por fatores nutricionais/ climáticos etc. Por exemplo, os dois isolados de *Diaporthe caatingaensis* avaliados apresentaram capacidades diferenciadas de produzir cumarinas e saponinas. Perfil

similar foi observado por Boes (2019) que verificaram que existem diferenças na produção de metabólitos secundários quando em condições de cultivo.

Estudos conduzidos com espécies distintas de *Diaporthe* demonstraram o potencial antibacteriano de metabólitos secundários. Bungihan (2011) caracterizaram duas novas benzopirانونas obtidas de metabólitos secundários de *Diaporthe* P133 isoladas de folhas de *Pandanus amaryllifolius*. Os compostos foram capazes de inibir a cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* H (37) Rv.

Em estudo conduzido por Specian (2012), os autores verificaram que metabólito secundário obtido de *D. helianthi* teve a presença do composto fenólico 2-(4 hidroxifenil)-etanol (Tyrosol) que resultou na atividade antimicrobiana frente as bactérias patogênicas *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, e fungos fitopatogênicos.

Ascencio (2014) isolaram o fungo *Diaporthe phaseolorum* como endofítico de *Costus espiralis* (Costaceae), uma espécie nativa da região amazônica. Os autores verificaram que os extratos brutos exibiram ação antimicrobiana contra *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, com CIM de 125 a 500 µg/mL, *Bacillus subtilis* (CIM de 62,4 a 125 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* (CIM de 125 a 500 µg/mL), *Salmonella enterica* (CIM de 125 a 62,5 µg/mL) e *Enterococcus faecalis* (CIM de 500 a 125 µg/mL). Os metabólitos secundários caracterizados pertenciam à classe química das cumarinas, triterpenos, compostos fenólicos e esteróis.

Souza (2016) demonstraram que o fungo *Diaporthe cynaroidis* F2934 foi capaz de produzir três cromanonas identificadas pela primeira vez na espécie, além da purificação de fomosinas A, C e D. Os extratos brutos foram hábeis em inibir *Staphylococcus aureus* e enterobactérias.

Medeiros (2018) verificaram que *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 apresentou metabólitos secundários com atividade contra fitopatógenos, relatando o primeiro isolamento de diaportina e ortosporina do fungo. O isolado foi avaliado sob diferentes condições de cultivo, sendo que os extratos brutos apresentaram efeito inibitório contra *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus aureus* sensível à metilicina e *S. aureus* resistente à metilicina.

Riga (2021) caracterizaram um novo composto, o ácido diaporthindóico e seis previamente conhecidos, obtido do fungo *Diaporthe lithocarpus*, um endofítico de

Artocarpus heterophyllus. Os compostos verificaram a atividade antimicrobiana frente a enterobactérias e *Saccharomyces cerevisiae*. Em nossas pesquisas observamos até o presente, o pioneirismo dos compostos de *Diaporthe caatingaensis*, por atividade antifúngica de metabólitos secundários, frente a leveduras de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.

À luz dos nossos conhecimentos, este é o primeiro trabalho, até o momento, com estudos sobre o potencial antimicrobiano de extratos brutos de *Penicillium alagoense*, fungo endofítico isolado de cactos do nordeste do Brasil. Os extratos dos isolados foram os que exibiram o melhor potencial antimicrobiano frente a *Candida*, com CIM's que variaram de 0,06 a 1ug/mL.

Os dados reforçam a importância do uso de espécies de *Penicillium*, sobretudo de organismos endofíticos, como reservatório de potenciais substâncias bioativas. Essa tendência remonta a descoberta da penicilina por Sir Alexander Fleming, como ponto de partida, relacionado a observação da inibição de *Staphylococcus* por *Penicillium notatum* (FLEMING, 1929). Este marco histórico, consistiu em um dos pilares para o desenvolvimento de investigações envolvendo espécies de fungos como fonte de novos antibióticos, sobretudo, devido à ameaça do surgimento de microrganismos multidroga resistentes (TACCONELLI, 2018).

Os resultados obtidos aqui foram similares aos de outros autores que verificaram que espécies de *Penicillium* possuem uma ampla gama de potencial antimicrobiano. GASHGARI e colaboradores (2016) utilizando fungos endofíticos isolados de plantas medicinais como *Alhagi graecorum*, *Cressa cretica*, *Citrullus colocynthis*, *Tamarix nilotica*, *Achillea fragrantissima*, *Artemisia sieberi* e *Nitraria retusa* obtiveram extratos de 263 endófitos. No estudo, foi verificado que o extrato de *Penicillium chrysogenum*, o mais prevalente com taxa de 98.57%, foi o mais eficaz na atividade antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Em trabalho contemporâneo, Mishra (2016) avaliaram 91 isolados de fungos endofíticos da planta *Melastoma malabathricum*, verificaram que a espécie *Penicillium chermesinum* exibiu os melhores valores de inibição frente às espécies bacterianas, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, e fúngicas, *F. oxysporum*, *F. graminearum* e *F. culmorum*.

É importante destacar que as pesquisas destacadas aqui não se limitam apenas a bactérias e fungos de interesse médico. Esse fato é relevante pois os compostos podem ter, também, ação frente a esses microrganismos. Assim, podemos destacar os trabalhos de Wang (2010) que verificaram atividade antifúngica de extratos de *Penicillium canescens* sobre fungos fitopatogênicos como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum orbiculare*, *Didymella bryoniae* e *Sclerotinia sclerotiorum*. Em estudo conduzido com a espécie endofítica *P. amestolkiae* foi verificada inibição frente a *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida utilis* (ROZMAN, 2017). O endofítico *Penicillium citrinum* de tamareiras mostrou-se eficaz contra *Bacillus thuringiensis*, *Enterococcus faecalis* e uma bactéria Gram-negativa *Salmonella enterica*, além dos fitopatógenos *Trichoderma* sp., *Fusarium sporotrichioides* e *Trichoderma* sp. (BEN MEFTTEH, 2018). Estudo conduzido por Ding (2019) obtiveram resultado semelhantes com o endofítico *Penicillium funiculosum*, que exibiu intensa atividade inibitória contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Evidentemente, esse panorama demonstra a versatilidade e potencial de espécies de *Penicillium* como biofábricas potenciais de antimicrobianos e evidenciam a necessidade de estudos aprofundados do gênero que possam conduzir com à identificação e descoberta de novos compostos com potencial bioativo frente a fungos patogênicos, a exemplo dos listados no quadro 04.

Quadro 04. Compostos com potencial antifúngico produzidos pelo endofítico *Penicillium*.

Espécie	Metabólitos identificados	Ação antimicrobiana	Autor
<i>P. ochrochloron</i>	α -pirona 3,4,6-trissubstituídos, nomeadamente 6-(2'R-hidroxi-3'E,5'E-dieno-1'-heptil)-4-hidroxi-3- metil-2H-piran-2-ona (4), 6-(2'S-hidroxi-5'E-eno-1'- heptil)-4-hidroxi-3-metil-2H-piran-2-ona (5), e 6-(2'S-hidroxi-1'-heptil)-4-hidroxi-3-metil-2H-piran2-ona (6), juntamente com ácido tricodérmico (7)	Agentes de <i>hialohifomicose</i> , <i>feohifomicoses</i> e bactérias patogênicas	ZHAO, 2019

P. chrysogenum	Meleagrin, 2',3'-diidrossorbicilina, meleagrina, crisofanol, 2',3'-dihidrossorbicilina, crisoginona e maculosin-5	<i>Candida albicans</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>A. niger</i> , <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>B. megaterium</i>	HAWAS, 2013
P. chermesinum	Espiromeroterpenóides	<i>C. albicans</i> , <i>E. coli</i> , <i>M. luteus</i> e <i>Vibrio alginolyticus</i>	LIU, 2016
P. citrinum	Ergone	<i>C. albicans</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> e <i>Mycobacterium phlei</i>	WANG, 2014
Penicillium sp.	policetídeos dicloro-aromáticos	<i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i>	YANG, 2017
Penicillium sp.	glicosídeo de aurona	<i>Candida sp.</i>	SONG, 2015
P. vinaceum	alcalóide quinazolínico	<i>C. albicans</i> ATCC 76615, <i>C. neoformans</i> ATCC 32609, <i>T. rubrum</i> e <i>A. fumigatus</i> ,	ZHENG, 2012
P. paxilli	Pirenocinas	<i>M. gypseum</i>	RUKACHAISIRIK UL, 2007
Penicillium spp.	orcinol, ciclo-(L-Pro-L-Val), uracila, diidroisocumarinas, 4-hidroximeleína, 8-metoximeleína e 5-hidroximeleína	<i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>C. sphaerospermum</i>	OLIVEIRA, 2009

P. namyslowskii	decolorigriseofulvina, decolorodehidrogriseofulvina, griseofulvina, desidrogriseofulvina, ácido mevastatina e mevastatina junto com griseofenona C e peniprequinolona	Atividade antifúngica	WUBSHET, 2013
--------------------	---	--------------------------	---------------

Em relação a espécie *Tritirachium dependens*, esta demonstrou também potencial inibitório frente às leveduras avaliadas com CIM de 0,5 mg/mL, sendo este o primeiro relato demonstrando a capacidade desta espécie de produzir metabólitos secundários com potencial antimicrobiano.

Tritirachium é um fungo cosmopolita e comumente isolado do solo contendo serapilheira. Relatos têm apontado que a espécie é um patógeno oportunista de plantas e de humanos (MORAES et al., 2010). Em um estudo recente conduzido por HAPIDA et al., (2022), foi verificado que metabólitos secundários obtidos de *Tritirachium oryzae* exibiram moderada atividade antioxidante. Os compostos foram identificados como 2-(4-hidroxifenil)-4-metoxitetrahidrofuran-3-ol, contudo os autores destacam a necessidade de realização de estudos mais aprofundados. SOUZA e colaboradores (2023) verificaram o potencial biotecnológico de *Tritirachium dependens*, uma espécie capaz de produzir quitinase.

QADRI, e colaboradores (2014) verificaram que os extratos de *Tritirachium oryzae* exibiram atividade frente a bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e a levedura *Candida albicans*. QADRI e colaboradores verificaram que a fração de cloreto de metileno do extrato bruto de *T. oryzae* exibiu potente atividade contra *Candida albicans* e as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

O gênero *Tritirachium* vem sendo estudado na tentativa de elucidar os metabólitos produzidos e a sua aplicabilidade. Estudos anteriores, provenientes da fermentação em meio líquido, demonstraram a presença dos compostos 4-carboxi-5,5'-di-hidroxi-3,3'-dimetildifeniléter e macroesfélides. Este último composto, foi demonstrado ter atividade relacionada com a inibição da adesão celular (HAYASHI et

al., 1995). IVANOVA e colaboradores (2007), estudando fungos isolados da Antártica, verificaram que o metabólito produzido por *Tritirachium* exibiu fraca atividade antimicrobiana frente a *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*.

Um importante grupo de metabólitos, as xantonas, foram relatadas em gênero *Tritirachium*. Esse composto já foi relatado em diversos táxons fúngicos, bacterianos e plantas (MASTERS, 2012). Os derivados cinâmicos se destacam pelo amplo potencial farmacológico, a exemplo da atividade antimicrobiana. Uma revisão abrangente sobre o tema foi realizada por Sova (2012), com destaque para a atividade antimicrobiana.

Foi observado que todos os isolados apresentaram a presença de flavonoides em sua composição. Segundo a literatura, essa classe química possui ação antimicrobiana bem caracterizada. A ação biológica sobre o patógeno se dá devido a ruptura das membranas celulares (SARBU, 2019). Os flavonóides constituem uma importante classe química de compostos fenólicos. Possuem ação antioxidante, antiviral, antitumoral, anti-flamatória e hormonal (ANDRADE, 2018). Similar ao observado por nós, foi observado que flavonóides (3',4'-di-hidroxi-5,6,7-trimetoxiflavona, cirsiolol, cirsimaritina, hispidulina) possuem atividade contra fungos patogênicos como *Cladosporium sphaerospermum* (ALCERITO, 2002), *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis* (JOHANN, 2007).

De modo similar, todos os extratos apresentaram a presença de taninos hidrolisáveis em sua composição. Porém, apenas *Tritirachium* teve a presença de taninos condensados. Esse fato serve de base, também, para justificar o potencial antifúngico dos extratos dos fungos endofíticos. Segundo a literatura, os taninos constituem importantes agentes com ação antifúngica, atuando contra microrganismos patogênicos (EKAMBARAM et al., 2016).

Em relação às cumarinas, apenas *Penicillium alagoense* e *Diaporthe caatingaensis* exibiram este constituinte. Essa classe de metabólitos está amplamente presente em vegetais e, também, em bactérias e fungos (MURRAY, 1989). São substâncias que possuem baixa toxicidade e despertam grande interesse industrial e propriedades microbiológicas, sobretudo, o potencial antifúngico (HOULT; PAYÁ, 1996; COWAN, 1999).

Observamos que apenas o isolado URM7483-*Diaporthe caatingaensis* não exibiu a presença de saponinas. Apesar deste fato, os isolados apresentaram uma atividade antifúngica considerável. Segundo Woldemichael e WINK (2001), esses compostos são naturalmente capazes de inibir o crescimento de *Candida albicans*, de forma isolada ou fração purificada. Ainda, corroboram com o observado por nós o estudo de STUARDO e SAN MARTIN (2008), que verificaram a ação das saponinas frente ao fungo *Botrytis cinerea*.

Outro grupo químico prevalente nos extratos foram os terpenos. Estes consistem em substâncias naturais provenientes de vegetais ou produzidas em laboratório através da via do mevalonato. A literatura científica aponta uma evidente atividade antifúngica exibida por representantes desta classe química (VUORELA, 2004; AMBRÓSIO, 2006).

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível levantar as seguintes conclusões:

- Nem todos os fungos endofíticos de cactaceae exibem potencial de uso antifúngico;
- Os extratos brutos de *Tritirachium dependens*, *Diaporthe caatingaensis* e *Penicillium alagoense* são capazes de inibir cepas de *Candida albicans* e *C. tropicalis*;
- O extrato bruto do *Penicillium alagoense* exibiu melhor potencial de inibição frente as cepas de *Candida albicans* e *C. tropicalis*;
- Os constituintes químicos presentes nos extratos brutos podem justificar as baixas concentrações necessárias para inibir cepas de *Candida albicans* e *C. tropicalis*
- Os extratos brutos de *Tritirachium dependens*, *Diaporthe caatingaensis* e *Penicillium alagoense* apresentaram todos em sua composição químicas frações de flavonoides, taninos e terpenos/esteroides;
- A fração acetato de etila do extrato bruto de *Tritirachium dependens*, *Diaporthe caatingaensis* e *Penicillium alagoense* podem inibir cepas de *Candida albicans* e *C. tropicalis* em baixas concentrações;
- Estudos mais elaborados são necessários para corroborar com as pesquisas dos extratos brutos.

REFERÊNCIAS

- ABUTAHA, N. *et al.* Larvicidal activity of endophytic fungal extract of *Cochliobolus spicifer* (Pleosporales: Pleosporaceae) on *Aedes caspius* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.50, n.3, p. 405 –414. 2015.
- ALMEIDA L.F.D., CAVALCANTI Y.W., LIRA-JÚNIOR R., LIMA E.O., CASTRO R.D. Efeito antifúngico de tinturas de própolis e romã sobre espécies de *Candida*. **Revista Cubana de Estomatologia**. v. 26, n. 2, p. 99-106, 2012.
- ALVES, D. R. *et al.* Leishmanicidal and fungicidal activity of lipases obtained from endophytic fungi extracts. **PLOS ONE**, vol. 13, no. 6, p. e0196796, 18 Jun. DOI 10.1371/journal.pone.0196796. Available at: <http://europepmc.org/abstract/med/29912872>. 2018.
- ALVES, D. R.; SILVA, W. M. B.; SANTOS, D. L.; FREIRE, F. C. O.; VASCONCELOS, F. R.; MORAIS, S. M. Atividades antioxidante, anticolinesterasica e citotóxica de metabolitos de fungos endofíticos. **Braz. J. of Develop.** Curitiba, v. 6, n. 9, p.73684-73691, sep. 2020.
- ARAUJO-MAGALHAES, G. R; MACIEL, M. H. C; SILVA, L. F; MONTALVO, G. S. A; SILVA, I. R; BEZERRA, J. D. P; SOUZA-MOTTA, C. M; KEILA, A. M. Fungal endophytes from leaves of *Mandevilla catimbauensis* (Apocynaceae): Diversity and potential for L-asparaginase production. **BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY**, v. 1, p. 1, 2021.
- 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.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A., REX, J. H. Resistance to Antifungal Agents. In: Fong IW, Drlica K. Antimicrobial resistance and implications for the 21th century. **Springer**. 2008.
- BEZERRA, J. D. P. **Fungos endofíticos em cactos de áreas de caatinga preservada e com atividade de agricultura familiar: diversidade e estudo filogenético**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos. 2016.
- BOMFIM, A. G. J; MACIEL, M. H. C; BEZERRA, J. D. P; PAIVA, L. M.; OLIVEIRA, J.T. C; SOUZA-MOTTA, C. M; MOREIRA, K. A. Antagonistic activity and chitinolytic potential of endophytic fungi from cacti growing in the Brazilian tropical dry forest. **SYDOWIA**, v. 73, p. 197-208, 2021.
- BONGOMIN, F., GAGO, S., OLADELE, R. O., & DENNING, D.W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. **J Fungi (Basel)**. 3(4), E57. 2017.

CAFÊU, M.C.; SILVA, G.H.; TELES, H.L; BOLZANI, V.S.; ARAÚJO, A.R.; YOUNG, M.C.M.; PFENNING, L.H. Substâncias antifúngicas de *Xylaria sp.*, um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 991-995, 2005.

COSTA, K. R. A.; GENARO, A. "*Candida albicans*: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Faculdade Alfredo Nasser-Instituto de Ciências da Saúde**, 2016.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. I -**Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the Bristish Mycological Society**, v.57, p.25-39, 1971a.

FARIA, M. R.; TIGANO, M. S. Coleção de fungos entomopatogênicos do Cenargen. Brasília, DF: **Embrapa**, 1996.

FORD, C. B; FUNT, J. M; ABBEY, D; ISSI, L; GUIDUCCI C; MARTINEZ, D. A., ET AL. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **ELife**. 4(1):e00662. 2015.

FOSTEL JM, MONTGOMERY DA, SHEN LL. Characterization of DNA topoisomerase I from *Candida albicans* as a target for drug discovery. **Antimicrob Agents Chemother**. 1992 Oct;36(10):2131-8. doi: 10.1128/AAC.36.10.2131. PMID: 1332588; PMCID: PMC245467.

FRIES EM (1832). **Systema mycologicum**. vol. 3. E. Moritz, Greifswald, Germany.

GABRIEL, M. F. *et al.* The major *Alternaria alternata* allergen, Alt a 1: A reliable and specific marker of fungal contamination in citrus fruits. **International Journal of Food Microbiology**, Vitoria, v. 257, n. 18, p. 26-30. 2017.

HARMAN, G. E. *et al.*, *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews, Microbiology**, Washington, v. 2, 2004.

HARMAN, G. E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, St. Paul, v. 84, p.377-393, 2000.

HSIEH, H.M., JU, Y.M. and ROGERS, J.D. (2005) Molecular Phylogeny of Hypoxylon and Closely Related Genera. **Mycologia**, 97, 844.
<https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832776>

IÓCA, L. P.; NICACIO, K. J.; BERLINCK, R. G. S. Natural products from marine invertebrates and microorganisms in Brazil between 2004 and 2017: Still the challenges, more rewards. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 998–1031, 2018.

JAKUBCZYK, D.; DUSSART, F. Selected Fungal Natural Products with Antimicrobial Properties. **Molecules**, vol. 25, no. 4, p. 911, 18 Feb. 2020. DOI 10.3390/molecules25040911. Available at: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/4/911>.

JUCKPECH, K.; PINYAKONG, O.; RERNGSAMRAN, P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by newly isolated *Curvularia* sp. F18, *lentinus* sp. S5, and *Phanerochaete* sp. T20. **Science Asia**, v. 38, n. 2, p. 147–156, 2012.

KEISSLER K VON (1912). Zur kenntnis der pilzflora krains. **Beihefte zum Botanischen Zentralblatt** 29: 395–440.

KELLER, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. **Nat Rev Microbiol.** Jan;17(3):167-80, 2019.

KING, M. L. Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.

KNITSCH, W. *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of preemptive antifungal therapy for the prevention of invasive candidiasis following gastrointestinal surgery for intra-abdominal infections. **Clin. Infect. Dis.** 61, 1671–1678, 2015.

KRIZSÁN, K.; PAPP, T.; MANIKANDAN, P.; Clinical Importance of the Genus *Curvularia*, Medical Mycology: Current Trends and Future Prospects p.147-204, 2016.

LI, Y., WU, X., XU, J., YU, X., ZHAO, W., & LUO, Z. Pestalotides A-C, antitumour polyketides produced by the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. associated with *Litsea cubeba*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 30(3), 126871, 2020.

LIANG, Y.; RAN, S.-F.; BHAT, J.; *et al.* *Curvularia microspora* sp. nov. associated with leaf diseases of *Hippeastrum striatum* in China. **MycoKeys**, v. 29, p. 49–61, 2018.

LIU, J. *et al.* Antibacterial Polyketides from the Jellyfish-Derived Fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 74, n. 8, p. 1826 - 1829, 2011.

LOU, J; FU, L. PENG, Y; ZHOU, L. Metabolites from *Alternaria* fungi and their bioactivities. **Molecules**. 2013;18(5):5891-5935. Published 2013 May 21. doi:10.3390/molecules18055891.

MANAMGODA, D. S.; CAI, L.; MCKENZIE, E. H. C. *et al.* A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris* - *Cochliobolus* - *Curvularia* Complex. **Fungal Diversity**, v. 56, n. 1, p. 131–144, 2012.

MARTINEZ-KLIMOVA, E.; RODRÍGUEZ-PEÑA, K.; SÁNCHEZ, S. Endophytes as sources of antibiotics. **Biochemical Pharmacology**, v. 134, p. 1–17, 2017.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-DNPMA, p. 393-419, 1998.

MONDOL, M. A. M.; FARTHOUSE, J.; ISLAM, M. T.; SCHÜFFLER, A.; LAATSCH, H. Metabolites from the Endophytic Fungus *Curvularia* sp. M12 Act as Motility

Inhibitors against *Phytophthora capsici* Zoospores. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 2, p. 347–355, 2017.

MONTEL, J. V. S.; MORAIS, G. K. A.; DANTAS, S. B. S.; CHAPLA, V. M. Caracterização química de extratos brutos obtidos de dois fungos endofíticos isolados de *Cochlospermum regium*. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.4, p. 42728-42737 apr 2021.

MONTRAVERS, P. *et al.* AmarCAND2 Study Group. Antifungal therapy for patients with proven or suspected *Candida* peritonitis: Amarcand2, a prospective cohort study in French intensive care units. **Clin. Microbiol. Infect.** 23, 117.e1–117.e8, 2017.

NEES, V. O. N; ESENBECK, C. G (1816). **Das system der pilze und schwämme. Wurzburg, Germany.** Biodiversity Heritage Library, 2015.

NISA, H. *et al.* Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. **Microbial Pathogenesis**, v. 82, p.50-59, maio 2015.

OKAMURA, L. S. **Avaliação do potencial antifúngico do extrato da própolis verde contra leveduras do gênero *Candida* spp.** Trabalho de conclusão de curso da Unidade acadêmica de Saúde da Universidade Federal de Campina Grande. Cuité: CES, 2019.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. *et al.* MSG-01: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of caspofungin prophylaxis followed by preemptive therapy for invasive candidiasis in high-risk adults in the critical care setting. **Clin. Infect. Dis.** 58, 1219–1226, 2014.

PÁDUA, A. P. S. L; KOEHLER, A; PAGANI, D. M; Bezerra, PEREIRA, J. D; DE SOUZA-MOTTA, C. M; SCROFERNEKER, M. L. Antifungal susceptibility of the endophytic fungus *Rhinochlamydia similis* (URM 7800) isolated from the Caatinga dry forest in Brazil. **BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY**, v. 1, p. 1-8, 2022.

PÁDUA, A. P. S. L; FREIRE, K.T. L. S; OLIVEIRA, T. G. L; SILVA, L. F; ARAÚJO-MAGALHÃES, G. R ; AGAMEZ-MONTALVO, G. S; SILVA, I. R; BEZERRA, J. D. P; SOUZA-MOTTA, C. M. Fungal endophyte diversity in the leaves of the medicinal plant *Myracrodruon urundeuva* in a Brazilian dry tropical forest and their capacity to produce L-asparaginase. **ACTA BOTANICA BRASILICA**, v. 1, p. 1-11, 2018.

PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.** 62, 1–50. This is the most recent version of international treatment guidelines for candidaemia and invasive candidiasis. 2016.

PATHAKUMARI, B., LIANG, G., LIU, W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**; 130, 110550. 2020.

- PAVÓN, M. A. *et al.* ITS-based detection and quantification of *Alternaria* spp. in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.165-171. 2012.
- PEIXOTO NETO, P. A. S; AZEVEDO, J. L; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos: Interação com as plantas e potencial biotecnológico. **Biotechnologia Ciênc Desenvolv**, 29:62- 76, 2002.
- PELZ, R. K. *et al.* Double-blind placebo-controlled trial of fluconazole to prevent candidal infections in critically ill surgical patients. **Ann. Surg.** 233, 542–548, 2001.
- PEREIRA, E. J. P. *et al.* Circadian rhythm, and antimicrobial and anticholinesterase activities of essential oils from vitex gardneriana. **Natural Product Communications**, vol. 13, no. 5, p. 635–638. <https://doi.org/10.1177/1934578X1801300528>. 2018.
- PFALLER, M. A. *et al.* Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole- resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 4, p. 1199-203, 2012.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, Iowa, v.20, n.1, p.133–163. 2007.
- PINHEIRO, J, B; POLONIO, J. C; ORLANDELLI, R.C; PAMPHILE, J. A; GOLIAS, H.C. Larvicidal activity of endophytic fungi: a review. **Brazilian Journal of Development Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n.6, p.35761-35774 jun.2020.
- PIRES I.M.O; SILVA, A. V.; SANTOS, M. G. S.; BEZERRA, J. D. P.; BARBOSA, R. N.; SILVA, D. C. V.; SVEDESE, V. M.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PAIVA, L. M. Potencial antibacteriano de fungos endofíticos de cactos da Caatinga, uma floresta tropical seca no Nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, [S. l.], v. 9, n. 2, 2015.
- PRINCE, K. A. **Determinação da atividade anti-Mykobacterium tuberculosis de metabólicos bioativos de fungos endofíticos empregando a técnica do MABA**. Araraquara: UNESP; 2008.
- RINGDAHL E. N. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Mo Med*. 103(2):165-8. 2006.
- ROBERT, V. *et al.* MycoBank gearing up for new horizons. **IMA Fungus** 4:371–379. 2013.
- SADIGURSKY D, NOGUEIRA E FERREIRA L, MORENO DE OLIVEIRA CORRÊA L. Phaeohyphomycosis infection in the knee. **Rev Bras Ortop**. 2016;51(2):231-234. Published 2016 Feb 23. doi:10.1016/j.rboe.2016.02.004.
- SAMSON, R. A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. **Studies in Mycology**, v. 6, p. 1–119, 1974.
- SANTOS, F. A. G. **Avaliação da atividade anti-biofilme de inibidor de cicloxigenase e fluconazol em modelo experimental de endocardite por**

espécies do complexo *Candida parapsilosis*. Dissertação de tese do curso de Pós-Graduação de Biologia de Fungos. UFPE/CCB-2017-195, 2017.

SANTOS, M.G.S; MACIEL, M. H. C; SOUSA, M. A; BOMFIM, A. G. J; BEZERRA, J. D. P; PESSOA, J. A; SOUZA-MOTTA, C. M. Characterisation and partial purification of L-asparaginase produced by endophytic fungi from cactus *Cereus jamacaru*. **SYDOWIA**, v. 74, p. 303-313, 2022.

SANTOS, P. R. R.; LEÃO, E. U.; AGUIAR, R. W. DE S.; DE MELO, M. P.; DOS SANTOS, G. R. Morphological and molecular characterization of *Curvularia lunata* pathogenic to andropogon grass. **Bragantia**, v. 77, n. 2, p. 326–332, 2018.

SCHUSTER, M. G. *et al.* Empirical fluconazole versus placebo for intensive care unit patients: a randomized trial. **Ann. Intern. Med.** 149, 83–90, 2008.

SHIOZAWA, P.; CECCHI, D; FIGUEIREDO, M. A. P; SEKIGUCHI, L. T; BAGNOLI, F; LIMA, S. M. R. R. Tratamento de candidíase vaginal recorrente: revisão atualizada. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo**; 52(2):48-50. 2007.

SHORR, A. F., CHUNG, K., JACKSON, W. L., WATERMAN, P. E. & KOLLEF, M. H. Fluconazole prophylaxis in critically ill surgical patients: a meta-analysis. **Crit. Care Med.** 33, 1928–1935, 2005.

SICILIANO, I. *et al.* Molecular phylogeny and characterization of secondary metabolite profile of plant pathogenic *Alternaria* species isolated from basil. **Food Microbiology**, v. 73, p. 264-274. 2018.

SILVA, L. F; FREIRE, K. T. L. S; ARAUJO, G. R; MONTALVO, G. S. A; SILVA, M. A; COSTA-SILVA, T. A; PAIVA, L. M; PESSOA JUNIOR, A; BEZERRA, J. D. P; SOUZA-MOTTA, C. M. *Penicillium* and *Talaromyces* endophytes from *Tillandsia catimbauensis*, a bromeliad endemic in the Brazilian tropical dry forest, and their potential for l-asparaginase production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 34, p. 162, 2018.

SILVA, L. F; PADUA, A. P. S. L; FERRO, L. O; MONTALVO, G. S. A; BEZERRA, J. D. P. ; MOREIRA, K. A. ; SOUZA-MOTTA, C. M. Cacti as low-cost substrates to produce L-asparaginase by endophytic fungi. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 247, 2022.

SINGH, D., YADAV, S., TIWARI, R., SHARMA, V., PRASAD, R., & GUPTA, R. K. Aspergiolide A: A Marine-Derived and Immunomodulatory Metabolite of the Coral-Associated Fungus *Aspergillus niger* NFCCI 2278. **ACS Omega**, 4(1), 1562-1570, 2019.

STROBEL GA, DAISY B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol and Mol Bio Ver**, 67:491-502, 2003.

STROBEL, G. The Emergence of Endophytic Microbes and Their Biological Promise. **Journal of Fungi**, v.4, p. 57, 2018.

TIAN, J. *et al.* Larvicidal spirobisnaphthalenes from the endophytic fungus *Berkleasmium* sp. against *Aedes albopictus*. **Pest Management Science**, v. 72, n. 5, p. 961-965, 2016.

TIMSIT, J. F. *et al.* Empirical Micafungin treatment and survival without invasive fungal infection in adults with ICU-Acquired sepsis, *Candida* colonization, and multiple organ failure. **JAMA** 316, 1555, 2016.

VASUNDHARA, M.; REDDY, M. SUDHAKARA; KUMAR, ANIL. Secondary metabolites from endophytic fungi and their biological activities. **New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering**, p. 237-258, 2019.

VIEIRA, A. J. H; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista RBAC**. DOI: 10.21877/2448-3877.201600407. 2016.

YANG, M.J. *et al.* First total synthesis of paecilodepsipeptide A. **Chinese Chemical Letters**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 527-530, 2009.